



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS *HUMAN MILK FAT SUBSTITUTE* (HMFS) MELALUI
SELEKTIF INTERESTERIFIKASI ETIL OLEAT SUSU SAPI DENGAN
TRIPALMITIN MINYAK SAWIT MENGGUNAKAN BIOKATALIS**

SKRIPSI

MERISA BESTARI FAIZ

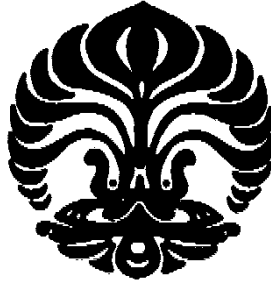
0806340126

DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA

FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA

DEPOK

JANUARI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS *HUMAN MILK FAT SUBSTITUTE* (HMFS) MELALUI
SELEKTIF INTERESTERIFIKASI ETIL OLEAT SUSU SAPI
DENGAN TRIPALMITIN MINYAK SAWIT MENGGUNAKAN
BIOKATALIS**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik

MERISA BESTARI FAIZ

0806340126

DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA

FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA

DEPOK

JANUARI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Merisa Bestari Faiz

NPM : 0806340126

Tanda Tangan : 

Tanggal : 17 Januari 2012

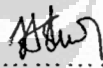
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Merisa Bestari Faiz
NPM : 0806340126
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi :

Sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) Melalui Selektif Interesterifikasi Etil Oleat Susu Sapi Dengan Tripalmitin Minyak Sawit Menggunakan Biokatalis

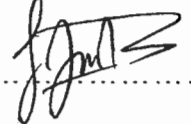
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

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

Penguji I : Dr.Eng. Muhammad Sahlan, S.Si., M.Eng (.....)

Penguji II : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng (.....)

Penguji III : M. Ibadurrohman, S.T., M.T., M.Sc.Eng (.....)

Ditetapkan di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Tanggal : 17 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan buku skripsi ini. Penulisan buku skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknologi Bioproses pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan kelancaran serta kemudahan dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Ayah dan ibu saya yang telah memberikan banyak motivasi, *support* dan doa sehingga saya tetap bersemangat untuk dapat mengerjakan skripsi ini sesempurna mungkin yang dapat saya lakukan.
- (3) Mugi Restiana Utami, Yusriza Amien Habibie, Ariq Jauhardian Mumtaz Febrian serta Advance Lazuardy Ilman Firdaus yang telah memberikan hiburan, motivasi, dukungan dan doa.
- (4) Dr. Heri Hermansyah, ST., M.Eng, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan banyak sekali motivasi serta menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
- (5) Kakek, nenek, serta seluruh keluarga saya yang banyak memberikan doa dan dukungan;
- (6) PT INDOFOOD SUKSES MAKMUR, Tbk melalui PROGRAM INDOFOOD Riset Nugraha 2011 yang mensponsori penelitian yang akan saya lakukan;
- (7) Kawan-kawan satu bimbingan, yaitu Paramitha Kharistiananda, Sara Mutiara, Republik Daudi Parthu dan Edilberd Napitupulu.

(8) Indrianti Pramadewi, Mirza Akbar, Darul Hamdi, Dara Dienayati, Kak Ius Pratama dan semua rekan kerja di Laboratorium Bioproses yang telah menjadi rekan kerja yang sangat baik.

(9) Semua sahabat di Teknologi Bioproses 2008 yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

(10) Dr. Eng. Muhamad Sahlan, Prof. Anondho Wijanarko dan M. Ibadurrohman, M.Si.Eng sebagai dosen penguji yang telah memberikan banyak saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik dari sebelumnya.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 17 Januari 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASITUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Merisa Bestari Faiz
NPM : 0806340126
Program Studi : Teknologi Bioproses
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

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

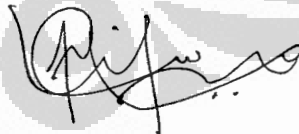
Sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) Melalui Selektif Interesterifikasi Etil Oleat Susu Sapi Dengan Tripalmitin Minyak Sawit Menggunakan Biokatalis

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok, Jawa Barat, Indonesia
Pada tanggal : 17 Januari 2012

Yang menyatakan



(Merisa Bestari Faiz)

ABSTRAK

Nama : Merisa Bestari Faiz

Program studi : Teknologi Bioproses

Judul : Sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) Melalui Selektif Interesterifikasi Etil Oleat Susu Sapi Dengan Tripalmitin Minyak Sawit Menggunakan Biokatalis

Air Susu Ibu (ASI) merupakan makanan sempurna untuk bayi karena mempunyai komposisi gizi paling lengkap dan ideal untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Namun, tak jarang terdapat kasus dimana ibu harus menggantikan ASI dengan susu formula. Bayi membutuhkan kombinasi distribusi posisi asam lemak yang tepat dalam trigliserida agar lemak tersebut dapat dicerna secara optimal. Sayangnya, distribusi asam lemak pada trigliserida susu formula dapat menyebabkan konstipasi jika didigesti di dalam tubuh bayi. Oleh karena itu, penelitian ini memberikan solusi atas permasalahan tersebut yaitu dengan mensintesis lemak yang memiliki trigliserida dengan distribusi posisi asam lemak mirip dengan distribusi posisi asam lemak pada ASI yang dikenal dengan *Human Milk Fat Substitute* (HMFS). HMFS disintesis melalui interesterifikasi dengan substrat etil oleat yang berasal dari susu sapi dengan tripalmitin yang merupakan turunan dari minyak sawit. Interesterifikasi ini dikatalis dengan lipase selektif sn-1,3. Untuk alasan teknis dan ekonomi, lipase diimobilisasi melalui metode entrapment pada karbon aktif. Enzim loading yang dihasilkan adalah 92,64%. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa yield HMFS yang diperoleh dari reaksi yang dikatalis oleh lipase terimobilisasi memiliki hubungan positif terhadap kenaikan temperatur dan waktu reaksi. Sedangkan, untuk HMFS yang dihasilkan oleh reaksi yang dikatalis oleh lipase bebas memiliki hubungan yang berkebalikan. Sementara itu, yield HMFS yang dihasilkan dari reaksi yang dikatalis oleh lipase terimobilisasi maupun lipase bebas, memiliki hubungan positif dengan kenaikan rasio mol substrat.

Kata Kunci : *Human Milk Fat Substitute*, interesterifikasi, etil oleat, tripalmitat, PPL

ABSTRACT

Name : Merisa Bestari Faiz

Study Program: Bioprocess Technology

Title : Synthesis Human Milk Fat Substitute (HMFS) by Selective Interesterification Ethyl Oleate Cow's Milk with Tripalmitate Palm Oil Using Biocatalyst

Breast milk is the perfect food for babies because they have the most complete nutritional composition and ideal for the growth and development. However, there are cases when mothers have to replace breast milk with formula. Babies need an exact combination of fatty acid distribution of the triglycerides in milk fat so can be digested optimally. Unfortunately, the distribution of fatty acids on the triglyceride milk formula can cause constipation if digested in babies' small intestines. Therefore, this study provides a solution to this problem. The solution is to synthesize triglycerides with fatty acids position distribution similar to the distribution of fatty acid in human milk, known as the Human Milk Fat Substitute (HMFS). HMFS synthesized through selective interesterification of ethyl oleate derived from cow's milk with tripalmitate from palm oil. This selective interesterification catalyzed by lipase sn-1, 3. For technical and economic reasons, lipase immobilized by entrapment method on activated carbon. The resulting enzyme loading was 92.64%. Based on this research, it is known that HMFS yield obtained from the reaction catalyzed by immobilized lipase has a positive relationship to the increase of temperature and reaction time. Meanwhile, for HMFS resulted by reaction catalyzed by free lipase had the negative relationship. Besides, HMFS yield resulted from reaction catalyzed by immobilized lipase and free lipase, have a positive relationship with increase in mole ratio of substrates.

Keyword : *Human Milk Fat Substitute*, interesterification, etil oleat, tripalmitate, PPL

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK.....	1
ABSTRACT.....	2
DAFTAR ISI.....	3
DAFTAR TABEL.....	6
DAFTAR GAMBAR.....	8
DAFTAR LAMPIRAN.....	11
BAB I	
PENDAHULUAN.....	12
1.1.Latar Belakang.....	12
1.2.Rumusan Masalah.....	14
1.3.Tujuan.....	14
1.4.Batasan Masalah.....	14
1.5.Manfaat Penelitian.....	15
BAB II	
TINJAUAN PUSTAKA.....	16
2.1.Komposisi Asam lemak dalam <i>Human Milk Fat</i> (HMF).....	16
2.2.Komposisi Asam Lemak dalam Susu Sapi.....	17
2.3.Komposisi Asam Lemak dalam Minyak Sawit.....	19

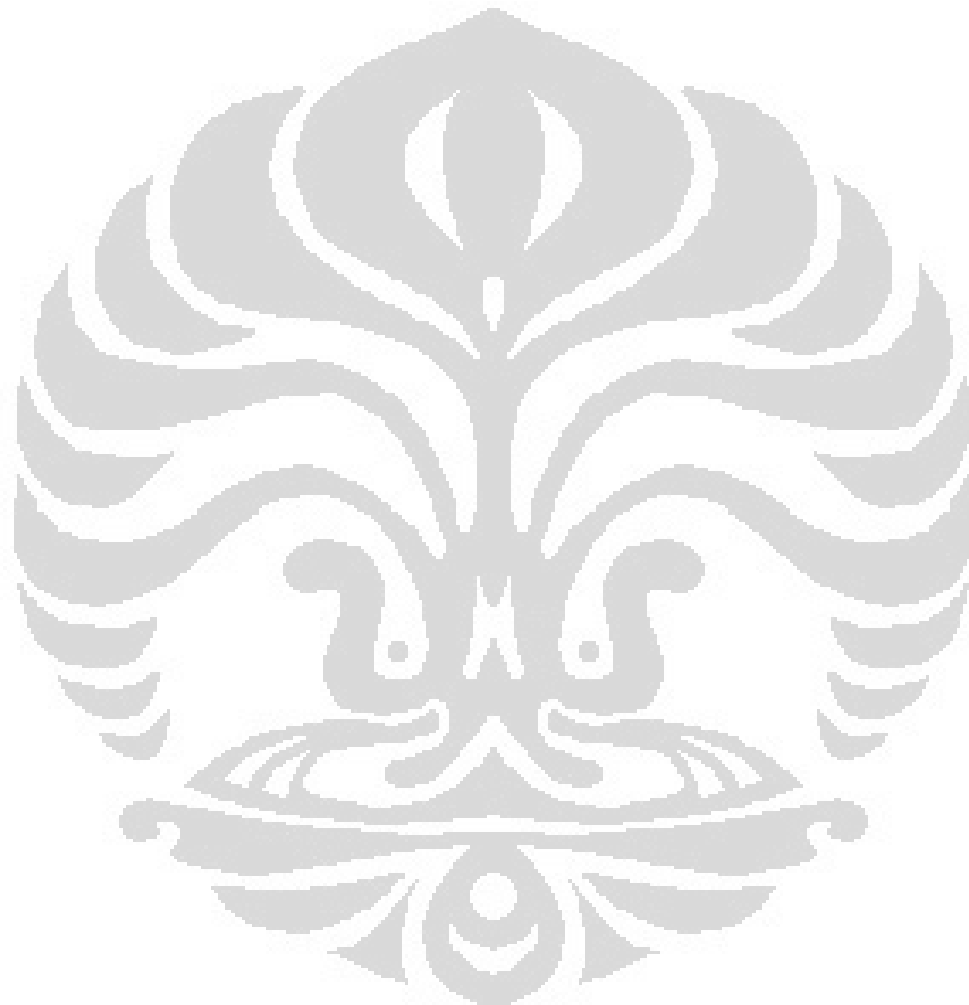
2.4.Preparasi Etil Oleat dari Asam Oleat	20
2.5.Preparasi Tripalmitin (PPP) dari <i>Palm Stearin</i>	21
2.6.Interesterifikasi.....	22
2.7.Lipase Regiospesifik	24
2.8. <i>Porcine Pancreatic Lipase</i> (PPL)	26
2.9. Oksidasi Asam Lemak	27
2.10.Imobilisasi Lipase	27
2.10.1.Adsorpsi	28
2.10.2. <i>Entrapment</i>	29
2.10.3. <i>Covalent Binding</i>	31
2.10.4. <i>Cross-linking</i>	33
2.11. <i>State of the Art</i>	34
BAB III	
METODOLOGI PENELITIAN	36
3.1.Model Penelitian	36
3.2.Mekanisme Reaksi	38
3.3.Variabel.....	40
3.4.Alat dan Bahan.....	40
3.5.Prosedur Penelitian.....	43
3.5.1.Skrining <i>Support</i> dan Metode Imobilisasi Lipase (Studi Literatur).....	43
3.5.2. <i>Entrapment</i> Lipase (Moreno-Pirajan and Giraldo, 2010)	46
3.5.3.Penentuan Enzim <i>Loading</i>	47
3.5.4.Sintesis <i>Human Milk Fat Substitute</i> (HMFS) melalui Interesterifikasi (Lee et al., 2010).....	49

3.5.5. Variasi	50
3.5.6. Analisis.....	51
BAB IV	
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	52
4.1. Hasil Kurva Kalibrasi Standar	52
4.2. Hasil <i>Entrapment</i> PPL dalam Karbon Aktif	53
4.3. Hasil Reaksi Interesterifikasi Enzimatis	55
4.3.1. Efek Variasi Waktu	56
4.3.2. Efek Rasio Mol Substrat	63
4.3.3. Efek Temperatur Reaksi.....	68
BAB V	
KESIMPULAN DAN SARAN.....	75
5.1 Kesimpulan	75
5.2. Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA	77

DAFTAR TABEL

Tabel 2- 1. Konsentrasi Asam Lemak dalam <i>Human Milk</i>	17
Tabel 2- 2. Konsentrasi Asam Lemak dalam Susu Sapi	18
Tabel 2- 3. Komposisi Asam Lemak dari Minyak Sawit Malaysia (Basiron, 2005) .	19
Tabel 2- 4. Komposisi Asam Lemak (%) (Basiron, 2005)	20
Tabel 2- 5. Lipase regiospesifik yang dan Sumbernya (Adamczak, 2004)	25
Tabel 2- 6. Lipase Spesifik Panjang Rantai Asam Lemak dan Sumbernya (Adamczak, 2004).....	25
Tabel 2- 7. <i>State of the Art</i>	35
Tabel 3- 1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian	40
Tabel 3- 2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian	42
Tabel 3- 3. Skrining <i>Support</i> dan Metode Imobilisasi Lipase	43
Tabel 3- 4. Bahan-bahan yang digunakan untuk Membuat Kurva Kalibrasi Standar	48
Tabel 4- 1. Hasil Absorbansi dari berbagai konsentrasi PPL.....	52
Tabel 4- 2. Pengaruh Variasi Waktu terhadap <i>Yield</i> OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free</i> PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Rasio Mol Substrat 1:6)	58
Tabel 4- 3. Pengaruh Variasi Waktu terhadap <i>Yield</i> OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized</i> PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Rasio Mol Substrat 1:6).....	61
Tabel 4- 4. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap <i>Yield</i> OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free</i> PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Waktu Reaksi 7,5 Jam).....	64
Tabel 4- 5. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap <i>Yield</i> OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized</i> PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Waktu Reaksi 7,5 Jam)	66

Tabel 4- 6. Pengaruh Temperatur terhadap <i>Yield</i> OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free</i> PPL sebagai Biokatalis (Waktu Reaksi 7,5 Jam; Rasio Mol 1:6)	70
Tabel 4- 7. Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap <i>Yield</i> OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized</i> PPL sebagai Biokatalis (Waktu Reaksi 7,5 Jam ; Rasio Mol Substrat 1:6)	72



DAFTAR GAMBAR

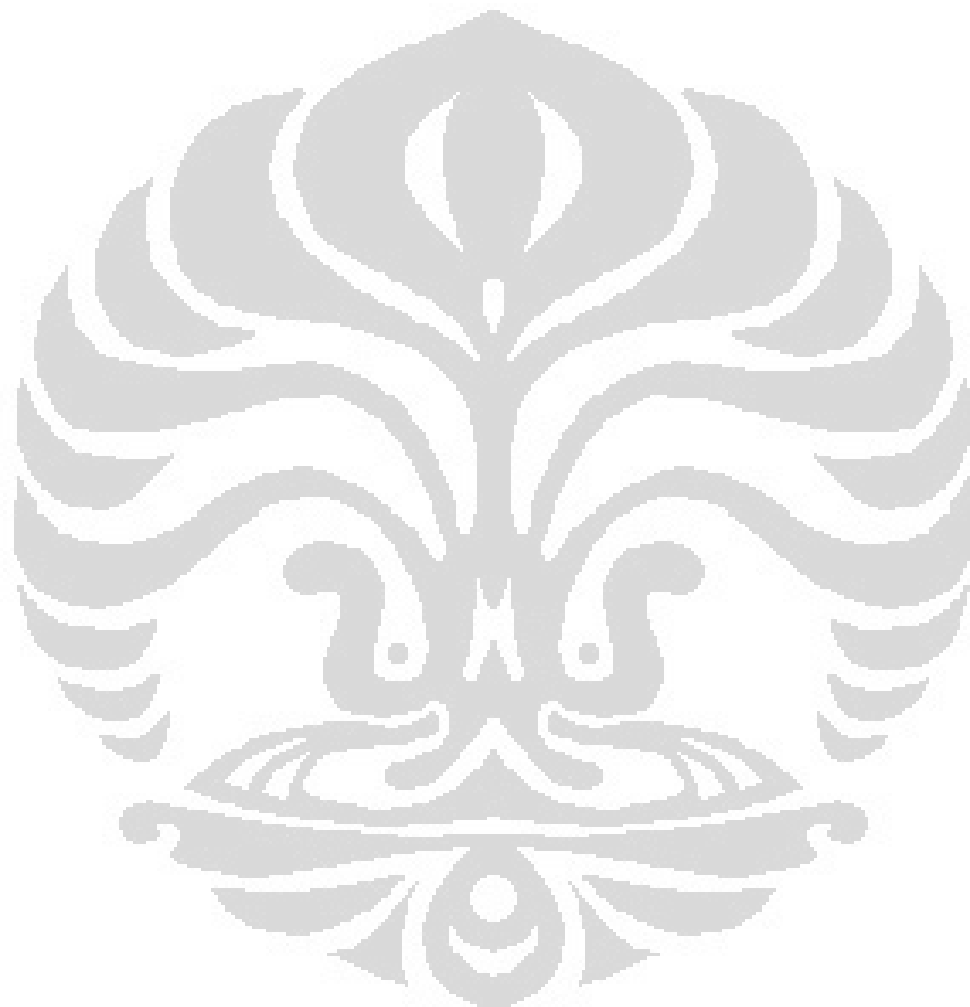
Gambar 2- 1. Struktur Trigliserida Dominan pada lemak ASI/ HMF	16
Gambar 2- 2. Preparasi Etil Oleat dari Asam Oleat	21
Gambar 2- 3. Preparasi Tripalmitin dari <i>Palm Stearin</i>	22
Gambar 2- 4. Interesterifikasi di dalam trigliserida (Shapero, 2005)	22
Gambar 2- 5. Interesterifikasi di antara trigliserida (Shapero, 2005)	22
Gambar 2- 6. Produk akhir interesterifikasi di antara trigliserida (Shapero, 2005)	23
Gambar 2- 7. Profil Penurunan Tingkat Aktivitas <i>Free PPL</i> Pada Temperatur 30 ⁰ C, 40 ⁰ C, 50 ⁰ C dan 60 ⁰ C Seiring Perubahan Waktu (Bagi, et al., 1997) ..	26
Gambar 2- 8. Mekanisme Reaksi Oksidasi pada Asam Lemak (Scrimgeour, 2005)..	27
Gambar 2- 9. Metode Imobilisasi Enzim dengan Metode Adsorpsi (Elnashar, 2009)	29
Gambar 2- 10. Imobilisasi Enzim dengan Metode Adsorpsi (Nunes and Marty, 2006)	29
Gambar 2- 11. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Entrapment</i> (Nunes and Marty, 2006).....	30
Gambar 2- 12. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Entrapment</i> (Elnashar, 2009)	30
Gambar 2- 13. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Microencapsulation (Membrane Entrapment)</i> (Elnashar, 2009)	31
Gambar 2- 14. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Covalent Binding</i> (Nunes and Marty, 2006)	33
Gambar 2- 15. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Covalent Binding</i> (Elnashar, 2009)	33
Gambar 2- 16. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Cross-linking</i> (Nunes and Marty, 2006).....	33
Gambar 2- 17. Metode Imobilisasi Enzim dengan <i>Cross-linking</i> (Elnashar, 2009) ...	34
Gambar 3- 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian.....	37
Gambar 3- 2. Mekanisme Reaksi Interesterifikasi dalam Mensintesis <i>Human Milk Fat Substitute</i> (HMFS)	39

Gambar 3- 3. Sintesis <i>Human Milk Fat Substitute</i> (HMFS)	50
Gambar 3- 4. Variasi yang Dilakukan dalam Penelitian.....	50
Gambar 4- 1. Kurva Kalibrasi Standar Konsentrasi <i>Porcine Pancreatic Lipase</i>	53
Gambar 4- 2. Sumber Asam Lemak Bebas dalam Sampel yang Terdeteksi saat Dilakukan Analisis HPLC	56
Gambar 4- 3. Sampel Sebelum dan Setelah Filtrasi dari Hasil Reaksi untuk Percobaan Variasi Waktu (F=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh <i>Free PPL</i> ; I= Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh <i>Immobilized PPL</i>)	57
Gambar 4- 4. Pengaruh Variasi Waktu terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free PPL</i> sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Rasio Mol Substrat 1:6).....	58
Gambar 4- 5. Pengaruh Variasi Waktu terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized PPL</i> sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Rasio Mol Substrat 1:6).....	61
Gambar 4- 6. Perbandingan Pengaruh Variasi Waktu terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free PPL</i> dan <i>Immobilized PPL</i> sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Rasio Mol Substrat 1:6)	62
Gambar 4- 7. Sampel Sebelum dan Setelah Filtrasi dari Hasil Reaksi untuk Percobaan Variasi Rasio Mol Substrat (F=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh <i>Free PPL</i> ; I= Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh <i>Immobilized PPL</i>)	63
Gambar 4- 8. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free PPL</i> sebagai Biokatalis (Temperatur 55 ⁰ C; Waktu Reaksi 7,5 Jam).....	65
Gambar 4- 9. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized PPL</i> sebagai Biokatalis (Temperatur : 55 ⁰ C; Waktu Reaksi : 7,5 Jam)	66
Gambar 4- 10. Perbandingan Pengaruh Variasi Rasio Mol Substrat terhadap <i>Yield</i> <i>OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized PPL</i> dan	

<i>Immobilized PPL</i> sebagai Biokatalis (Temperatur : 55 ⁰ C; Waktu Reaksi : 7,5 Jam)	67
Gambar 4- 11. Sampel Sebelum dan Setelah Filtrasi dari Hasil Reaksi untuk Percobaan Variasi Rasio Temperatur (F=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh <i>Free PPL</i> ; I= Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh <i>Immobilized PPL</i>)	68
Gambar 4- 12. Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Free PPL</i> sebagai Biokatalis.....	70
Gambar 4- 13. Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized PPL</i> sebagai Biokatalis (Waktu Reaksi 7,5 Jam ; Rasio Mol Substrat 1:6)	72
Gambar 4- 14. Kondisi Sampel Setelah Reaksi pada Nomor Reaksi A1 Immo (<i>Immobilized PPL</i> tercampur rata), A2 Immo (<i>Immobilized PPL</i> terkonsentrasi di satu tempat) dan A3 Immo (<i>Immobilized PPL</i> tercampur rata).....	73
Gambar 4- 15. Perbandingan Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap <i>Yield OPO</i> pada Reaksi Interesterifikasi dengan <i>Immobilized PPL</i> dan <i>Immobilized PPL</i> sebagai Biokatalis.....	73

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Gambar Proses Penelitian.....	83
Lampiran 2: Data Kromatogram Hasil Analisis HPLC	88



BAB I PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Air Susu Ibu (ASI) merupakan satu-satunya makanan terbaik untuk bayi hingga berumur enam bulan karena mempunyai komposisi gizi paling lengkap dan ideal untuk pertumbuhan dan perkembangan bayi yang dapat memenuhi kebutuhan gizinya selama enam bulan pertama (Aritonang, 2007). Oleh karena itu, pedoman internasional menganjurkan pemberian ASI eksklusif selama enam bulan pertama pada bayi. Namun, di kota-kota besar, khususnya pada kelompok ibu pekerja, mereka menggantikan pemberian ASI dengan susu formula untuk bayinya.

Lemak di dalam ASI (*Human Milk Fat/ HMF*) merupakan sumber energi terbesar. Triasilgliserol (TAG) dalam HMF memiliki struktur unik, 60-70% asam palmitat (16:0) berlokasi di posisi *sn-2* dan asam stearat (18:0), asam oleat (18:1) serta asam linoleat (18:2) berlokasi di posisi *sn-1,3* (Sørensen et al., 2009). Saat pencernaan, TAG terhidrolisis menjadi 2-monoasilgliserol (2-MAG) dan asam lemak bebas oleh lipase pankreatik di dalam usus. 2-MAG yang dihasilkan diabsorpsi oleh usus (Lee et al., 2010). Jika asam lemak bebas yang dilepaskan dari posisi *sn-1,3* berupa asam lemak jenuh (contohnya asam palmitat), akan terbentuk kompleks *insoluble soap* antara asam lemak jenuh dengan mineral, seperti kalsium dan magnesium, di dalam lumen (Sahin et al., 2005c). Apabila hal ini terjadi, *insoluble soap* akan terbuang melalui feses dan menjadikan feses keras yang dapat mengakibatkan konstipasi atau sembelit (Scott, 2009). Sayangnya, susu formula yang kini banyak digunakan sebagai pengganti ASI, banyak mengandung asam lemak jenuh pada posisi *sn-1,3* (Sahin et al., 2005c). Oleh karena itu, komposisi asam lemak dan distribusinya dalam triasilgliserol pada susu formula telah banyak mendapatkan perhatian (Sørensen et al., 2009). (Wang, et al., 2006)

Lokasi asam palmitat pada posisi *sn*-2 dalam ASI meningkatkan absorpsi asam palmitat (16:0) dan 18:0, 18:1 atau 18:2 dalam tubuh bayi, serta meminimalisasi kalsium yang terbuang melalui feses (Sahin et al., 2005c). *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) telah dikembangkan untuk menyerupai komposisi dan struktur triasilgliserol dalam HMF yang bersumber dari minyak kelapa sawit dan lemak babi atau dari tripalmitat dan campuran minyak nabati (Sørensen et al., 2009).

Lipase telah digunakan sebagai biokatalis dalam produksi produk turunan lemak spesifik termasuk juga HMFS dan produk-produk nutrisi penting lainnya melalui hidrolisis, esterifikasi dan interesterifikasi (Lee et al., 2010). Untuk mensintesis HMFS, diperlukan lipase yang selektif terhadap *sn*-1,3, yaitu *porcine pancreatic lipase* (PPL). PPL banyak dijual di pasaran, namun dengan harga tinggi. Untuk menurunkan biaya produksi HMFS, lipase harus dapat digunakan kembali dengan tanpa mengurangi produktivitasnya. Imobilisasi lipase merupakan pendekatan penting yang dapat digunakan sebagai metode untuk meningkatkan optimasi stabilitas operasi, aktivitas dan selektivitas yang mendukung lipase untuk beroperasi pada kondisi lingkungan yang keras dan juga menyediakan pemisahannya dari reaksi campuran tanpa filtrasi dalam reaktor *packed bed* (Ghaly et al., 2010). Di sisi lain, penggunaan lipase dalam bentuk terimobilisasi sangat diperlukan mengingat reaksi interesterifikasi yang dilakukan pada penelitian ini harus berlangsung pada kondisi di atas temperatur optimal lipase yang digunakan.

Saat ini penelitian mengenai sintesis HMFS dengan melibatkan metode imobilisasi lipase sebagai variabel belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan skrining metode imobilisasi lipase dengan enzim *loading* dan *yield* HMFS sebagai parameternya. Lipase terimobilisasi dari metode terpilih akan diuji aktifitasnya melalui selektif interesterifikasi dengan substrat etil oleat yang berasal dari susu sapi dan tripalmitin yang merupakan turunan minyak sawit untuk mensintesis HMFS. Untuk mengetahui pengaruh penggunaan lipase terimobilisasi terhadap *yield* HMFS yang dihasilkan, maka pada penelitian ini juga dilakukan reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh lipase dalam bentuk bebas.

Selain itu, pada penelitian ini juga akan diselidiki pengaruh berbagai parameter reaksi (waktu, temperature dan rasio mol substrat) terhadap *yield* HMFS yang dihasilkan.

1.2.Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

- 1) Manakah jenis *support* dan metode imobilisasi lipase yang unggul?
- 2) Bagaimana pengaruh variasi temperatur, waktu reaksi dan variasi mol substrat terhadap reaksi interesterifikasi untuk mensintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS)?
- 3) Bagaimana pengaruh penggunaan lipase terimobilisasi dalam reaksi interesterifikasi terhadap *yield* HMFS jika dibandingkan dengan *yield* HMFS yang disintesis melalui reaksi interesterifikasi yang menggunakan lipase dalam bentuk bebas?

1.3.Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah

- 1) Menentukan jenis *support* dan metode imobilisasi lipase yang unggul.
- 2) Menyelidiki hubungan temperatur, waktu serta rasio mol substrat terhadap *yield Human Milk Fat Substitute* (HMFS) yang dihasilkan.
- 3) Membandingkan *yield* OPO yang dihasilkan dari reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh lipase dalam bentuk bebas (*free lipase*) dengan lipase dalam bentuk terimobilisasi (*immobilized lipase*).

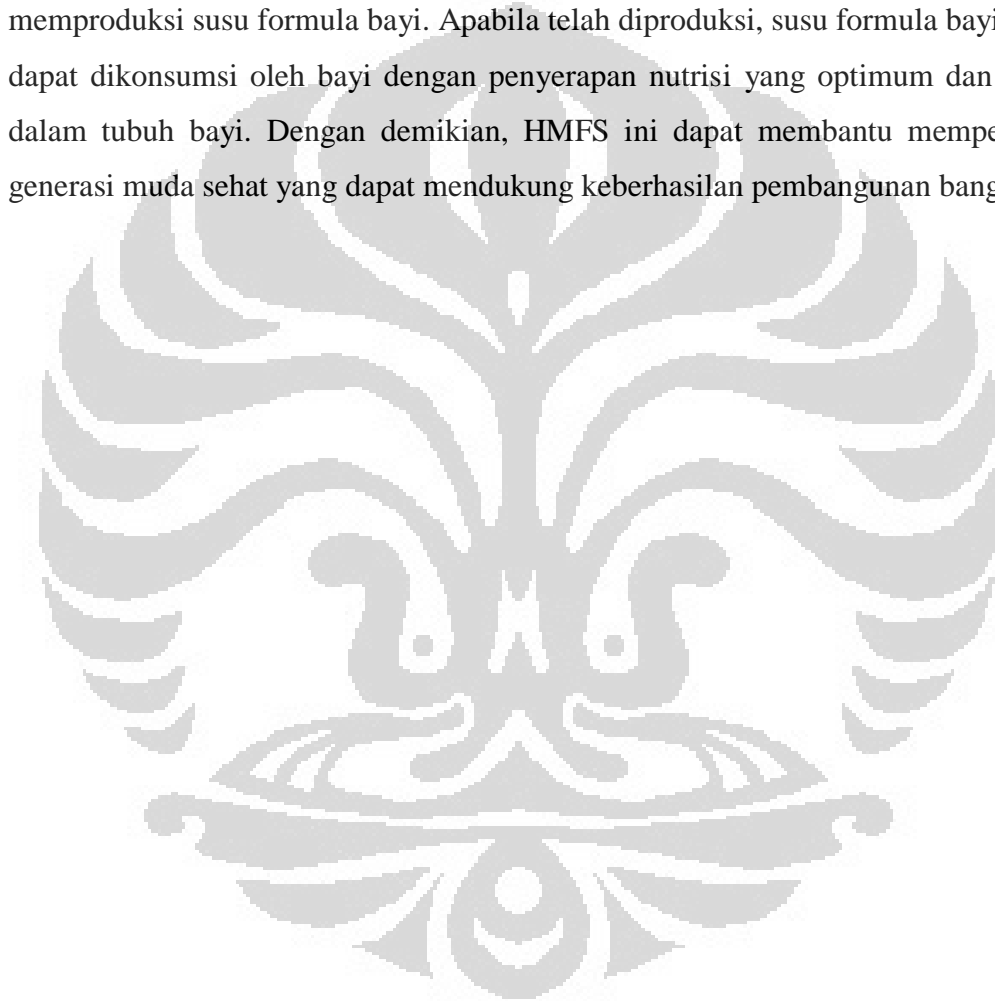
1.4.Batasan Masalah

Dalam penelitian ini, masalah yang akan dibahas terbatas pada beberapa aspek berikut :

- 1) *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) yang diinginkan adalah berupa trigliserida 1,3-dioley-2-palmitoylglycerol (OPO).
- 2) Lipase yang digunakan adalah lipase selektif *sn*-1,3 yang berasal dari *porcine pancreas*.
- 3) Etil oleat dan tripalmitin dibeli dari Sigma Chemical Co.

1.5. Manfaat Penelitian

Keluaran dari penelitian ini adalah berupa lemak yang kaya akan triasilgliserol dengan distribusi susunan asam lemak yang mirip dengan triasilgliserol pada *Human Milk Fat* (HMF) atau lemak Air Susu Ibu (ASI). Lemak ini dikenal dengan nama *Human Milk Fat Substitute* (HMFS). HMFS ini dapat dimanfaatkan oleh kalangan industri, khususnya industri pangan, sebagai salah satu komponen dalam memproduksi susu formula bayi. Apabila telah diproduksi, susu formula bayi tersebut dapat dikonsumsi oleh bayi dengan penyerapan nutrisi yang optimum dan aman di dalam tubuh bayi. Dengan demikian, HMFS ini dapat membantu mempersiapkan generasi muda sehat yang dapat mendukung keberhasilan pembangunan bangsa.

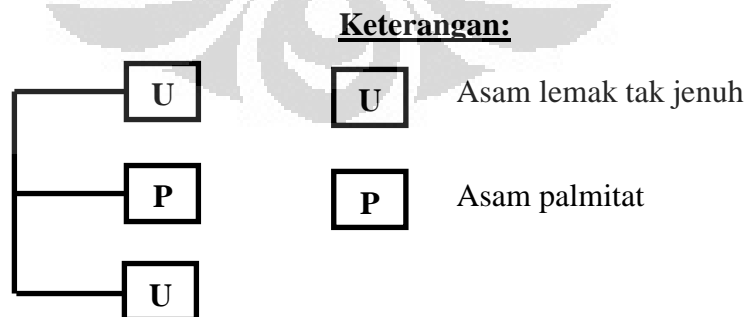


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Komposisi Asam lemak dalam *Human Milk Fat* (HMF)

Sistem lipid dalam lemak Air Susu Ibu (ASI)/ HMF tersusun untuk dapat memfasilitasi digesti dan absorpsi lemak dengan baik. Sistem lipid terdiri dari *milk fat globule*, asam lemak jenuh dan asam lemak jenuh tak jenuh (Tabel 2-1). Proporsi terbesar asam lemak jenuh adalah asam palmitat. Sedangkan untuk asam lemak tak jenuh, proporsi terbesarnya adalah asam oleat.

Meskipun terdapat variasi kecil dalam komposisi asam lemak pada ASI yang disebabkan oleh beberapa faktor seperti genetik, makanan ibu, musim, tahap laktasi, fisiologi dan bahkan psikologi, seluruh ASI dikarakterisasi oleh dominasi dari triasilgliserol (TAG > 98% HMF), asam palmitat (C16:0, 20-30% dari total asam lemak) yang ada pada posisi *sn*-2 (70% dari seluruh asam palmitat) dari *backbone* gliserol dan posisi *sn*-1 dan *sn*-3 ditempati oleh asam lemak tak jenuh (Gambar 2-1). Asam oleat sebagian besar hadir (44%) pada posisi *sn*-1 dari TAG ASI, diikuti oleh asam palmitat (18,7%) dan asam stearat (14,2%). Posisi *sn*-2 ditempati sebagian besar oleh asam palmitat (57,1%), asam miristat (15,4%) dan asam oleat (8,1%). Pada posisi *sn*-3, asam lemak yang dominan adalah asam oleat (50,5%), diikuti oleh asam linoleat (12,7%) dan asam laurat (10,4%). (Sahin et al., 2005b)



Gambar 2- 1. Struktur Triglicerida Dominan pada lemak ASI/ HMF

Tabel 2- 1. Konsentrasi Asam Lemak dalam *Human Milk*

Asam Lemak Jenuh		Konsentrasi (mg/100 ml susu)
Butirat	4:0	0
Caporat	6:0	0
Caprylat	8:0	<i>Trace</i>
Caproat	10:0	54
Laurat	12:0	213
Myristat	14:0	290
Palmitat	16:0	1051
Stearat	18:0	393
Lainnya		<i>Trace</i>
Jumlah asam lemak jenuh		2001
Asam Lemak Tak Jenuh		Konsentrasi (mg/100 ml susu)
Myristoleat	14:1	<i>Trace</i>
Palmitoleat	16:1	160
Oleat	18:1	1408
Lainnya		44
Jumlah <i>mono-unsaturated</i>		1612
Linoleat	18:2	285
Linolenat	18:3	32
Arachidonat	20:4	<i>Trace</i>
Lainnya		<i>Trace</i>
Jumlah <i>poly-unsaturated</i>		317

2.2. Komposisi Asam Lemak dalam Susu Sapi

Dilihat dari kejenuhannya, asam lemak dalam susu sapi terdiri dari 63,3% asam lemak jenuh, 33,8% asam lemak *mono-unsaturated*, dan 2,9% asam lemak *polunsaturated*. Sementara itu, proporsi asam lemak terbesar dalam lemak susu sapi adalah asam oleat (Tabel 2-2).

Tabel 2-2. Konsentrasi Asam Lemak dalam Susu Sapi

Asam Lemak		Konsentrasi (mg/100 ml susu)
Butirat	4:0	188
Caporat	6:0	74
Caprylat	8:0	44
Caproat	10:0	103
Laurat	12:0	129
Myristat	14:0	413
Palmitat	16:0	959
Stearat	18:0	413
Lainnya		77
Jumlah asam lemak jenuh		2330
Asam Lemak		Konsentrasi (mg/100 ml susu)
Myristoleat	14:1	52
Palmitoleat	16:1	100
Oleat	18:1	1026
Lainnya		66
Jumlah mono-unsaturated		1244
Linoleat	18:2	52
Linolenat	18:3	55
Arachidonat	20:4	<i>Trace</i>
Lainnya		<i>Trace</i>
Jumlah poly-unsaturated		107

2.3. Komposisi Asam Lemak dalam Minyak Sawit

Minyak sawit terdiri dari trigliserida sebagai komponen terbesar, serta monogliserida dan digliserida dalam jumlah kecil. Terdapat berbagai variasi struktur dan jumlah karbon dari rantai asam lemak yang ada dalam trigliserida minyak sawit. Panjang asam lemak yang ada dalam trigliserida bervariasi antara 12 hingga 20 karbon seperti ditunjukkan pada Tabel 2-3 (Basiron, 2005). Asam lemak 16:0 (asam palmitat) merupakan asam lemak dengan komposisi terbesar pada minyak sawit.

Tabel 2-3. Komposisi Asam Lemak dari Minyak Sawit Malaysia (Basiron, 2005)

Asam Lemak		Komposisi (%)	
		Rata-rata	Range
Laurat	12:0	0,23	0,1-1,0
Myristat	14:0	1,09	0,9-1,5
Palmitat	16:0	44,02	41,8-46,8
Palmitoleat	16:1	0,12	0,1-0,3
Stearat	18:0	4,54	4,2-5,1
Oleat	18:1	39,15	37,3-40,8
Linoleat	18:2	10,12	9,1-11,0
Linolenat	18:3	0,37	0-0,6
Eicosanoat	20:0	0,38	0,2-0,7

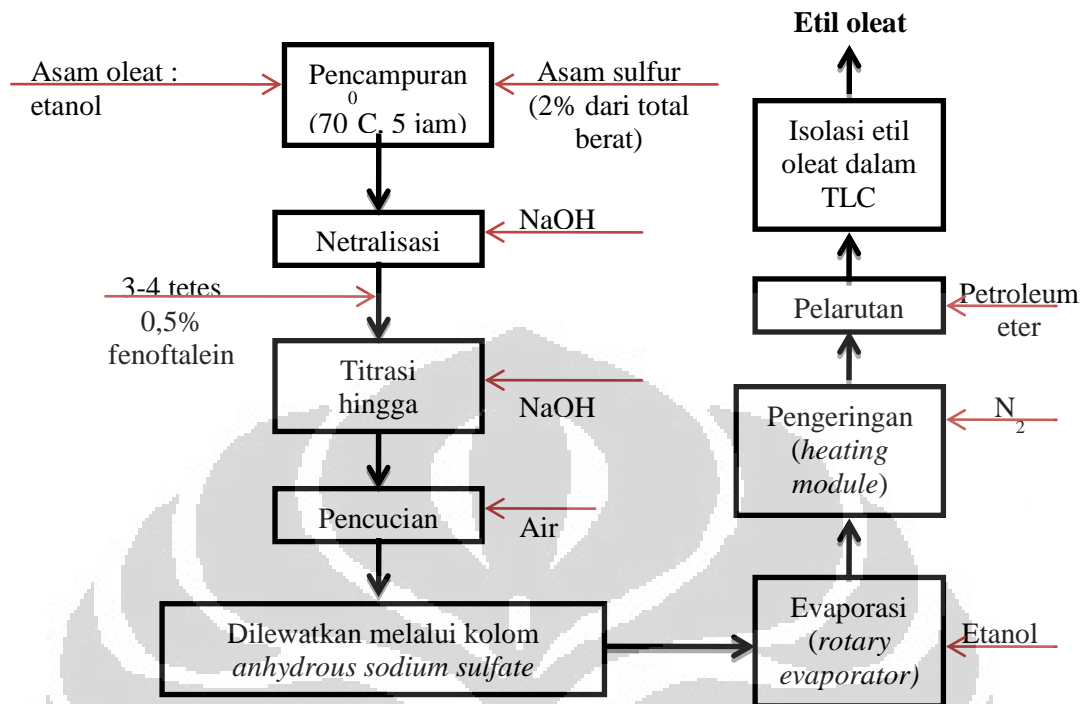
Minyak sawit dapat dipisahkan pada kondisi termal terkontrol menjadi dua komponen, yaitu fraksi padat (stearin) dan cair (olein). Tabel 2-4 menunjukkan komposisi asam lemak pada stearin dan olein. (Basiron, 2005). Pada Tabel 2-4, dapat diketahui bahwa asam palmitat lebih banyak terkandung pada stearin dibandingkan pada olein.

Tabel 2-4. Komposisi Asam Lemak (%) (Basiron, 2005)

Asam Lemak	Olein (%)	Rata-rata (%)	Stearin (%)
12:0	0,1-0,5	0,2	0,1-0,6
14:0	0,9-1,4	1,0	1,1-1,9
16:0	37,9-41,7	39,8	47,2-73,8
16:1	0,1-0,4	0,2	0,05-0,2
18:0	4,0-4,8	4,4	4,4-5,6
18:1	40,7-43,9	42,5	15,6-37,0
18:2	10,4-13,4	11,2	3,2-9,8
18:3	0,1-0,6	0,4	0,1-0,6
20:0	0,2-0,5	0,4	0,1-0,6
<i>Iodine value (Wijs)</i>	56,1-60,6	58,0	21,6-49,4

2.4.Preparasi Etil Oleat dari Asam Oleat

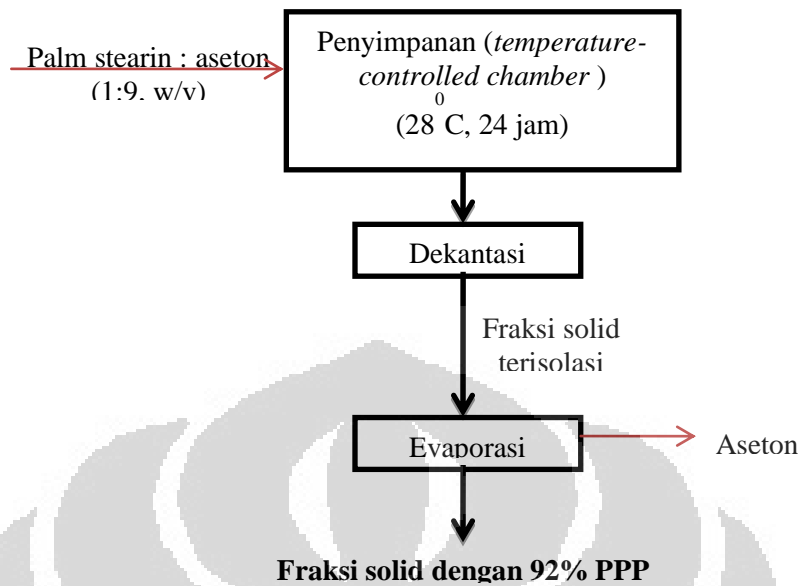
Etil oleat dapat dipreparasi dari asam oleat dengan cara sebagai berikut. Asam oleat dan etanol dicampurkan dengan rasio 1:4 pada 70⁰C selama lima jam dengan kehadiran asam sulfur (2% dari total berat campuran) sebagai katalis. Setelah netralisasi dengan sodium hidroksida, ditambahkan 3-4 tetes larutan 0,5% fenoftalein. Asam oleat yang tidak bereaksi dihilangkan dengan titrasi 50% NaOH hingga timbul warna merah muda. Larutan kemudian dicuci dengan air, dan dilewatkan melalui kolom anhydrous sodium sulfat. Etanol dievaporasi di dalam *rotary evaporator* pada kondisi vakum, dan dikeringkan dengan nitrogen dalam *heating module* (60⁰C). Untuk mengecek sintesis etil oleat, produk tersebut dilarutkan di dalam petroleum eter, dan diisolasi dengan thin-layer chromatography (TLC, silica gel 60 F₂₅₄, 10 cm x 10 cm) dengan petroleum eter/ dietil eter/ asam asetat (90/10/1, v/v/v) sebagai *developingsolvent*. Ilustrasi prosedur preparasi etil oleat dari asam oleat dapat dilihat pada Gambar 2-2. (Lee et al., 2010)



Gambar 2-2. Preparasi Etil Oleat dari Asam Oleat

2.5. Preparasi Tripalmitin (PPP) dari *Palm Stearin*

Palm stearin dicampurkan dengan aseton (1:9, w/v), dan ditempatkan pada *temperature-controlled chamber* pada 28⁰C selama 24 jam. Fraksi solid diisolasi dengan mendekantasi fraksi liquid, dan setelah evaporasi aseton dalam fraksi solid, diperoleh fraksi yang banyak mengandung PPP (92% PPP). Titik leleh fraksi yang banyak mengandung PPP adalah 64,5⁰C. Preparasi Tripalmitin dari *palm stearin* diilustrasikan pada Gambar 2-3. (Lee et al., 2010)



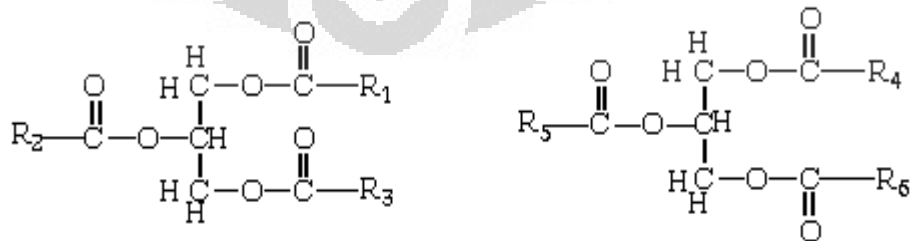
Gambar 2-3. Preparasi Tripalmitin dari *Palm Stearin*

2.6. Interesterifikasi

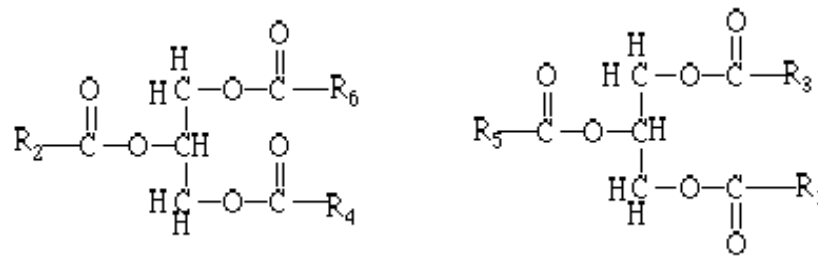
Interesterifikasi digunakan untuk memodifikasi sifat fisik campuran minyak atau minyak atau lemak dengan menyusun ulang gugus asam lemak di dalam dan diantara trigliserida yang berbeda. Mekanisme interesterifikasi dapat dilihat pada gambar berikut (Shapero, 2005).



Gambar 2-4. Interesterifikasi di dalam trigliserida (Shapero, 2005)



Gambar 2-5. Interesterifikasi di antara trigliserida (Shapero, 2005)



Gambar 2-6. Produk akhir interesterifikasi di antara trigliserida (Shapero, 2005)

Berdasarkan katalis yang digunakan, terdapat dua jenis interesterifikasi, yaitu (Shapero, 2005)

1) Interesterifikasi Kimia

Interesterifikasi kimia berlangsung dengan katalis kimia, termasuk alkali metal seperti sodium dan potassium beserta campurannya, juga alkoxida seperti sodium methyate atau sodium ethoxide (CH₃ONa) (Shapero, 2005). Namun, interesterifikasi dengan katalis kimia, dimana biasanya digunakan sodium methoxide sebagai katalisnya memiliki beberapa kelemahan, yaitu

- Terlalu basa
- Terlalu reaktif
- Dapat mengkatalis reaksi samping yang tidak diinginkan, seperti degradasi tokoferol, pembentukan ester tokoferol, pembentukan di-alkilketon dan pembentukan ester phytosterol.

2) Interesterifikasi Enzimatis

Interesterifikasi enzimatis merupakan metode interesterifikasi yang menggunakan enzim, biasanya lipase, untuk mengkatalis reaksinya (Shapero, 2005). Terdapat beberapa kelebihan interesterifikasi enzimatis, yaitu

- Tidak melibatkan sodium methoxide (sangat *flammable* dan rekatif)
- Tidak menghasilkan limbah cair atau limbah padat
- Mengurangi kehilangan minyak

- Nutrien lebih terlindungi
- Lebih ramah lingkungan

Namun, interesterifikasi enzimatis juga memiliki beberapa kekurangan, seperti tingginya harga enzim dan biaya operasi.

Dalam interesterifikasi triasilgliserol, untuk meningkatkan kualitas produknya, dilakukan beberapa modifikasi, seperti penggunaan lipase selektif. Penggunaan lipase selektif ini dapat menghasilkan triasilgliserol murni dan membuatnya memiliki kelebihan dibandingkan katalis kimia, yang memiliki campuran produk triasilgliserol (Adamczak, 2004).

2.7.Lipase Regiospesifik

Lipase merupakan enzim yang menghidrolisis lipid. Lipase disintesis oleh tanaman, hewan, dan mikroorganisme. Berdasarkan sumbernya (bakteri, fungi, tanaman atau hewan), lipase memiliki karakteristik yang beragam seperti spesifitas posisi, enantioselektifitas, toleran terhadap temperatur dan tergantung terhadap pH. (Illanes, 2008)

Berdasarkan spesifitas substrat, lipase dibagi menjadi tiga kategori, yaitu : non-spesifik, regiospesifik dan spesifik asam lemak. Lipase dalam kategori pertama mengkatalis secara sempurna pemecahan triasilgliserol menjadi gliserol dan asam lemak bebas bersama dengan diasilgliserol dan monoasilgliserol sebagai intermediet di dalam reaksi. Intermediet ini tidak terakumulasi karena intermediet tersebut terhidrolisis secara cepat dibandingkan triasilgliserol. Lipase regiospesifik asam lemak dari ikatan ester primer pada posisi 1 dan 3 asilgliserol. Lipase ini menghidrolisis triasilgliserol untuk menghasilkan asam lemak bebas 1,2 (atau 2,3)-diasilgliserol dan 2-monoasilgliserol. Tabel 2-5 menunjukkan contoh lipase regiospesifik dan sumbernya yang digunakan dalam sintesis triasilgliserol. Sementara itu, untuk kategori spesifik asam lemak, beberapa lipase dari kategori ini lebih menyukai untuk menghidrolisis triasilgliserol yang terdiri dari asam lemak rantai panjang. Namun, lipase kategori ini juga dapat ditemukan juga dalam hidrolisis asam lemak rantai medium dan pendek. (Illanes, 2008)

Tabel 2-5. Lipase regiospesifik yang dan Sumbernya (Adamczak, 2004)

Lipase	Regiospesifik	Referensi
<i>Rhizopus delemar</i>	1,3>>2	(Shimada <i>et al.</i> , 1997a)
<i>Rhizopus miehei</i>	1>3>>2	(Chandler, et al., 1998)
<i>Porcine pancreas</i>	1,3	(Berger & Schneider, 1991)
<i>Humicola lanuginosa</i>	1,3>>2	(Berger & Schneider, 1991)
<i>Pseudomonas sp.</i>	1,3>2	(Shimada <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Candida rugosa</i>	Non-selektif	(Benjamin & Pandey, 1998)
<i>Penicillium cambertii</i>	2	(Watanabe, et al., 2002)
<i>Candida antarctica</i>	2	(Irimescu, et al., 2001)

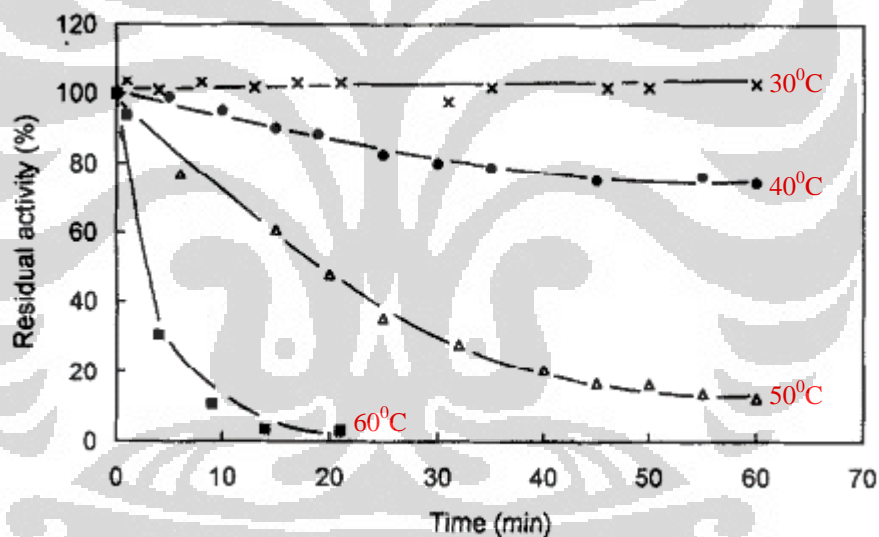
Kemampuan selektifitas lipase terhadap panjang rantai asam lemak juga berbeda-beda, seperti ditunjukkan pada Tabel 2-6.

Tabel 2-6. Lipase Spesifik Panjang Rantai Asam Lemak dan Sumbernya (Adamczak, 2004)

Lipase	Panjang Rantai Asam Lemak Spesifik	Referensi
<i>Rhizopus delemar</i>	M,L>>S	(Shimada <i>et al.</i> , 1997a)
<i>Rhizopus miehei</i>	S>M,L	(Chandler, et al., 1998)
<i>Porcine pancreas</i>	S>M,L	(Berger & Schneider, 1991)
<i>Humicola lanuginosa</i>	S,M,L	(Berger & Schneider, 1991)
<i>Pseudomonas sp.</i>	S,M,L	(Shimada <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Candida rugosa</i>	Non-selektif	(Benjamin & Pandey, 1998)
<i>Penicillium cambertii</i>	Non-selektif	(Watanabe, et al., 2002)
<i>Candida antarctica</i>	M,L>S	(Irimescu, et al., 2001)

2.8. Porcine Pancreatic Lipase (PPL)

Pancreatic lipase sangat sensitif terhadap panas dan secara cepat kehilangan aktivitas lipolitiknya pada temperatur 45⁰C. Pada 65⁰C aktivitas lipolitik secara keseluruhan hilang dalam 10 menit (McGillivray, 1930). Fakta ini diperkuat oleh Bagi, et al., pada tahun 1997 dengan melakukan penelitian mengenai profil inaktivasi *free* PPL. Pada penelitian tersebut, *free* PPL diaplikasikan sebagai biokatalis dalam reaksi hidrolisis minyak zaitun. Grafik hasil penelitian tersebut ditunjukkan pada Gambar 4-4. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada temperatur 30⁰C, aktivitas *free* PPL tidak dipengaruhi oleh waktu. Sementara itu, pada temperatur 40⁰C, 50⁰C dan 60⁰C, *free* PPL mengalami penurunan aktivitas yang disebabkan karena adanya inaktivasi enzim.



Gambar 2- 7. Profil Penurunan Tingkat Aktivitas *Free* PPL Pada Temperatur 30⁰C, 40⁰C, 50⁰C dan 60⁰C Seiring Perubahan Waktu (Bagi, et al., 1997)

Berdasarkan gambar tersebut terlihat bahwa pada temperatur 40⁰C, *free* PPL mengalami penurunan persentase aktivitas residu hingga 20%. Pada temperatur 50⁰C, hingga menit ke-30, *free* PPL mengalami penurunan aktivitas secara drastis hingga 70%. Sementara itu, pada temperatur 60⁰C, hingga menit ke-10, *free* PPL mengalami penurunan aktivitas secara drastis hingga 90%. Profil penurunan tingkat aktivitas *free* PPL dapat dilihat pada gambar berikut.

2.9. Oksidasi Asam Lemak

Rantai alkil asam lemak mudah terkena oksidasi pada ikatan rangkap dan karbon allylik. Baik autooksidasi dan fotooksidasi menghasilkan hidroperoksida allylic dari pusat ketidakjenuhan.



Gambar 2- 8. Mekanisme Reaksi Oksidasi pada Asam Lemak (Scrimgeour, 2005)

Selama proses ini, posisi dan geometri ikatan rangkap dapat berubah. Campuran hidroperoksida dihasilkan oleh autooksidasi dan fotooksidasi tidak sama, yang mengindikasikan bahwa terjadi mekanisme yang berbeda.

2.10. Imobilisasi Lipase

Untuk alasan teknis dan ekonomi, kebanyakan proses kimia yang dikatalis oleh enzim membutuhkan penggunaan biokatalis yang dapat digunakan ulang (*reuse*) atau dapat digunakan secara kontinyu dalam waktu yang panjang. Dalam konteks ini, imobilisasi enzim dapat didefinisikan sebagai metode yang mengizinkan biokatalis untuk dapat di-*reuse* ataupun digunakan secara kontinyu. Imobilisasi enzim merupakan pendekatan yang relevan untuk stabilisasi dan *recovery* enzim. (Illanes, 2008).

Pada subbab ini akan dibahas mengenai imobilisasi yang terfokus hanya pada lipase. Terdapat beberapa metode imobilisasi lipase dengan berbagai jenis *support*. Metode imobilisasi diklasifikasikan menjadi empat kategori, yaitu adsorpsi, *entrapment*, *covalent binding*, dan *cross-linking*. Dalam mempertimbangkan sisi keekonomisan, aktifitas dan stabilitas operasi biokatalis merupakan hal yang penting. *Yield* aktifitas enzim yang telah mengalami imobilisasi tidak hanya tergantung pada kehilangan yang disebabkan oleh prosedur imobilisasi namun juga dapat berkurang karena efek transfer massa. Di sisi lain, peningkatan stabilitas di bawah kondisi proses dapat mengimbangi kekurangan tersebut. Keseluruhan hal tersebut merupakan parameter dari pengukuran produktifitas sistem lipase terimobilisasi (Knežević et al., 2004).

2.10.1. Adsorpsi

Imobilisasi oleh adsorpsi merupakan metode yang termudah dan murah untuk mempersiapkan biokatalisis *solid-support*. Metode ini berdasarkan adsorpsi fisik atau ikatan ionik lipase, atau keduanya, terhadap permukaan *support*. Ikatan yang lemah antara enzim dan *support* (biasanya van der Waals, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik) memberikan efek yang kecil terhadap aktivitas katalitik. Regenerasi biokatalis terimobilisasi sangat mungkin dilakukan. Namun, karena ikatan terlalu lemah, enzim dapat dengan mudah terdesorpsi dari *carrier*. Metode adsorpsi harus dihindari jika enzim tidak toleran di dalam produk. (Knežević et al., 2004).

Imobilisasi lipase dengan adsorpsi non-kovalen sangat berguna di dalam sistem non-*aqueous*, dimana desorpsi dapat diabaikan karena rendahnya solubilitas lipase di dalam solven organik. Karena alasan tersebut dan kesederhanaan prosedur adsorpsi, penggunaan lipase teradsorpsi telah banyak digunakan untuk katalisis dalam *water-immiscible solvent* pada skala industri. (Knežević et al., 2004)

Sejumlah *carrier* natural ataupun sintetik dengan bentuk/ ukuran yang berbeda, struktur pori/ non-pori, perbedaan aquafilisitas dan kapasitas ikatan telah digunakan untuk imobilisasi lipase. Beberapa diantara *support* tersebut yang telah diteliti yaitu alumina, silika, polietilena, polistirena, poliakrilat nilon, dan lainnya. (Knežević et al., 2004)

Proses adsorpsi terdiri dari dua tahap utama, yaitu: difusi enzim dari sejumlah besar larutan kepada permukaan *support* dan pengikatan enzim pada tempat adsorpsi pada permukaan *carrier*. Laju ikat lipase terhadap permukaan jauh lebih besar dibandingkan laju difusi dan karena itu proses adsorpsi seringkali dikontrol dengan difusi. Namun, dalam beberapa *support* non-pori seperti zeolit tipe Y, proses adsorpsi dikontrol dengan kinetika permukaan. (Knežević et al., 2004)

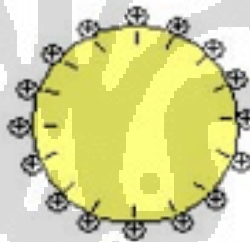
Tujuan utama prosedur imobilisasi adalah untuk mencapai *yield* yang tinggi dari aktifitas enzim terimobilisasi. Tidak terdapat aturan untuk memprediksi aktifitas dan stabilitas enzim terimobilisasi selama adsorpsi. Aktifitas lipase teradsorpsi dapat bervariasi dari nol hingga nilai yang tinggi. Sifat alami *carrier* (seperti ukuran pori,

keseimbangan hidrofilik/ hidrofobik, permukaan kimia) sangat mempengaruhi karakteristik katalitik lipase (seperti aktifitas, selektifitas dan stabilitas). Keseimbangan hidrofobik/ hidrofilik material *support* merupakan faktor terpenting karena material *support* mempengaruhi kandungan air dalam lingkungan mikro dari enzim dan perbandingan substrat dan/ atau produk dalam reaksi campuran. Aktifitas lipase pada umumnya lebih tinggi dengan *support* hidrofobik. (Knežević et al., 2004)

Ilustrasi enzim yang diimobilisasi dengan metode adsorpsi dapat dilihat pada Gambar 2-7 dan Gambar 2-8.



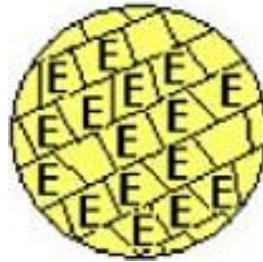
Gambar 2-9. Metode Imobilisasi Enzim dengan Metode Adsorpsi (Elnashar, 2009)



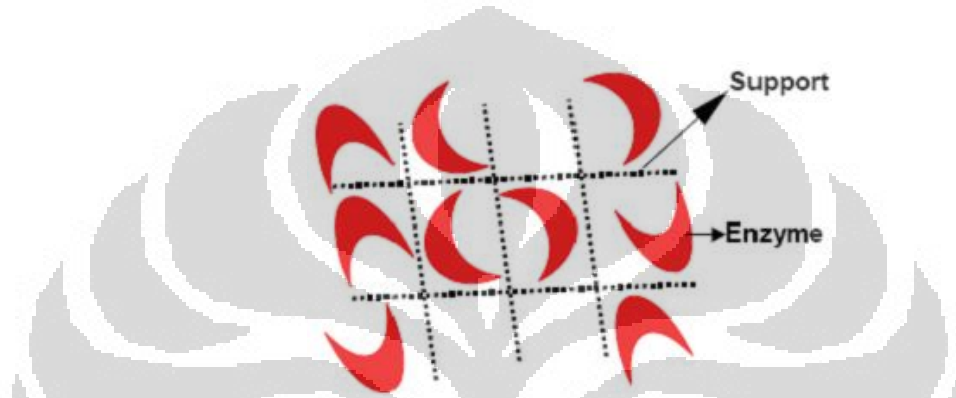
Gambar 2-10. Imobilisasi Enzim dengan Metode Adsorpsi (Nunes and Marty, 2006)

2.10.2. Entrapment

Imobilisasi lipase dengan metode *entrapment* adalah berdasarkan porositas yang rendah dari matriks yang pada waktu yang bersamaan menahan enzim di dalam *carrier* dan menyediakan difusi substrat/ atau produk (Gambar 2-9 dan Gambar 2-10). Polimer alami dapat digunakan sebagai material *carrier* untuk imobilisasi lipase seperti alginate yang ter-*cross-linked* dengan rantai linear ion Ca^{2+} , gelatin, carrageenan dan agarose, kitin dan kitosan, memiliki kelebihan yaitu bersifat non-toksik, biokompatibel dan biodegradabel. Namun permasalahan difusi dan kebocoran sangat jelas dalam sistem *gel entrapped*.



Gambar 2-11. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Entrapment*(Nunes and Marty, 2006)



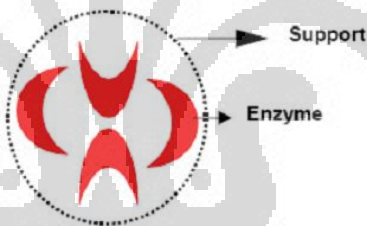
Gambar 2-12. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Entrapment*(Elnashar, 2009)

Pembatasan aktifitas difusi dari lipase terimobilisasi dapat diminimalisir dengan memperkecil ukuran partikel terimobilisasi, meningkatkan pergerakan atau laju alir, meningkatkan porositas dan mengoptimasi distribusi lipase di dalam bead. Diameter merupakan parameter terpenting dari bead hidrogel ketika digunakan sebagai *carrier* biokatalis. Bead alginate dihasilkan dengan metode *dropping*, yang terdiri dari pembentukan droplet oleh pemompaan larutan lipase alginate melalui dorongan dan solidifikasi droplet dalam larutan pekat melalui *counter-ion exchange*. Akselerasi proses *dropletting* dan penurunan ukuran droplet dapat dilakukan dengan menggunakan metode ekstrusi. Metode ekstrusi menghasilkan bead lipase-alginate berdiameter kecil dan pengontrolan yang mudah terhadap ukuran bead.

Sejumlah polimer sintetik dapat digunakan dalam metode ini, seperti *photo-crosslinkable resin*, *polyurethane prepolymer*, dan *acrylic polymer* seperti poliakrilamida. Lipase dicampurkan dengan prepolimer dan campuran tersebut dipolimerisasi radikal atau fotokimia. Sebagai contoh, lipase dapat di-*entrapment* ke dalam gel poliakrilamida ketika poliakrilamida tersebut dicampurkan dengan akril-

amida, dan ditambahkan N,N-metilena bisakrilamida dan potassium persulfat. Urethane prepolimer dan material lainnya telah digunakan untuk polimerisasi fotokimia. Untuk meminimalisasi konsentrasi radikal bebas, *gel entrapment* dapat digunakan untuk mengefisiensikan imobilisasi lipase. Matriks resin *Photocrosslinkable* berdasarkan poly(ethylene glycol) atau poly(propylene glycol) banyak digunakan sebagai material matriks untuk imobilisasi lipase.

Lipase juga dapat di-*entrapment* di dalam membran semi-permeable atau mikrokapsul yang impermeable terhadap enzim tetapi permeabel terhadap substrat dan produk berberat molekul rendah (Gambar 2-11). Kelebihan jenis imobilisasi ini adalah masing-masing enzim berada dalam daerah kontak yang lebih dekat dengan larutan sekitar dibandingkan *entrapment* di dalam interior gel. Namun, kekurangannya adalah adanya kemungkinan penggabungan enzim di dalam dinding membrane dan restriksi substrat terhadap substansi berberat molekul rendah. (Knežević et al., 2004)



Gambar 2-13. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Microencapsulation (Membrane Entrapment)*
(Elnashar, 2009)

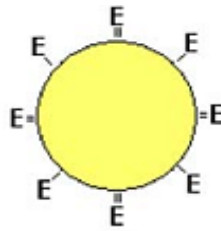
2.10.3. Covalent Binding

Metode yang paling intensif dipelajari dalam metode imobilisasi enzim adalah pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan matriks *support* (Goel, 1994) (Gambar 2-12 dan Gambar 2-13). *Covalent binding* lipase terhadap *carrier* organik dan anorganik yang berbeda lebih menguntungkan dibandingkan metode lain karena pembatasan difusi pada substrat/ produk sangat menurun. Selain itu, imobilisasi kovalen memberikan keuntungan yang sangat besar dengan meningkatkan stabilitas enzim dan mencegahnya melekat pada larutan. Terdapat banyak *support* anorganik dan organik yang tersedia untuk imobilisasi lipase, termasuk *porous*

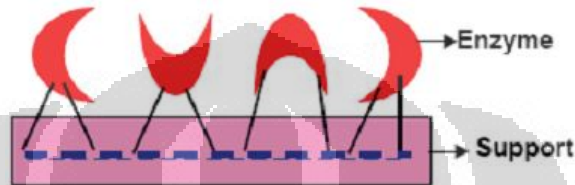
alumina, metallic oxides, stainless steel, dan controlled pore glass (CPG), selulosa, pati, kitin, sepharose dan polimer sintetik. Support tersebut tidak memiliki gugus reaktif untuk langsung mengikat enzim. Namun gugus hidroksi, amino, amida dan karboksi dapat diaktifasi untuk imobilisasi enzim. Ikatan kovalen biasanya dibentuk oleh jembatan molekul aktif, seperti CNBr, dan reagen bi- atau multifungsional seperti glutaraldehida. Sebagian besar metode umum untuk aktivasi *support* mengandung gugus karboksi atau amino termasuk penggunaan karbodiimida dan reagen sejenisnya. Turunan aktif dan lipase berikatan kovalen secara ringan. (Knežević et al., 2004)

Meskipun *carrier* anorganik memiliki keuntungan yang lebih banyak dibandingkan polimer organik seperti tingginya kekuatan mekanik, stabilitas termal dan kimia, resistansi terhadap pelarut organik dan serangan mikroba, kemudahan penanganan, dan kemudahan regenerasi dengan proses pirolisis sederhana, aplikasinya untuk *covalent attachment* lebih terbatas karena *carrier* anorganik hanya dapat diaktifasi dengan sedikit metode. Salah satu metode derivatisasi *carrier* anorganik adalah metode silanisasi, yang melibatkan turunan *trialkoxysilane* yang mengandung gugus fungsi organik. Gugus organik ini dimodifikasi lebih lanjut untuk menghasilkan intermediet teraktivasi, yang direaksikan dengan lipase. Selain itu, kondisi reaksi yang diperlukan relatif rumit dan tidak ringan, dan efisiensi prosedur imobilisasi sangat rendah. Metode derivatisasi *carrier* anorganik lainnya melibatkan penggunaan triklorotriazina untuk aktivasi gugus hidroksil. Lipase secara kovalen terikat pada beberapa *support* anorganik yang teraktivasi oleh triklorotriazina, seperti alumina, silika dan *controlled pore glass*. (Knežević et al., 2004)

Polimer *support* yang berbahan polisakarida sangat populer karena mengandung gugus hidroksi yang dapat diaktivasi secara langsung dengan mengintroduksi gugus elektrofilik, yang reaktif terhadap enzim, ke dalam *support*, namun gugus elektrofilik tersebut cenderung mudah mengembang dan memiliki stabilitas yang rendah terhadap degradasi fisik, kimia, termal, dan mikroba. (Knežević et al., 2004)



Gambar 2-14. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Covalent Binding* (Nunes and Marty, 2006)

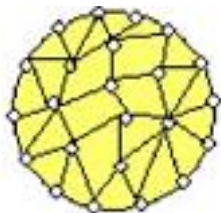


Gambar 2-15. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Covalent Binding*(Elnashar, 2009)

2.10.4. *Cross-linking*

Imobilisasi enzim juga dapat dilakukan dengan pembentukan *cross-linking* intermolekular protein dengan molekul protein lain atau dengan gugus fungsi pada matriks *support* (Goel, 1994)(Gambar 2-14 dan Gambar 2-15). Metode *cross-linking* enzim melalui reaksi glutaraldehid dengan gugus NH_2 reaktif pada permukaan protein telah dikembangkan pada tahun 1960-an. Metode ini menghasilkan *cross-linked enzymes* (CLEs). Namun, metode ini memiliki beberapa kelemahan, seperti rendahnya aktivitas retensi, kemampuan reproduksi ulang yang rendah, stabilitas mekanik yang rendah dan kesulitan dalam penanganan CLEs bergelatin. (Sheldon et al., 2006)

Stabilitas mekanik dan kemudahan dalam penanganan dapat ditingkatkan dengan *cross-linking* dalam matriks gel atau pada *carrier* namun hal ini memberikan kelemahan pada aktivitas dilusi. Oleh karena itu, pada akhir tahun 1960-an, perhatian beralih pada *carrier-bound enzyme* sehingga banyak digunakan di industri.



Gambar 2-16. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Cross-linking* (Nunes and Marty, 2006)



Gambar 2-17. Metode Imobilisasi Enzim dengan *Cross-linking* (Elnashar, 2009)

2.11.State of the Art

Sejumlah penelitian mengenai sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) telah dilakukan. Berbagai substrat digunakan dalam penelitian tersebut seperti minyak nabati (Sahin et al., 2005c, Karabulut et al., 2007, Lee et al., 2010), campuran minyak nabati dan minyak babi (Nielsen et al., 2006, Silva et al., 2009b, Wang et al., 2009), serta campuran minyak nabati dan susu sapi (Yang et al., 2003, Soresen et al., 2010). Studi mengenai optimasi kondisi operasi dari interesterifikasi juga telah dilakukan secara cukup (Lee et al., 2010, Sahin et al., 2005a, Karabulut et al., 2007).

Pada umumnya, sintesis HMFS dilakukan dengan menggunakan lipase sebagai katalisnya. Karena harga lipase di pasaran sangat tinggi, lipase perlu diimobilisasi terlebih dahulu agar dapat digunakan kembali tanpa mengurangi tingkat aktivitasnya. Di samping itu, dengan menggunakan lipase terimobilisasi, biaya produksi HMFS dapat berkurang. Namun, penelitian mengenai imobilisasi lipase dalam kaitannya dengan sintesis HMFS, hingga kini jumlahnya masih kurang (Nielsen et al., 2006). Oleh karena itu, pada penelitian ini, akan dicoba melakukan skrining terhadap metode imobilisasi lipase dalam kaitannya dengan sintesis HMFS. Selain itu, pada penelitian ini juga akan dilakukan optimasi kondisi interesterifikasi dalam mensintesis HMFS, yaitu berupa temperatur reaksi, waktu reaksi dan perbandingan mol substrat yang digunakan.

Tabel 2-7. State of the Art

Optimasi Kondisi Operasi		Kondisi Fisikimia Reaksi Interesterifikasi (Perbandingan Substrat, Temperatur, Waktu)		Metode Imobilisasi	PENELITIAN INI
		Dipertimbangkan	Tidak Dipertimbangkan		
Kondisi Fisikimia Reaksi Interesterifikasi (Perbandingan Substrat, Temperatur, Waktu)	Dipertimbangkan	Lipase Terimobilisasi	(Lee et al., 2010) (Karabulut et al., 2007) (Sahin et al., 2005a) (Sahin et al., 2005b) (Sahin et al., 2005c)	(Nielsen et al., 2006)	
	Tidak dipertimbangkan			(Wang et al., 2009) (Silva et al., 2009a)	(Sorensen et al., 2010)
			Minyak Nabati	Campuran Minyak Nabati dan Lemak Babi	Campuran Minyak Nabati dan (Lemak) Susu Sapi
Bahan Baku					

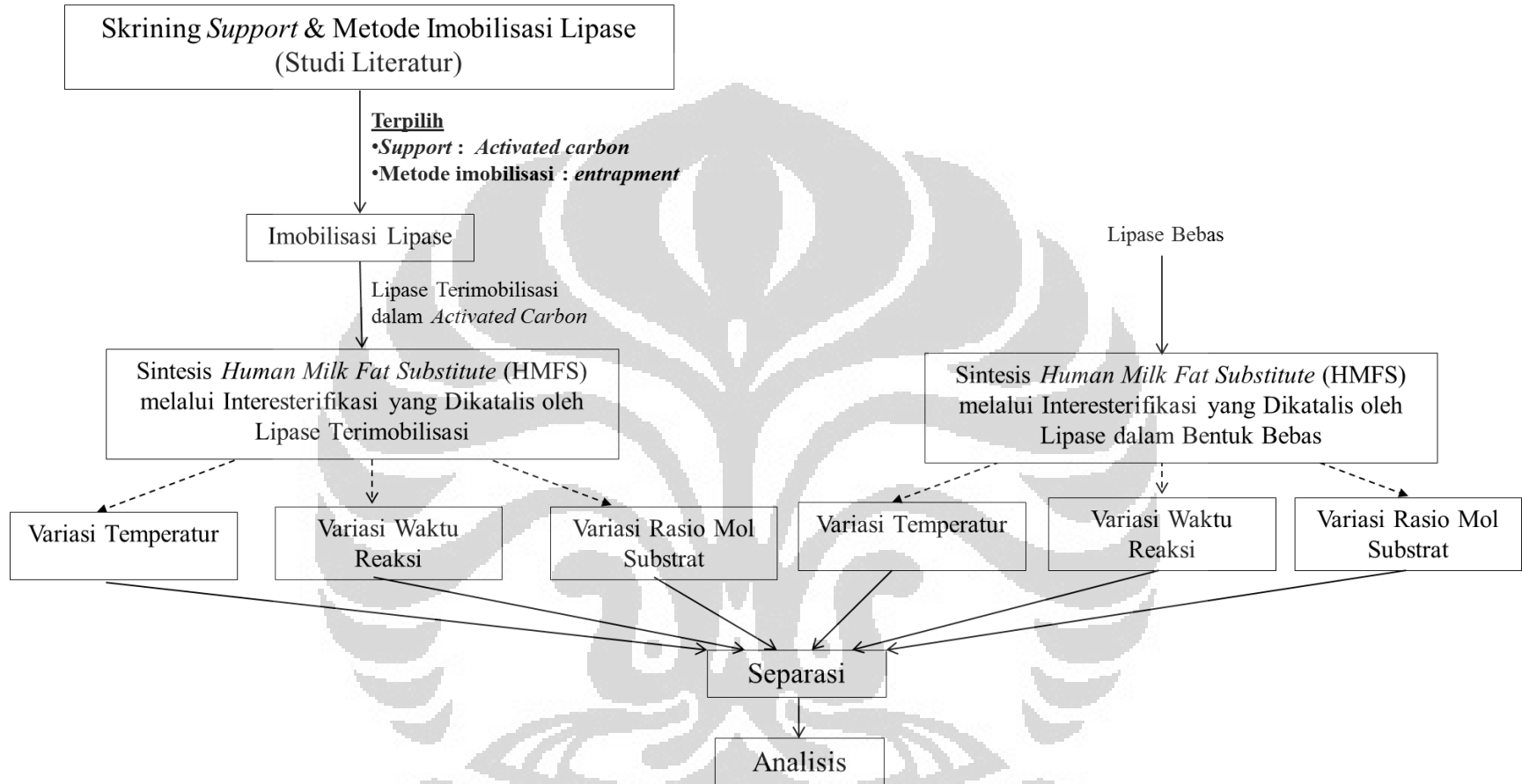
BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Model Penelitian

Pada dasarnya, metode imobilisasi lipase dapat dibedakan menjadi empat kelompok, yaitu adsorpsi, *entrapment*, *covalent binding*, dan *cross-linking*. Masing-masing metode tersebut memiliki *support* yang beragam. Oleh karena itu, tahap awal penelitian ini adalah melakukan skrining terhadap beragam *support* dan metode imobilisasi lipase. Tahap skrining dilakukan melalui studi literatur. Setelah *support* dan metode imobilisasi terpilih, dilakukanlah imobilisasi lipase dengan menggunakan *support* dan metode tersebut.

Lipase terimobilisasi (*immobilized lipase*) dari metode terbaik kemudian diaplikasikan sebagai biokatalis dalam reaksi interesterifikasi untuk mensintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) dengan menggunakan substrat etil oleat dan tripalmitin. Temperatur reaksi, waktu reaksi dan rasio mol substrat yang divariasikan diperlakukan dalam reaksi interesterifikasi ini. Untuk mengetahui seberapa besar *yield* HMFS (1,3-dioleil-2-palmitoylglycerol (OPO)) yang dihasilkan, dilakukan analisis melalui metode kromatografi dengan menggunakan alat *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dalam penelitian ini juga dilakukan reaksi interesterifikasi dengan menggunakan lipase dalam bentuk bebas (*free lipase*). Tujuannya adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan lipase terimobilisasi jika dibandingkan dengan lipase dalam bentuk bebas. Parameter yang digunakan dalam perbandingan ini adalah *yield* OPO yang dihasilkan dari masing-masing reaksi.

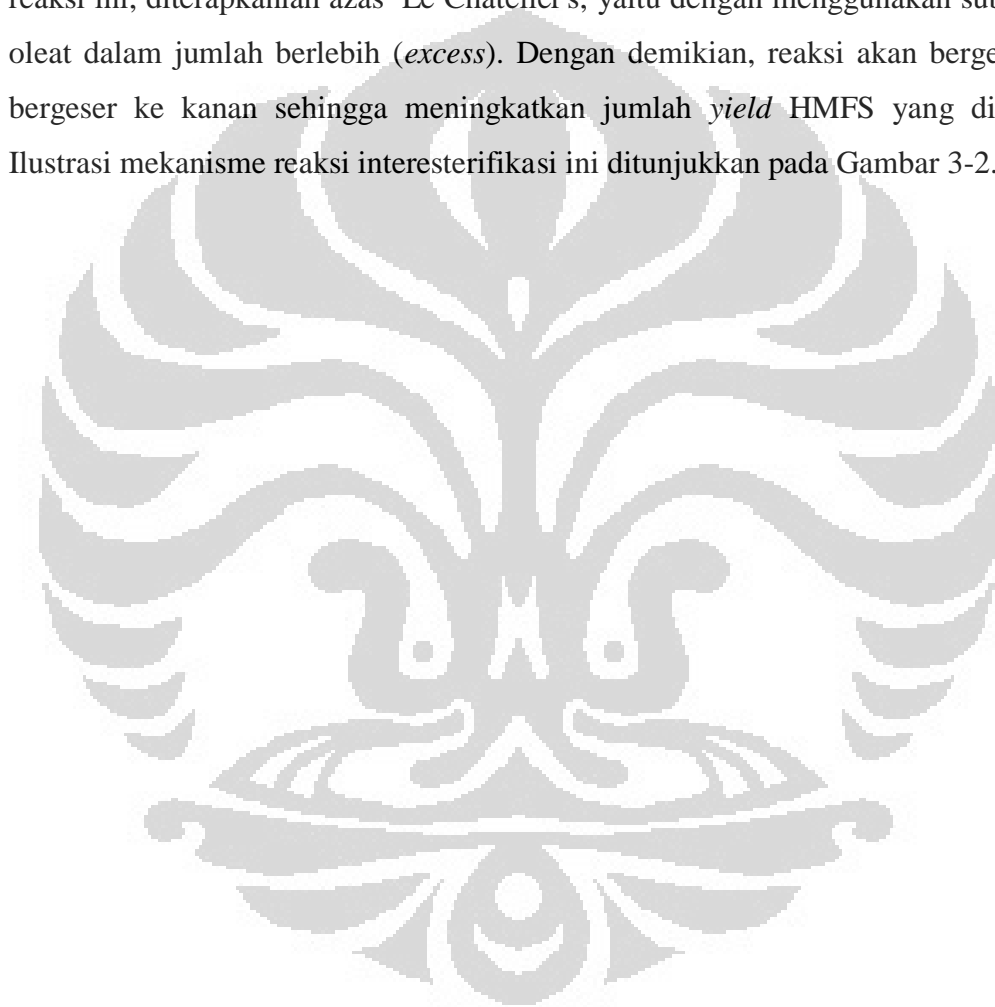
Untuk lebih jelasnya mengenai diagram alir penelitian yang dilakukan, perhatikan Gambar 3-1.

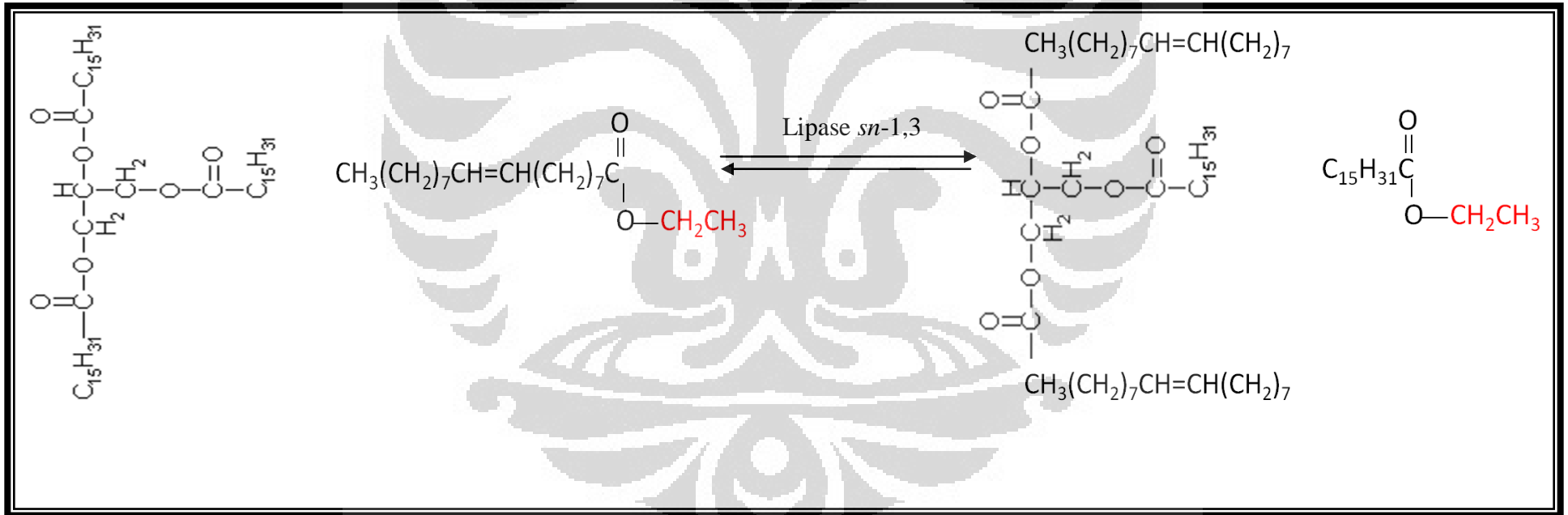
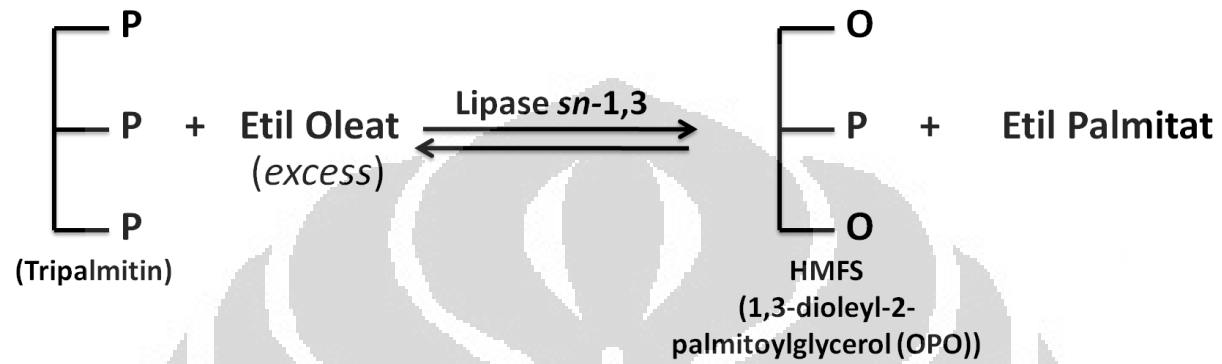


Gambar 3- 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian

3.2.Mekanisme Reaksi

Pada penelitian ini, *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) disintesis melalui reaksi interesterifikasi dengan substrat etil oleat dan susu sapi. Reaksi ini dikatalis dengan menggunakan lipase selektif *sn*-1,3 yang berasal dari *porcine pancreas*. Reaksi interesterifikasi bersifat *reversible*. Untuk memanipulasi jumlah keluaran dari reaksi ini, diterapkanlah azas Le Chatelier's, yaitu dengan menggunakan substrat etil oleat dalam jumlah berlebih (*excess*). Dengan demikian, reaksi akan bergeser akan bergeser ke kanan sehingga meningkatkan jumlah *yield* HMFS yang dihasilkan. Ilustrasi mekanisme reaksi interesterifikasi ini ditunjukkan pada Gambar 3-2.





Gambar 3- 2. Mekanisme Reaksi Interesterifikasi dalam Mensintesis Human Milk Fat Substitute (HMFS)

3.3. Variabel

Variabel independen dalam penelitian ini adalah

- Temperatur reaksi
- Waktu reaksi
- Rasio mol substrat

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah

- Temperatur reaksi
- Waktu reaksi
- Rasio mol substrat

3.4. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3- 1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Labu Erlenmeyer 250 ml dengan <i>screw cap</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tempat untuk mengimobilisasi lipase • Tempat untuk terjadinya reaksi interesterifikasi untuk mensintesis <i>Human Milk Fat Substitutes</i> (HMFS)
2.	<i>Hot plate stirrer dan stirrer bar (magnetic stirrer)</i>	Alat untuk menghomogenkan campuran lipase, aquades, karbon aktif dan larutan NaF
3.	Kaca arloji	Wadah untuk menimbang bahan
4.	Timbangan digital	Alat untuk menimbang berat bahan
5.	Tabung reaksi	Tempat untuk mereaksikan sampel pada saat dilakukan uji protein melalui metode Lowry
6.	Batang pengaduk	Alat untuk mengaduk campuran
7.	Spatula besi	Alat untuk mengambil bahan dalam bentuk padatan atau bahan berbentuk powder

(Lanjutan)

8.	Pipet tetes	Alat untuk memindahkan bahan dalam bentuk liquid dengan cara meneteskan bahan liquid tersebut
9.	Pipet volumetrik (1 ml, 10 ml)	Pipet yang digunakan saat dibutuhkan untuk memindahkan bahan liquid yang volumenya harus presisi
10.	Kertas filter	<ul style="list-style-type: none"> • Untuk memisahkan lipase terimobilisasi dan lipase bebas setelah dilakukan proses imobilisasi • Untuk memisahkan biokatalis dengan produk hasil interesterifikasi
11.	Corong kaca	Alat untuk membantu untuk menempatkan kertas saring dalam posisi yang tepat serta untuk menyalurkan filtrat yang lolos dari saringan ke tempat penampungan filtrat.
12.	Pompa vakum	Alat yang dapat menciptakan kondisi vakum sehingga dapat mempercepat proses filtrasi
13.	Kulkas	Tempat untuk menyimpan berbagai bahan/sampel yang membutuhkan temperatur penyimpanan yang cukup rendah (<5 ⁰ C)
14.	<i>Shaking water bath</i>	Alat untuk mencapai kondisi reaksi yang diinginkan (temperatur dan guncangan)
15.	Termometer	Alat untuk mengukur temperature
16.	Spektrofotometer	Alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi sampel saat dilakukan uji protein
17.	Erlenmeyer <i>arm-side</i>	Erlenmeyer yang digunakan saat melakukan filtrasi vakum

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 3- 2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Bahan	Supplier
1.	Etil Oleat 70%	Sigma Chemical Co.
2.	Tripalmitat 85%	Sigma Chemical Co.
3.	<i>Porcine Pancreatic Lipase</i> 200 units/mg protein	Sigma Chemical Co.
4.	NaF padatan	Merck
5.	Karbon aktif	Brataco
6.	Na ₂ CO ₃	Laboratorium Bioproses
7.	NaOH	Laboratorium Bioproses
8.	NaK Tartrate	Laboratorium Bioproses
9.	CuSO ₄ .5H ₂ O	Laboratorium Bioproses
10.	Folin Ciocalteu Phenol Reagent	Laboratorium Dasar Proses Kimia
11.	Aquades	Laboratorium Dasar Proses Kimia

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Skrining *Support* dan Metode Imobilisasi Lipase (Studi Literatur)

Tabel 3- 3. Skrining *Support* dan Metode Imobilisasi Lipase

Metode Imobilisasi	Biaya	Kehilangan aktivitas enzim	Referensi ^a	Jenis <i>Support</i>	Enzim <i>Loading</i> (mg/g)	Reaksi	Konversi (%)	Referensi ^b
Adsorpsi	Murah	Diabaikan	(Nunes and Marty, 2006)	Powder MP1004 polypropylene	250	Transesterifikasi	100	(Salis et al., 2003)
				Selulosa	0,85	Esterifikasi	80	(Karra-Châabouni, et al., 2008)
				Silika aerogel	0,9	Esterifikasi	80	(Kharrat, et al., 2011)
				Hexagonal mesoporous silica	100	Transesterifikasi	68	(Yadav, et al., 2005)
				Resin ion exchanger cation (SP-Sephadex C-	0,2	Hidrolisis	22,3	(Liu, et al., 2004)

(Lanjutan)

				50)				
<i>Entrapment</i>	Murah	Diabaikan	(Nunes and Marty, 2006)	Celite R633	0,6	Transesterifikasi	25-65	(Meunier and Legge, 2010)
				Celite R632	2,8	Transesterifikasi	25-65	(Meunier and Legge, 2010)
				Celite R647	4,05	Transesterifikasi	25-65	(Meunier and Legge, 2010)
				Activated carbon	50	Transesterifikasi	85	(Moreno-Pirajan and Giraldo, 2010)
<i>Covalent Binding</i>	Mahal	Signifikan	(Nunes and Marty, 2006)	Poly(α -glutamic acid) (α -PGA)	26,11	Esterifikasi	81,8	(Chang et al., 2008)
				Poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes	16,2	Hidrolisis	3,6	(Huang, et al., (Lanjutan)
				Aldehyde-resin	80	Transesterifikasi	100	(Mendes, et al.,

			affinity	2011)			
<i>Cross-linking</i>	Murah	Sedikit	Electrospun PAN nanofibrous membranes	21,2	Hidrolisis	85	(Li, et al., 2009)
			Butyl-Sepabeads	12,2	Hidrolisis	49	(Nieto, et al., 2005)
			Octyl-agarose	17,3	Hidrolisis	50	(Nieto, et al., 2005)
			Octadecyl-Sepabeads	16,3	Hidrolisis	47	(Nieto, et al., 2005)
			Amberlite	41,4	Hidrolisis	8	(Nieto, et al., 2005)
			Eupergit C	35,9	Hidrolisis	34	(Nieto, et al., 2005)
			Matriks diatomit anorganik	50	Esterifikasi	50	(Yang et al., 2009)
			Polyaniline nanofibre	5	Esterifikasi	10	(Lee and Hongil Joo, 2008)

Tidak ada metode imobilisasi lipase yang ideal untuk digunakan. Namun, berdasarkan berbagai parameter yang tertera pada Tabel 3-1, *activated carbon* dengan metode imobilisasi *entrapment* terpilih sebagai *support* dan metode imobilisasi lipase unggul untuk diterapkan dalam penelitian ini.

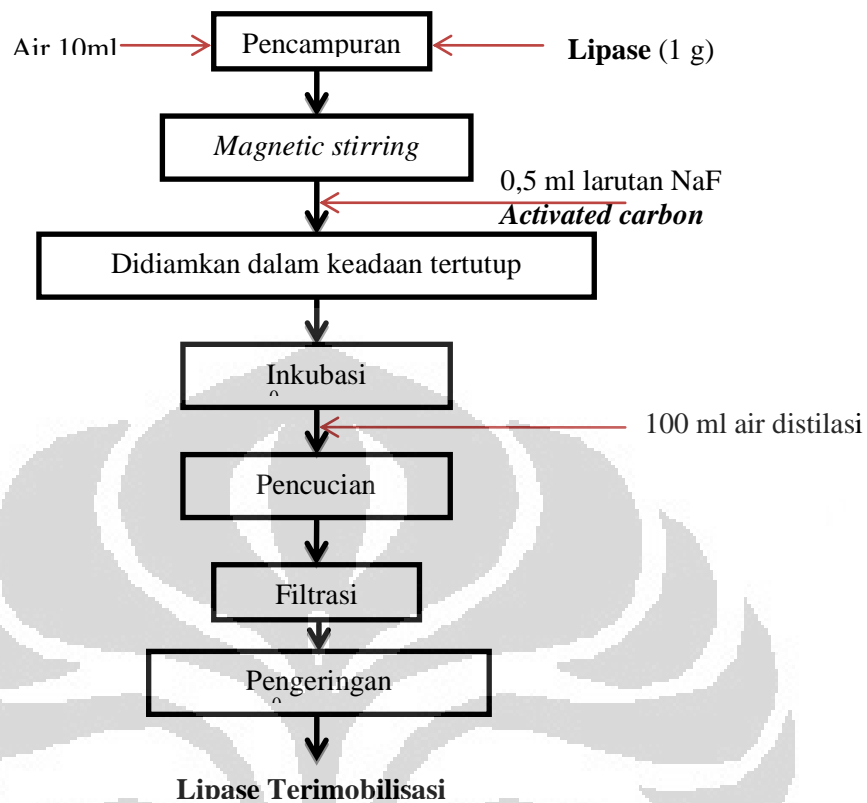
Jika hanya mempertimbangkan tingkat enzim *loading* dan persentase konversi, powder MP1004 polypropylene dengan metode adsorpsi adalah yang paling tinggi tingkat dan persentasenya. Namun, metode adsorpsi memiliki kelemahan, yaitu enzim mudah terdesorpsi dari *support*.

Metode *covalent binding* dan berbagai *support*-nya tidak terpilih menjadi *support* unggul adalah karena tingkat enzim *loading* dan persentase konversinya tidak terlalu tinggi. Selain itu, pada metode ini, terjadi kehilangan aktivitas enzim secara signifikan. Meskipun salah satu *support* dari metode tersebut (*aldehyde-resin affinity*) memiliki enzim *loading* dan konversi yang cukup tinggi, namun metode *covalent binding* memiliki kelemahan lain, yaitu biaya yang mahal.

Sementara itu, metode *cross-linking* beserta *support*-nya tidak terpilih sebagai metode dan *support* unggul adalah karena tingkat enzim *loading* dan persentase konversinya yang rendah. Selain itu, lipase yang diimobilisasi dengan metode *cross-linking* dapat terjadi kehilangan aktivitas enzimnya meskipun sedikit.

3.5.2. Entrapment Lipase (Moreno-Pirajan and Giraldo, 2010)

Sejumlah lipase (optimalnya 1 g) dimasukkan ke dalam labu dan ditambahkan air sebanyak 10 ml. Campuran di-*stirrer* pada 200 rpm menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan NaF dan *activated carbon*. Selanjutnya labu dipisahkan dari *stirrer* dan dibiarkan tersegel pada temperatur ruang selama 24 jam. Setelah selesai, segel labu dibuka dan diinkubasi dalam *water bath* pada 37⁰C selama 48 jam. Lipase yang telah terjebak di dalam karbon aktif kemudian dikeringkan lagi pada 37⁰C selama 48 jam. Lipase terimobilisasi disimpan pada 4⁰C hingga digunakan. Perlu diketahui bahwa lipase yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *porcine pancreas* (PPL).



Gambar3-3. Imobilisasi Lipase dengan Metode *Entrapment*

3.5.3. Penentuan Enzim *Loading*

3.5.3.1. Kurva Kalibrasi Standar

Tujuan dari pembuatan kurva kalibrasi ini adalah untuk mengukur konsentrasi protein dalam larutan. Metode yang digunakan adalah metode Lowry. Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam metode Lowry ini adalah sebagai berikut:

- 1) Lowry Reagent (48 ml larutan A + 1 ml larutan B + 1 ml larutan C), dimana:
 - ❖ Larutan A : 2 gram Na_2CO_3 dalam 100 ml 0,1 N NaOH (0,4 gram NaOH dalam 100 ml aquadest)
 - ❖ Larutan B : 0,1 gram NaK Tartrate dalam 10 ml aquadest
 - ❖ Larutan C : 0,1 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 20 ml aquadest
- 2) Phenol reagent (5 ml Follin Ciocalteu phenol reagent + 5 ml aquadest)

Prosedurnya adalah sebagai berikut:

- 1) Larutan *Porcine Pancreatic Lipase*(PPL)dengan konsentrasi 0,01 gram/ml (1 gram PPL dalam 100 ml larutan aquades) dan 0,1 gram/ml (1 gram PPL dalam 10 ml aquades).
- 2) Memvariasikan konsentrasi PPL menjadi beberapa konsentrasi dengan cara mengencerkan 0,01 gram/ml larutan PPL dan 0,1 gram/ml yang telah dibuat pada tahap 1). Kemudian menyiapkan tiap-tiap larutan pada tabung reaksi.

Tabel 3- 4. Bahan-bahan yang digunakan untuk Membuat Kurva Kalibrasi Standar

Konsentrasi Awal (gr/ml)	Konsentrasi Akhir (gr/ml)	Volume Akhir (ml)	Volume Awal (ml)	Aquades yang ditambahkan (ml)
0,01	0,0002	10	0,2	9,8
0,01	0,0005	10	0,5	9,5
0,01	0,001	10	1	9
0,1	0,05	10	5	5
0,1	0,1	10	10	0

- 3) Menambahkan 2 ml Lowry Reagent ke setiap sample konsentrasi PPL.
- 4) Menginkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.
- 5) Menambahkan 0,2 ml larutan phenol reagent pada setiap tabung.
- 6) Vortex (melakukan pencampuran dengan bantuan vibrator) segera setiap tabung tersebut.
- 7) Menginkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.
- 8) Mengambil tiap sampel ke dalam kuvet.
- 9) Menentukan absorbansi setiap sampel menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. (Sampel dibuat duplo dan blanko menggunakan larutan aquades)
- 10) Memplot absorbansi vs gram/ml PPL untuk memperoleh kurva kalibrasi standar.

3.5.3.2. Pengukuran Enzim *Loading*

Larutan sebelum dan setelah reaksi diukur absorbansinya dengan menggunakan metode Lowry. Absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversikan menjadi konsentrasi. Selanjutnya konsentrasi yang didapat dikonversikan menjadi massa (gram). Enzim *loading* dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\%EnzimLoading = \frac{mPPL_{sebelum\ immobilisasi} - mPPL_{setelah\ immobilisasi}}{mPPL_{sebelum\ immobilisasi}} \times 100\%$$

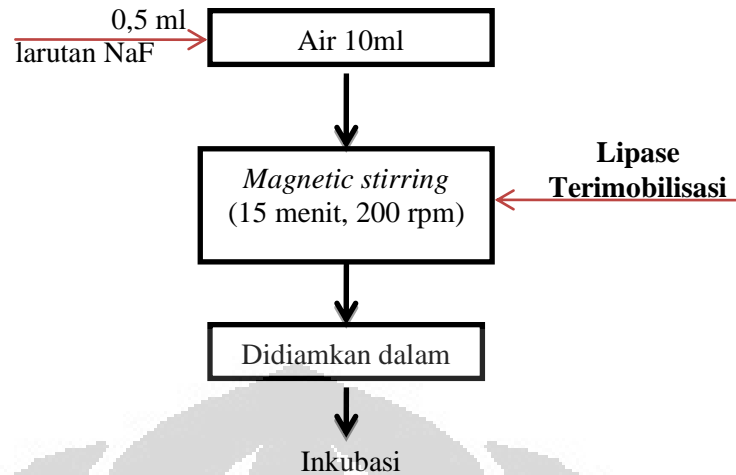
dimana :

$mPPL_{sebelum\ immobilisasi}$ = massa PPL sebelum immobilisasi (gr)

$mPPL_{setelah\ immobilisasi}$ = massa PPL setelah immobilisasi (gr)

3.5.4. Sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) melalui *Interesterifikasi* (Lee et al., 2010)

Tripalmitin dicampur dengan etil oleat dengan rasio mol yang bervariasi (1:4; 1:5, 1:6) di dalam Erlenmeyer flask (250 ml) dengan screw cap, kemudian ditambahkan biokatalis yang berupa PPL bebas dan lipase terimobilisasi. Jumlah biokatalis yang ditambahkan adalah 10% dari total berat substrat, yaitu 1,01; 1,27; dan 1,52 g untuk rasio mol substrat 1:4, 1:5, dan 1:6. Larutan direaksikan di dalam shaking water bath pada 200 rpm dengan kondisi reaksi temperatur dan waktu yang bervariasi, yaitu 50⁰C, 55⁰C dan 60⁰C serta 3 jam, 7,5 jam dan 12 jam. *Range* temperature tersebut digunakan karena substrat, yaitu tripalmitat dan etil oleat tidak dapat bercampur secara sempurna pada temperatur di bawah 50⁰C. Setelah selesai, lipase difiltrasi dari produk hasil reaksi dengan menggunakan kertas filter. Filtrasi dilakukan di dalam water bath pada temperatur 60⁰C. Tujuannya adalah untuk memperlancar pemisahan karena produk lemak yang dihasilkan dari reaksi akan memadat jika berada pada temperatur ruang.



Gambar 3- 3. Sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS)

3.5.5. Variasi

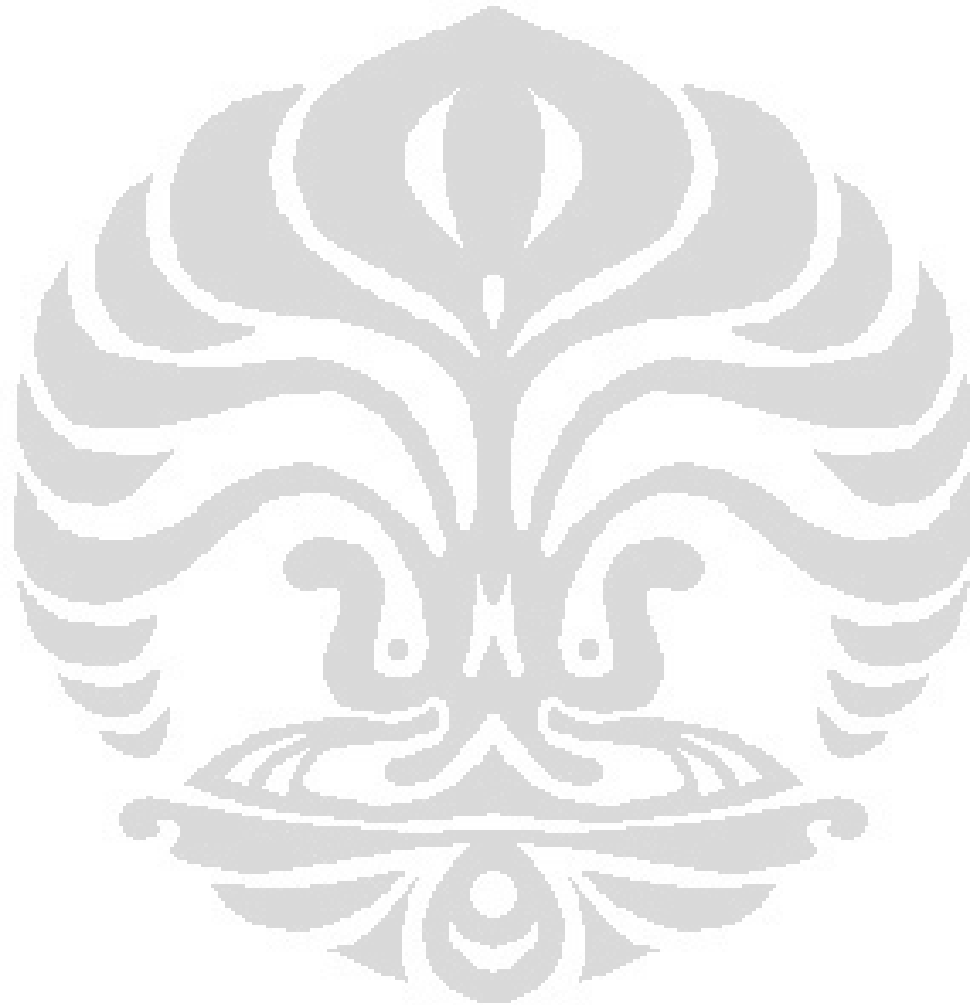
Dalam penelitian ini, variasi dilakukan pada saat melakukan reaksi interesterifikasi. Variasi yang dilakukan adalah berupa variasi bentuk lipase, variasi waktu waktu reaksi, variasi rasio mol substrat dan variasi temperature reaksi.

Interesterifikasi dengan Katalis <i>Free Lipase</i>		
Variasi Waktu	Variasi Rasio Mol Substrat	Variasi Temp.
<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 3 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:4; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 50 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam
<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:5; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam
<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 12 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 60 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam
Interesterifikasi dengan Katalis <i>Immobilized Lipase</i>		
Variasi Waktu	Variasi Rasio Mol Substrat	Variasi Temp.
<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 3 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:4; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 50 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam
<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:5; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam
<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 12 jam	<input type="checkbox"/> 55 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam	<input type="checkbox"/> 60 ⁰ C; 1:6; 7,5 jam

Gambar 3- 4. Variasi yang Dilakukan dalam Penelitian

3.5.6. Analisis

Analisis dilakukan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Pada kromatografi ini yang akan dideteksi adalah asam lemak berupa asam oleat dan asam palmitat yang terkandung di dalam sampel produk setelah reaksi.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Kurva Kalibrasi Standar

Metode ini berdasarkan reaksi Biuret, dimana ikatan peptide protein bereaksi dengan copper pada kondisi alkali untuk memproduksi Cu^+ . Reaksi tersebut menghasilkan warna biru (Waterborg, 2008). Kepekatan warna biru yang dihasilkan tergantung dari protein yang terkandung di dalamnya. Pada penelitian ini, protein yang digunakan adalah berupa *Porcine Pancreatic Lipase* (PPL). Tabel 4-1 menunjukkan konsentrasi PPL (mg/ml) dan absorbansi yang dihasilkan. Sementara itu, Gambar 4-1 menunjukkan kurva kalibrasi standar konsentrasi *Porcine Pancreatic Lipase* (PPL). Persamaan garis yang dihasilkan adalah

$$y = 0.5993x - 0.0198 \quad (4-1)$$

dimana,

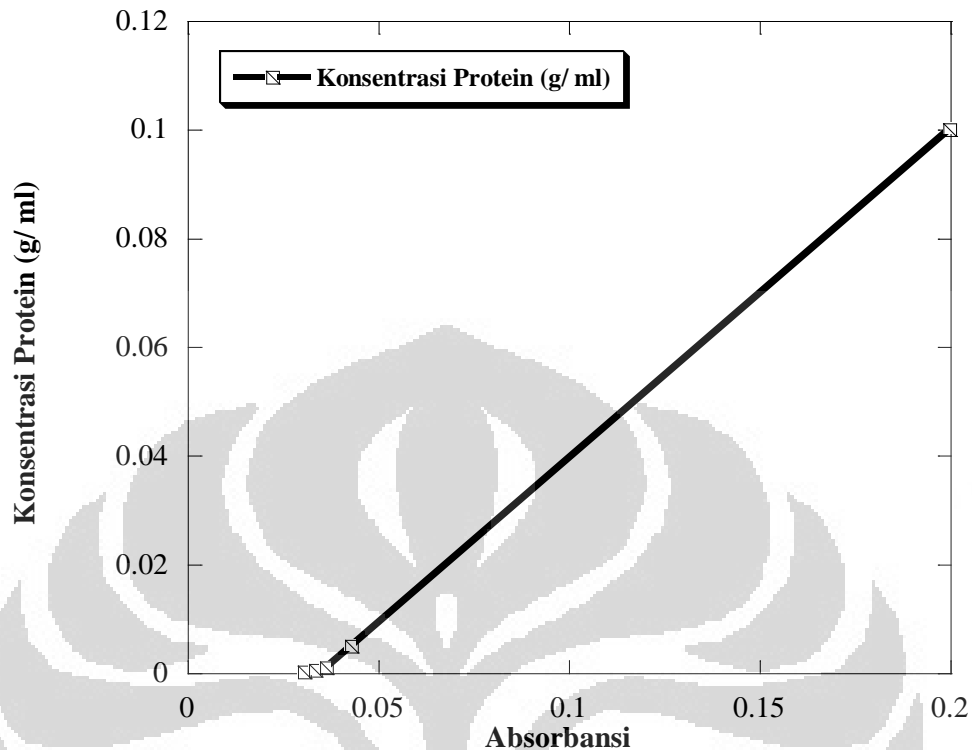
x = absorbansi

y = konsentrasi PPL (gr/ml)

Confidence level (R^2) dari yang dihasilkan adalah sebesar 0.9994.

Tabel 4- 1. Hasil Absorbansi dari berbagai konsentrasi PPL

Absorbansi	Konsentrasi PPL (gr/ml)
0.0306	0.0002
0.0335	0.0005
0.0364	0.001
0.0429	0.005
0.1997	0.1



Gambar 4- 1. Kurva Kalibrasi Standar Konsentrasi *Porcine Pancreatic Lipase*

4.2. Hasil *Entrapment* PPL dalam Karbon Aktif

Setelah *entrapment* enzim ke dalam karbon aktif melalui proses inkubasi selama 24 jam, dilakukanlah proses filtrasi untuk memisahkan enzim yang terimobilisasi di dalam *support* dari larutan enzim yang tidak berhasil terjebak ke dalam *support*. Selisih massa enzim pada larutan sebelum dan setelah imobilisasi menjadi dasar untuk penentuan persentase enzim *loading*. Untuk mengetahui massa enzim sebelum dan setelah imobilisasi, dapat dilakukan dengan cara menyelidiki konsentrasi di dalam larutan sebelum dan setelah imobilisasi. Penentuan konsentrasi ini dilakukan dengan melalui metode Lowry dengan menggunakan spektrofotometer dimana output dari proses ini adalah berupa nilai absorbansi. Selanjutnya, nilai absorbansi tersebut dikonversikan menjadi nilai konsentrasi dengan menggunakan persamaan (4-1). Hasil absorbansi serta kandungan PPL dalam larutan sebelum dan setelah imobilisasi adalah sebagai berikut.

(1) Larutan PPL Sebelum imobilisasi

- Absorbansi (x)

$$x = 0.1997$$

- Konsentrasi (y)

$$y = 0.5993x - 0.0198$$

$$y = 0.5993(0.1997) - 0.0198 = 0.1 \text{ gr/ml}$$

- Massa

$$\text{Massa PPL}_{\text{sebelum imobilisasi}} = 0.1 \frac{\text{gr}}{\text{ml}} \times 10 \text{ ml} = 1 \text{ gr}$$

(2) Larutan PPL Setelah Imobilisasi

- Absorbansi (x)

$$x = 0.1886$$

- Konsentrasi (y)

$$y = 0.5993x - 0.0198$$

$$y = 0.5993(0.1886) - 0.0198 = 0.093 \text{ gr/ml}$$

- Massa

$$\text{Volume filtrat biokatalis} = 0,8 \text{ ml}$$

Sehingga massa PPL yang terkandung dalam larutan setelah imobilisasi adalah sebesar

$$\text{Massa PPL}_{\text{setelah imobilisasi}} = 0.092 \frac{\text{gr}}{\text{ml}} \times 0.8 \text{ ml} = 0.0736 \text{ gr}$$

Dengan demikian, persentase enzim *loading* yang dihasilkan adalah sebesar

$$\% \text{EnzimLoading} = \frac{(1 - 0.0736) \text{ gr}}{1 \text{ gr}} \times 100\% = 92,64\%$$

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, persentase enzim *loading* yang dihasilkan dari *entrapment* PPL pada karbon aktif adalah sebesar 92,64%. Nilai persentase tersebut menunjukkan bahwa enzim PPL berhasil dijebak dalam karbon aktif. Hal ini terjadi karena karbon aktif memiliki pori-pori yang memungkinkan enzim terjebak di dalamnya (Polyakov, et al., 1993). Pencampuran larutan NaF ke dalam karbon aktif,

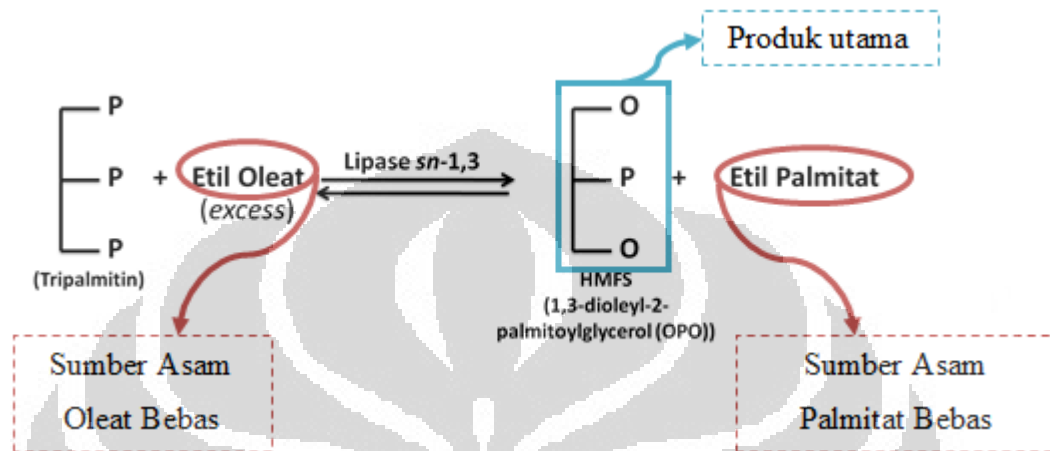
ukuran pori akan semakin membesar (Aegerter, et al., 2004). Dengan demikian, ruang untuk menjebak enzim PPL menjadi semakin besar sehingga lebih banyak enzim PPL yang terjebak di dalamnya.

4.3. Hasil Reaksi Interesterifikasi Enzimatis

Tujuan dilakukannya reaksi interesterifikasi adalah untuk menghasilkan produk *Human Milk Fat Substitute* (HMFS) yang berupa senyawa 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl glycerol. Substrat yang digunakan adalah trigliserida yang ketiga asam lemaknya berupa asam palmitat atau dikenal dengan nama tripalmitat. Pada reaksi ini yang berperan sebagai pendonor *acyl* adalah etil oleat. Karena reaksi ini bersifat bolak-balik (reversible) sehingga harus digunakan etil oleat dalam jumlah yang berlebih (*excess*). Dengan demikian, reaksi dapat berlangsung searah. Reaksi interesterifikasi ini dikatalis dengan menggunakan enzim *Porcine Pancreatic Lipase* (PPL) yang bersifat selektif terhadap *sn*-1,3. Sehingga hanya ester yang terdapat pada posisi *sn*-1 dan *sn*-3 yang mengalami pertukaran *acyl*. Dengan demikian, terdapat dua produk yang dihasilkan reaksi ini, yaitu 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol (produk utama) dan etil palmitat.

Campuran sebelum reaksi dan produk hasil reaksi interesterifikasi dianalisis dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dalam analisis tersebut, dilakukan *pre-treatment* terhadap sampel sehingga dapat terukur konsentrasi asam oleat dan asam palmitat bebas yang berasal dari etil oleat dan etil palmitat bebas yang terkandung di dalam sampel (Gambar 4-2). Perubahan konsentrasi asam oleat dan asam palmitat pada sampel sebelum dan setelah reaksi menjadi dasar penentuan *yield* produk hasil reaksi. Pada perhitungan *yield* produk hasil reaksi, diasumsikan bahwa PPL bersifat selektif *sn*-1,3 absolut. Berdasarkan asumsi tersebut, peneliti menganggap bahwa asam palmitat yang terlepas adalah berasal dari posisi *sn*-1,3 tripalmitat dan kedudukannya dalam trigliserida tersebut digantikan oleh asam oleat yang berasal dari substrat etil oleat. Dengan demikian *yield* produk OPO yang dihasilkan dalam reaksi ini dapat dihitung menggunakan persamaan berikut.

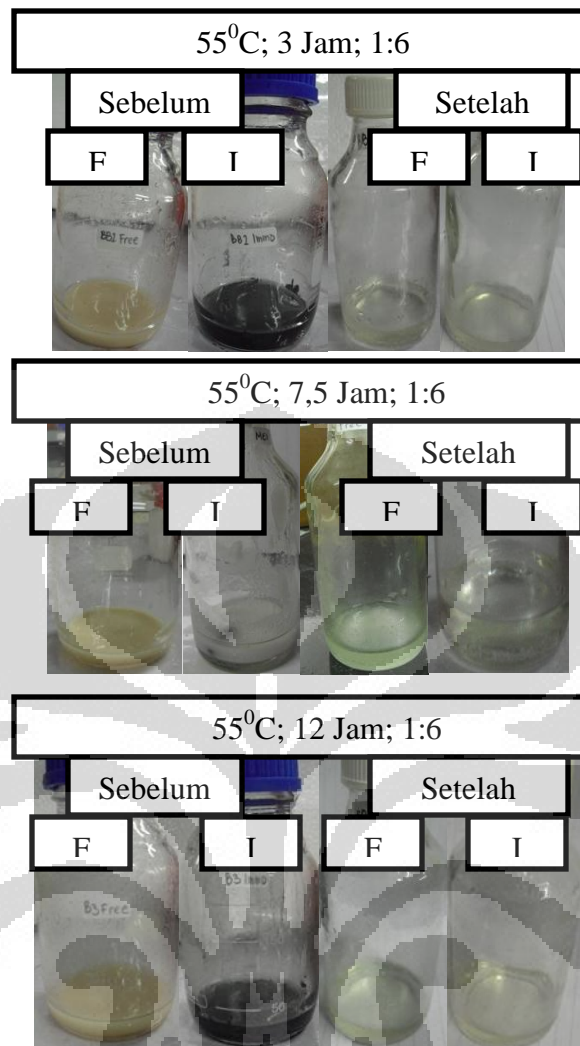
$$\%OPO = \frac{\frac{(\% \text{ volume asam palmitat setelah reaksi})}{2}}{\% \text{ volume tripalmitat}} \times 100\%$$



Gambar 4- 2. Sumber Asam Lemak Bebas dalam Sampel yang Terdeteksi saat Dilakukan Analisis HPLC

4.3.1. Efek Variasi Waktu

Untuk mengetahui pengaruh waktu terhadap persentase *yield* OPO yang dihasilkan, dilakukanlah reaksi dengan berbagai variasi waktu reaksi. Selain untuk mengetahui pengaruh waktu terhadap *yield* OPO, dilakukan juga penyelidikan mengenai perbandingan kestabilan *free* PPL dan *immobilized* PPL sebagai biokatalis dalam kaitannya dengan waktu reaksi. Sampel sebelum dan setelah filtrasi dari produk hasil reaksi dari percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 4-3. Pembahasan lebih lanjut dipaparkan pada subbab berikut ini.



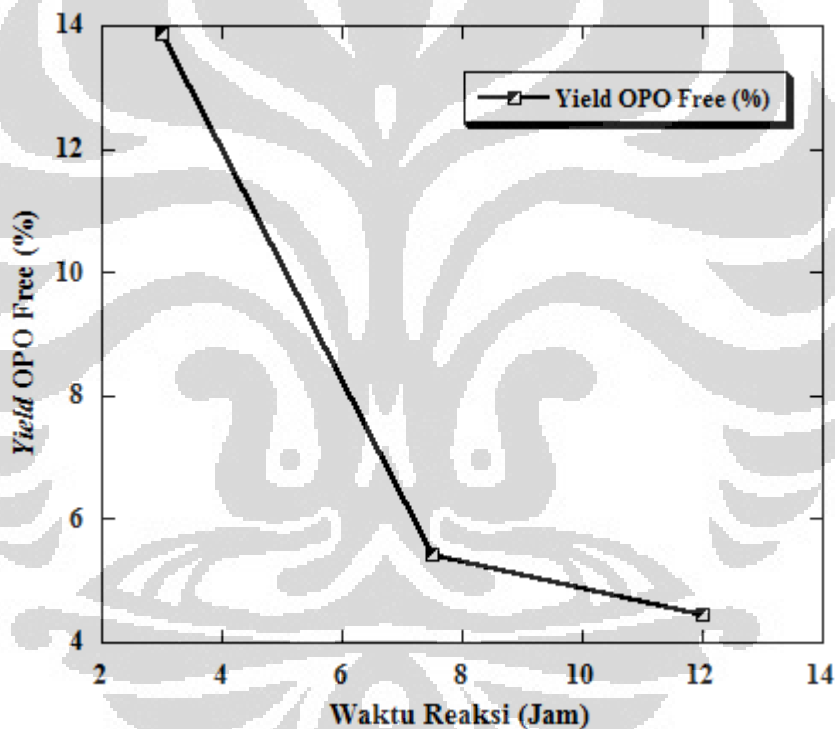
Gambar 4- 3. Sampel Sebelum dan Setelah Filtrasi dari Hasil Reaksi untuk Percobaan Variasi Waktu (F=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh *Free PPL*; I=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh *ImmobilizedPPL*)

4.3.1.1. *FreePorcine Pancreatic Lipase (PPL)*

Tabel 4-2 dan Gambar 4-4 menunjukkan hasil penelitian untuk menyelidiki pengaruh variasi waktu terhadap persentase *yield* produk utama 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol (OPO) dalam reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *porcine pancreatic lipase (PPL)* dalam bentuk bebas.

Tabel 4- 2. Pengaruh Variasi Waktu terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Free* PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Rasio Mol Substrat 1:6)

No. Eksperimen	Faktor		Sebelum Reaksi		Setelah Reaksi		<i>Yield</i> (%)
	C	Jam	Rasio Mol	Tripalmitat (%vol)	Etil Oleat (% vol)	Etil Palmitat (% vol)	
B1 <i>Free</i>	55	3	6	14.29	85.71	0.56	13.86
B2 <i>Free</i>	55	7.5	6	14.29	85.71	0.89	5.42
B3 <i>Free</i>	55	12	6	14.29	85.71	1.62	4.44



Gambar 4- 4. Pengaruh Variasi Waktu terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Free* PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Rasio Mol Substrat 1:6)

Pada Gambar 4-4 terlihat bahwa dalam reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL, semakin lama waktu reaksi maka persentase *yield* 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol (OPO) yang diperoleh semakin menurun. Penyebabnya adalah karena reaksi berlangsung di atas temperatur optimal kinerja PPL, yaitu 55⁰C. Selain itu, pada temperatur yang cukup tinggi tersebut, semakin lama waktu yang digunakan

maka semakin banyak PPL yang terinaktivasi dan semakin banyak produk yang terserang reaksi oksidasi. Dengan demikian, sebenarnya fungsi waktu dalam hal ini hubungannya bersifat tak langsung dengan *yield* OPO yang dihasilkan. Alasan lebih detail mengenai penyebab penurunan *yield* OPO ini dipaparkan pada poin-poin berikut.

(1) Inaktivasi Enzim

Berdasarkan Gambar 2-7, dapat dilakukan interpolasi bahwa profil penurunan aktivitas terhadap waktu pada temperatur 55°C (temperatur yang digunakan dalam penelitian ini) berada di antara temperatur 50°C dan 60°C . Sehingga, diketahui bahwa di antara menit ke-10 dan ke-30, sebenarnya *free* PPL yang digunakan dalam reaksi interesterifikasi pada temperatur 55°C mengalami penurunan aktivitas secara drastis (sebesar 70% - 90%). Dengan demikian, kira-kira setelah jam pertama, *free* PPL sudah berhenti mengkatalis reaksi. Sedangkan, pada penelitian ini, waktu reaksi yang digunakan adalah 3 jam, 7,5 jam dan 12 jam. Waktu reaksi tersebut telah melebihi waktu optimal bagi lipase untuk mengkatalis reaksi pada temperatur 55°C . Sehingga *yield* OPO yang diperoleh di temperatur 55°C pada waktu reaksi yang digunakan tersebut tidak akan meningkat.

(2) Reaksi Oksidasi

Selain karena inaktivasi enzim, hal lain yang menyebabkan penurunan *yield* OPO adalah terjadinya reaksi oksidasi di dalam campuran reaksi. Reaksi oksidasi ini dapat mengubah struktur kimia asam lemak, termasuk asam palmitat. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa penentuan *yield* trigliserida OPO yang terbentuk adalah berdasarkan konsentrasi asam palmitat yang terlepas dari *sn*-1,3. Terdapat kemungkinan bahwa asam palmitat yang terlepas mengalami reaksi oksidasi. Peristiwa ini menyebabkan beberapa asam palmitat tidak terdeteksi keberadaannya oleh HPLC sehingga konsentrasi asam palmitat yang terdeteksi lebih rendah dibandingkan dengan asam palmitat yang sebenarnya terlepas dari

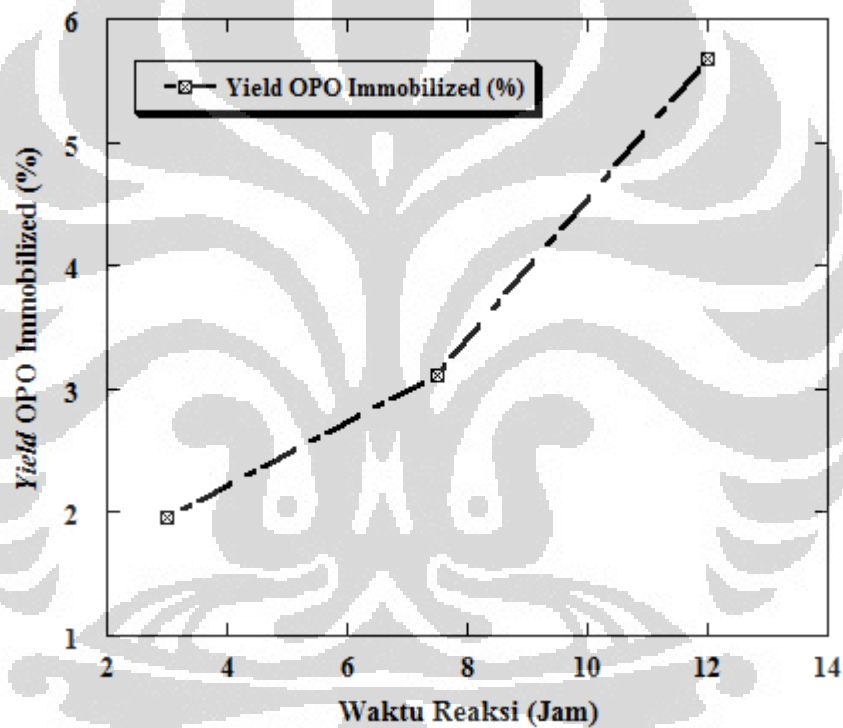
tripalmitat. Reaksi oksidasi yang terjadi tidak hanya dapat terjadi pada asam palmitat yang telah terlepas dari tripalmitat, namun juga dapat terjadi pada asam lemak yang terdapat dalam trigliserida produk utama yang terbentuk, yaitu 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol (OPO). Oksidasi yang menyerang OPO ini terjadi karena tidak terdapat antioksidan di dalam produk HMFS tersebut (Nielsen, et al., 2006). Meski oksidasi yang terjadi berjalan pada laju yang lebih lambat dibandingkan laju produksi OPO. Namun demikian, karena tidak terjadi lagi sintesis OPO dan oksidasi terus berjalan, maka *yield* OPO semakin lama semakin menurun. Mekanisme reaksi oksidasi yang menyerang asam lemak secara umum dapat dilihat pada Gambar 2-8.

4.3.1.2. Immobilized Porcine Pancreatic Lipase (PPL)

Pada Tabel 4-3 dan Gambar 4-5, ditunjukkan bahwa penggunaan *immobilized* PPL sebagai biokatalis dalam reaksi interesterifikasi menyebabkan *yield* OPO meningkat seiring dengan meningkatnya waktu reaksi yang digunakan. Hal ini terjadi karena karbon aktif yang digunakan sebagai *support* dalam menjebak (mengimobilisasi) PPL memiliki stabilitas termal yang tinggi (Boonpoke, et al., 2011)(Nik, et al., 2006)(Balducci, et al., 2006). Pada tahun 2006, Nik, et al., melakukan penyelidikan mengenai karakteristik karbon aktif yang berasal dari batok kelapa sawit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa karbon aktif memiliki stabilitas termal optimum pada temperature sekitar 600⁰C. Seperti telah dijelaskan bahwa pada temperatur 55⁰C, setelah jam pertama, *free* PPL akan mengalami kehilangan aktivitas yang disebabkan karena terjadinya inaktivasi enzim. Namun, hal ini tidak berlaku bagi PPL yang telah terimobilisasi di dalam karbon aktif. Penyebabnya adalah karena PPL yang telah digunakan telah terimobilisasi di dalam karbon aktif sehingga terlindung dari temperatur lingkungan yang dapat menyebabkan *free* PPL kehilangan aktivitasnya pada jam pertama. Meskipun terdapat terjadi oksidasi yang menyerang produk OPO yang telah dihasilkan, namun laju reaksi oksidasi tersebut lebih lambat dibandingkan laju produksinya. Dengan demikian, pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL, *yield* OPO meningkat seiring berjalannya waktu.

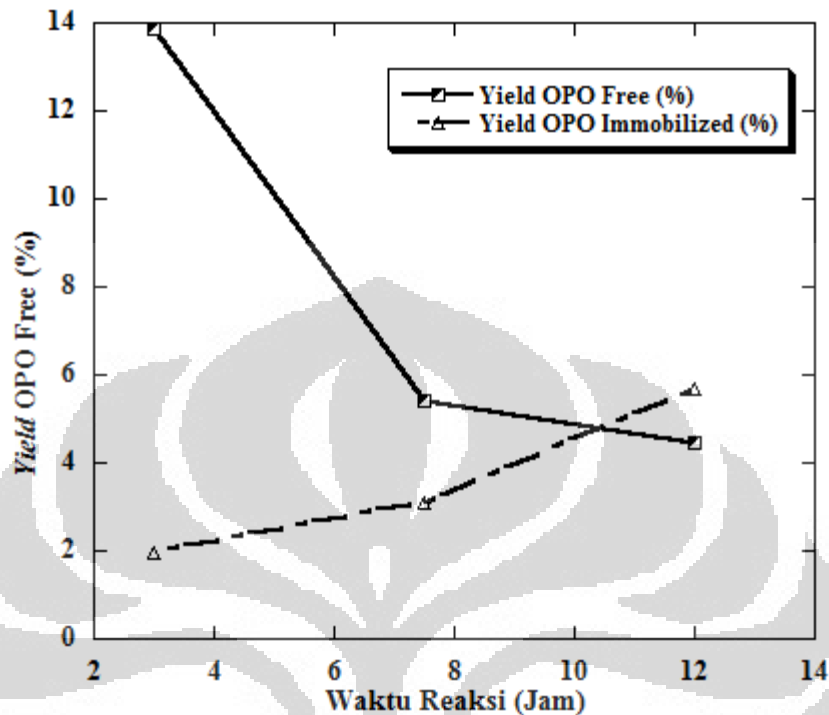
Tabel 4- 3. Pengaruh Variasi Waktu terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Immobilized*PPL sebagai Biokatalis(Temperatur 55⁰C; Rasio Mol Substrat 1:6)

No. Eksperimen	Faktor		Sebelum Reaksi			Setelah Reaksi	
	C	Jam	Rasio Mol	Tripalmitat(% vol)	Etil Oleat(% vol)	Etil Palmitat (% vol)	<i>Yield</i> (%)
B1 Immo	55	3	6	14.29	85.71	0.56	1.96
B2 Immo	55	7.5	6	14.29	85.71	0.89	3.11
B3 Immo	55	12	6	14.29	85.71	1.62	5.67



Gambar 4- 5. Pengaruh Variasi Waktu terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Immobilized*PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Rasio Mol Substrat 1:6)

4.3.1.3. Perbandingan *Free* PPL dan *Immobilized* PPL



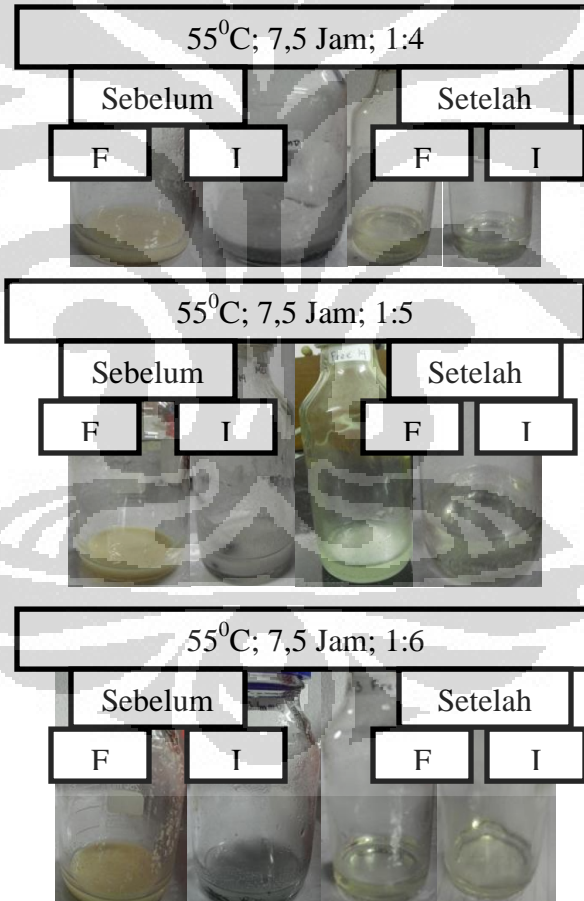
Gambar 4- 6. Perbandingan Pengaruh Variasi Waktu terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Free*PPL dan *Immobilized* PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Rasio Mol Substrat 1:6)

Pada gambar di atas terlihat bahwa penggunaan *immobilized* PPL dan *free* PPL memberikan dampak yang sangat berbeda terhadap *yield* OPO yang dihasilkan terkait waktu yang digunakan. Pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL, waktu reaksi dan *yield* OPO memiliki hubungan negatif. Sedangkan pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL, waktu reaksi dan *yield* OPO memiliki hubungan positif. Hal ini menunjukkan bahwa *immobilized* PPL memiliki kestabilan termal yang lebih tinggi dibandingkan dengan *free* PPL. Namun demikian, dapat dilihat pada gambar di atas bahwa pada umumnya reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL menghasilkan *yield* OPO yang lebih besar dibandingkan *yield* OPO pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL. Hal ini terjadi karena jumlah enzim PPL yang terdapat pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL hanya 6% dari massa

biokatalis yang digunakan. Sementara pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL, keseluruhan (100%) biokatalis yang digunakan adalah berupa enzim PPL.

4.3.2. Efek Rasio Mol Substrat

Untuk mengetahui pengaruh rasio mol substrat terhadap persentase *yield* OPO yang dihasilkan, dilakukanlah reaksi dengan berbagai variasi rasio mol substrat. Selain untuk mengetahui pengaruh rasio mol substrat terhadap *yield* OPO, dilakukan juga penyelidikan mengenai perbandingan kestabilan *free* PPL dan *immobilized* PPL sebagai biokatalis dalam kaitannya dengan rasio mol substrat. Sampel sebelum dan setelah filtrasi dari produk hasil reaksi dari percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 4-7. Pembahasan lebih lanjut dipaparkan pada subbab berikut ini.



Gambar 4- 7. Sampel Sebelum dan Setelah Filtrasi dari Hasil Reaksi untuk Percobaan Variasi Rasio Mol Substrat (F=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh *Free* PPL; I=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh *Immobilized* PPL)

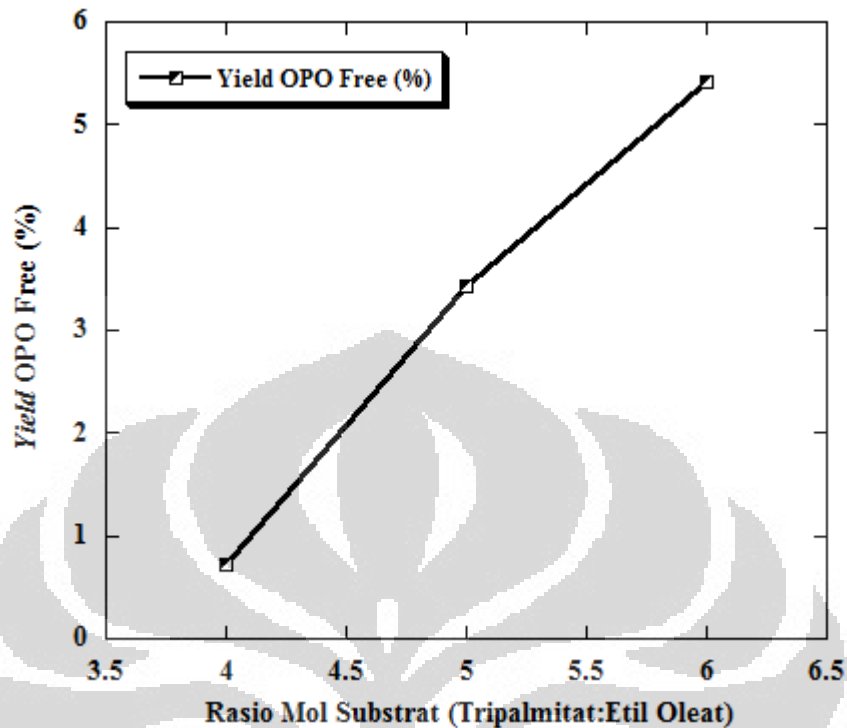
4.3.2.1. Free Porcine Pancreatic Lipase (PPL)

Komposisi triasilgliserol dari produk yang dihasilkan dalam reaksi interesterifikasi enzimatik tergantung pada rasio substrat (donor asil/ triasilgliserol) setelah kesetimbangan reaksi tercapai. Berdasarkan data penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 4-4 dan Gambar 4-8, terlihat bahwa pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh PPL dalam bentuk *free*, semakin tinggi nilai rasio mol substrat yang digunakan, maka semakin besar *yield* 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol yang diperoleh. Peristiwa ini terjadi karena beberapa hal, yaitu

- (1) Peningkatan nilai rasio mol substrat juga menyebabkan pergeseran kesetimbangan reaksi ke sisi produk dan meningkatkan penggabungan asil.
- (2) Peningkatan rasio mol substrat menyebabkan terjadinya peningkatan transfer massa karena viskositas dalam campuran reaksi menurun. Dengan demikian, laju reaksi menjadi semakin tinggi.

Tabel 4- 4. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap Yield OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan Free PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Waktu Reaksi 7,5 Jam)

No. Eksperimen	Faktor			Sebelum Reaksi		Setelah Reaksi	
	C	Jam	Rasio Mol	Tripalmitat (%vol)	Etil Oleat (% vol)	Etil Palmitat (% vol)	Yield (%)
C1 <i>Free</i>	55	7.5	4	20.00	85.71	0.56	0.72
C2 <i>Free</i>	55	7.5	5	16.67	85.71	0.89	3.42
C3 <i>Free</i>	55	7.5	6	14.29	85.71	1.62	5.42



Gambar 4- 8. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Free* PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Waktu Reaksi 7,5 Jam)

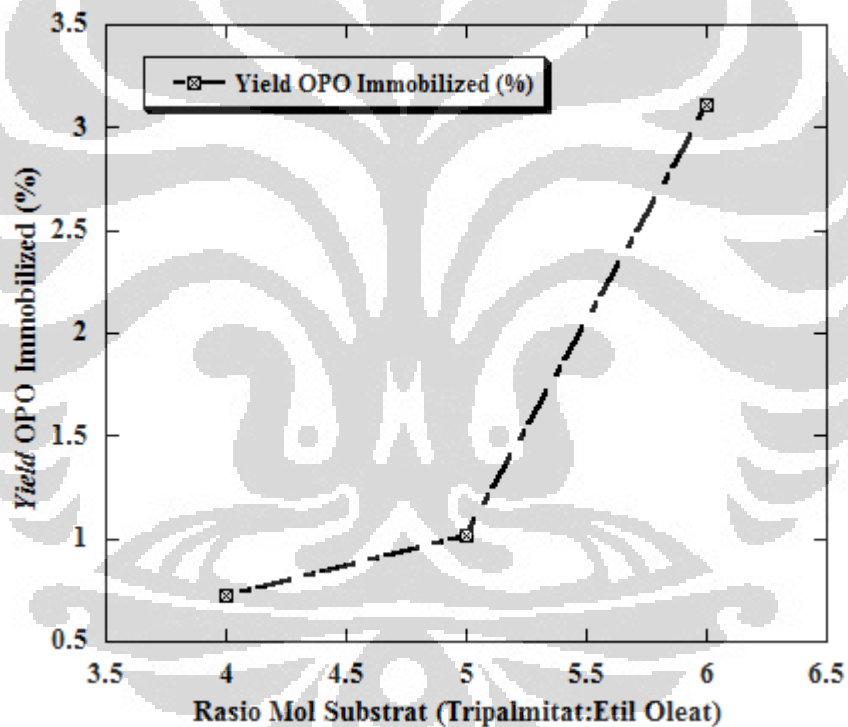
4.3.2.2. Immobilized *Porcine Pancreatic Lipase* (PPL)

Pada Tabel 4-5 dan Gambar 4-9 terlihat bahwa pada reaksi interesterifikasi enzimatis yang dikatalis oleh PPL terimobilisasi, semakin tinggi nilai rasio mol substrat yang digunakan maka persentase *yield* produk OPO yang dihasilkan juga semakin tinggi. Seperti pada reaksi yang dikatalis oleh *free* PPL, penyebab terjadinya peristiwa ini adalah karena dua hal, yaitu

- (1) Peningkatan nilai rasio mol substrat juga menyebabkan pergeseran kesetimbangan reaksi ke sisi produk dan meningkatkan penggabungan asil.
- (2) Peningkatan rasio mol substrat menyebabkan terjadinya peningkatan transfer massa karena viskositas dalam campuran reaksi menurun. Dengan demikian, laju reaksi menjadi semakin tinggi.

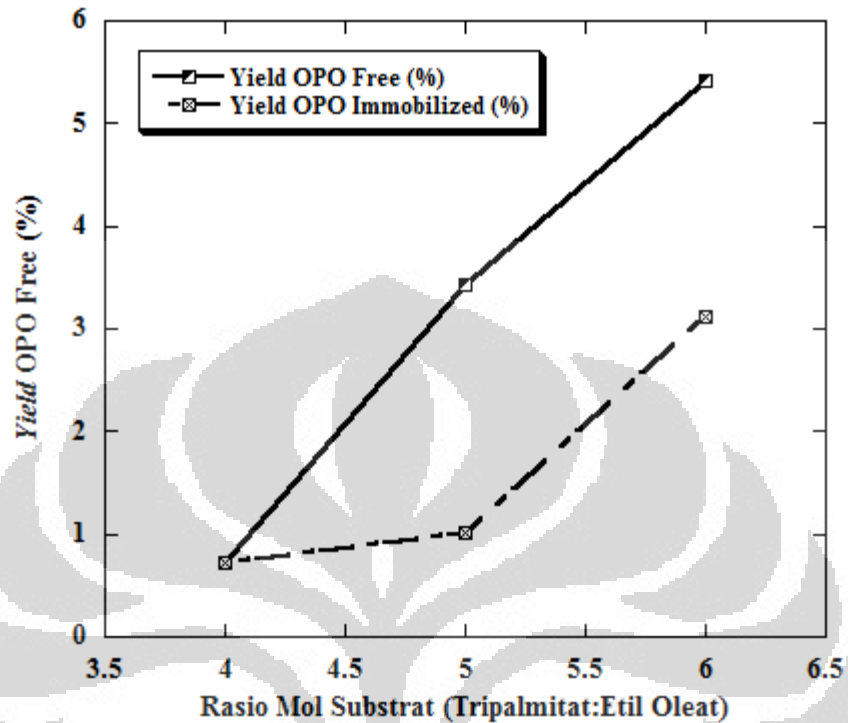
Tabel 4- 5. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Immobilized* PPL sebagai Biokatalis (Temperatur 55⁰C; Waktu Reaksi 7,5 Jam)

No. Eksperimen	Faktor		Sebelum Reaksi			Setelah Reaksi	
	C	Jam	Rasio Mol	Tripalmitat (%vol)	Etil Oleat (% vol)	Etil Palmitat (% vol)	<i>Yield</i> (%)
C1 Immo	60	7.5	4	20.00	80.00	0.29	0.72
C2 Immo	60	7.5	5	16.67	83.33	1.14	1.02
C3 Immo	60	7.5	6	14.29	85.71	1.55	3.11



Gambar 4- 9. Pengaruh Rasio Mol Substrat terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Immobilized*PPL sebagai Biokatalis (Temperatur : 55⁰C; Waktu Reaksi : 7,5 Jam)

4.3.2.3. Perbandingan *Free* PPL dan *Immobilized* PPL

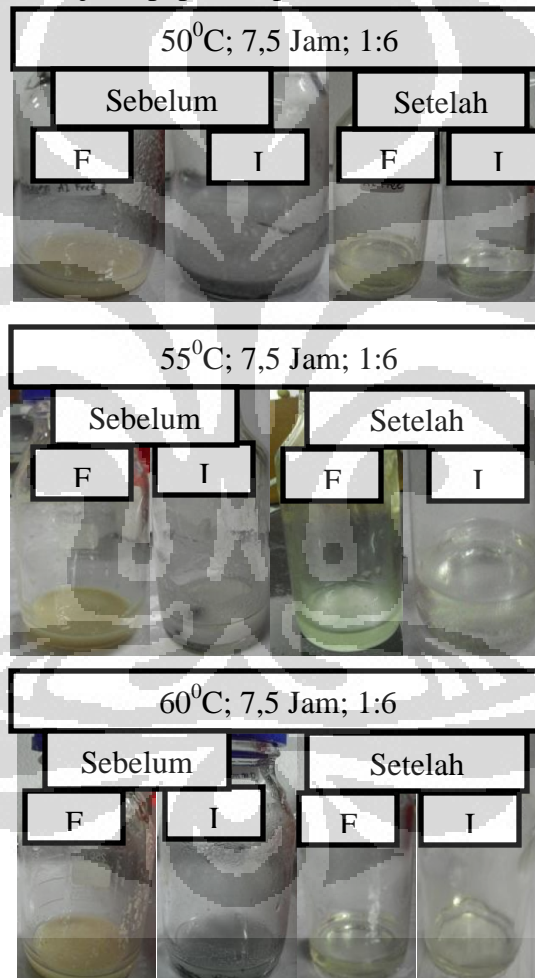


Gambar 4- 10. Perbandingan Pengaruh Variasi Rasio Mol Substrat terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Immobilized* PPL dan *Immobilized* PPL sebagai Biokatalis (Temperatur : 55⁰C; Waktu Reaksi : 7,5 Jam)

Pada gambar di atas terlihat bahwa baik *free* PPL dan *immobilized* PPL, keduanya memiliki hubungan positif terhadap nilai rasio mol substrat (tripalmitat : etil oleat). Namun demikian, dapat dilihat pada gambar di atas bahwa pada umumnya reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL menghasilkan *yield* OPO yang lebih besar dibandingkan *yield* OPO pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL. Hal ini terjadi karena jumlah enzim PPL yang terdapat pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL hanya 6% dari massa biokatalis yang digunakan. Sementara pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL, keseluruhan (100%) biokatalis yang digunakan adalah berupa enzim PPL.

4.3.3. Efek Temperatur Reaksi

Untuk mengetahui pengaruh rasio mol substrat terhadap persentase *yield* OPO yang dihasilkan, dilakukanlah reaksi dengan berbagai variasi rasio mol substrat. Selain untuk mengetahui pengaruh rasio mol substrat terhadap *yield* OPO, dilakukan juga penyelidikan mengenai perbandingan kestabilan *free* PPL dan *immobilized* PPL sebagai biokatalis dalam kaitannya dengan rasio mol substrat. Sampel sebelum dan setelah filtrasi dari produk hasil reaksi dari percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 4-11. Pembahasan lebih lanjut dipaparkan pada subbab berikut ini.



Gambar 4- 11. Sampel Sebelum dan Setelah Filtrasi dari Hasil Reaksi untuk Percobaan Variasi Rasio Temperatur (F=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh *Free* PPL; I=Produk Hasil Reaksi yang dikatalis oleh *Immobilized* PPL)

4.3.3.1. Free Porcine Pancreatic Lipase (PPL)

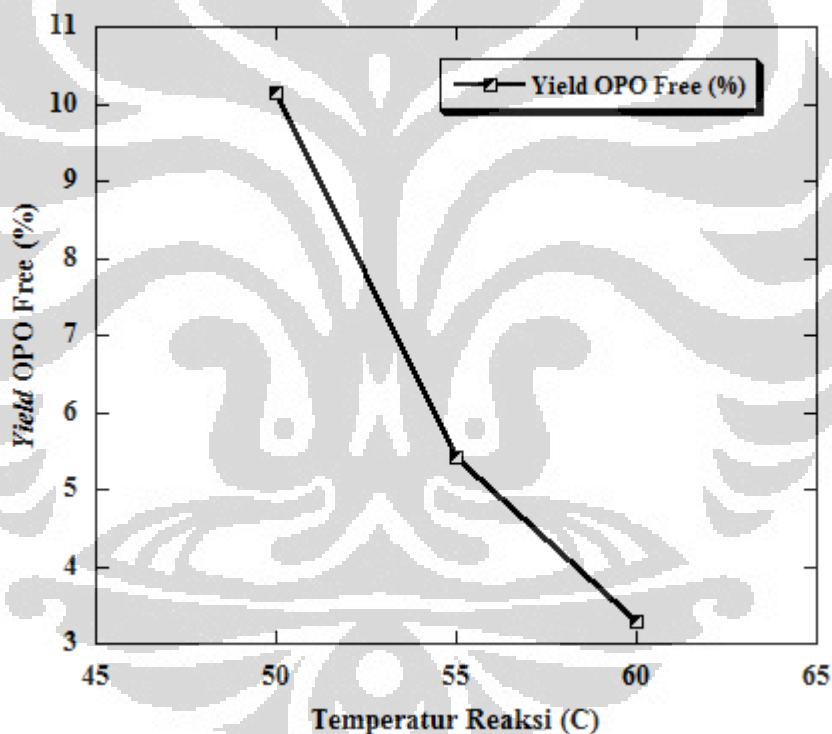
Peningkatan temperatur reaksi biasanya menghasilkan efek percepatan, berdasarkan hukum Arrhenius, selama reaksi yang dikatalis oleh enzim. Tingginya temperatur menyebabkan meningkatnya *yield* untuk reaksi endotermik karena pergeseran kesetimbangan termodinamik. Pada peningkatan temperatur, operasi dapat berjalan dengan mudah, karena meningkatnya temperatur dapat menurunkan viskositas larutan. Namun, di sisi lain, kenaikan temperatur juga menyebabkan meningkatnya laju inaktivasi lipase (Martinek, 1993).

Pada Tabel 4-6 dan Gambar 4-12 terlihat bahwa peningkatan temperatur reaksi menyebabkan penurunan persentase *yield* produk 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol (OPO) yang diperoleh. Meskipun dengan peningkatan temperatur dapat menyebabkan penurunan viskositas campuran dimana pada keadaan tersebut interesterifikasi dapat berlangsung secara cepat (Wang, et al., 2006), namun ternyata inaktivasi PPL lebih besar pengaruhnya terhadap persentase *yield* produk OPO yang dihasilkan.

Dari Gambar 2-7, diketahui bahwa pada temperatur 50⁰C, hingga menit ke-30 *free* PPL mengalami penurunan aktivitas secara drastis hingga 70%. Sementara itu, pada temperatur 60⁰C, hingga menit ke-10, *free* PPL mengalami penurunan aktivitas secara drastis hingga 90%. Dengan menggunakan Gambar 4-3, dapat dilakukan interpolasi penurunan aktivitas untuk *free* PPL pada temperatur 55⁰C. Berdasarkan interpolasi, diketahui bahwa sebenarnya di antara menit ke-10 dan ke-30 enzim PPL yang digunakan dalam reaksi interesterifikasi pada temperature 55⁰C mengalami penurunan aktivitas secara drastis. Hal ini menjadi penyebab penurunan *yield* OPO seiring meningkatnya temperatur reaksi yang digunakan.

Tabel 4- 6. Pengaruh Temperatur terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Free* PPL sebagai Biokatalis (Waktu Reaksi 7,5 Jam; Rasio Mol 1:6)

No. Eksperimen	Faktor			Sebelum Reaksi		Setelah Reaksi	
	C	Jam	Rasio Mol	Tripalmitat (%vol)	Etil Oleat (% vol)	Etil Palmitat (% vol)	Yield (%)
A1 <i>Free</i>	50	7.5	6	20.00	85.71	0.56	10.15
A2 <i>Free</i>	55	7.5	6	16.67	85.71	0.89	5.425
A3 <i>Free</i>	60	7.5	6	14.29	85.71	1.62	3.29



Gambar 4- 12. Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap *Yield* OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Free* PPL sebagai Biokatalis

4.3.3.2 Immobilized *Porcine Pancreatic Lipase* (PPL)

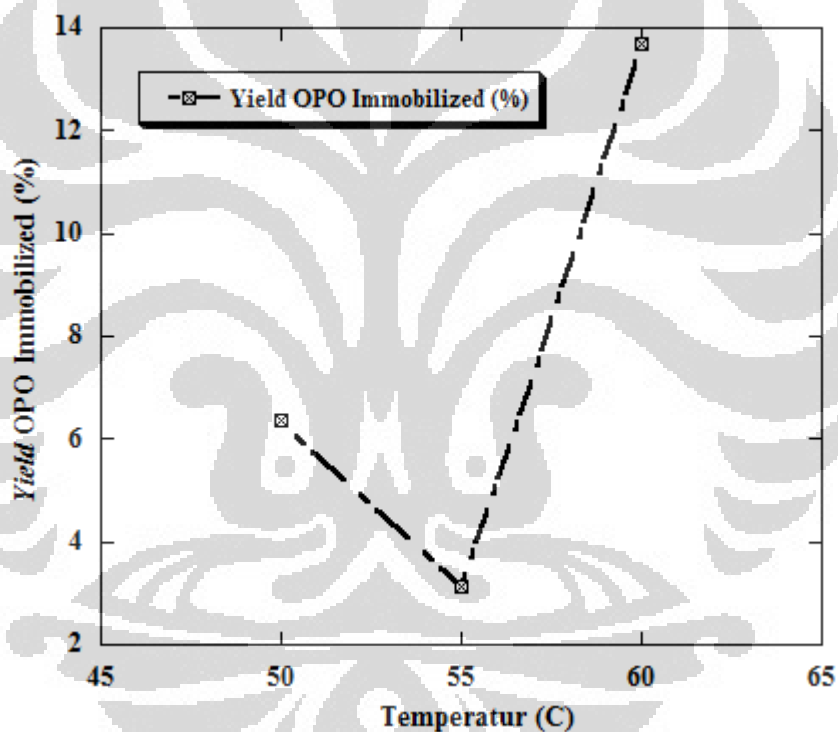
Pada Tabel 4-7 dan Gambar 4-13, dapat dilihat bahwa dalam reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh PPL terimobilisasi, pada umumnya semakin

tinggi temperatur yang digunakan maka semakin besar persentase *yield* produk utama 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl gliserol yang diperoleh. Hal ini terjadi karena karbon aktif yang digunakan sebagai *support* dalam menjebak (mengimobilisasi) PPL memiliki stabilitas termal yang tinggi (Boonpoke, et al., 2011)(Nik, et al., 2006)(Balducci, et al., 2006). Pada tahun 2006, Nik, et al., melakukan penyelidikan mengenai karakteristik karbon aktif yang berasal dari batok kelapa sawit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa karbon aktif memiliki stabilitas termal optimum pada temperature sekitar 600⁰C. Dengan demikian, enzim PPL yang telah terjebak di dalam karbon aktif terlindungi dari pengaruh temperatur lingkungan yang dapat menyebabkan inaktivasi pada bagian *active site* dari enzim. Di samping itu, peningkatan temperatur dapat menyebabkan penurunan viskositas campuran dimana pada keadaan tersebut interesterifikasi dapat berlangsung secara cepat (Wang, et al., 2006). Dengan demikian, pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL, seiring dengan peningkatan temperatur reaksi yang digunakan, maka semakin tinggi *yield* OPO yang diperoleh.

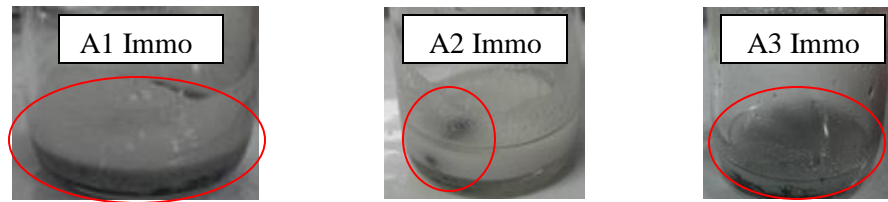
Pada grafik terlihat bahwa untuk nomor reaksi A2 Immo, *yield* OPO yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan *yield* OPO yang dihasilkan oleh nomor reaksi A1 Immo. Hal ini terjadi karena *immobilized* PPL yang digunakan pada A2 Immo bentuknya berupa butiran besar (granular), tidak seperti *immobilized* PPL yang digunakan pada A1 Immo dan A3 Immo yang bentuknya berupa butir-butir kecil (serbuk). Sehingga luas area kontak pada *immobilized* lipase yang digunakan saat dilakukan reaksi interesterifikasi A2 Immo lebih kecil dibandingkan pada reaksi A1 Immo dan A3 Immo. Karena luas kontak enzimnya lebih kecil, maka kinerja katalisis pada A2 Immo lebih rendah dibandingkan A1 Immo dan A3 Immo. Dengan demikian, *yield* produk OPO yang dihasilkan lebih rendah. Peristiwa ini terjadi karena pada saat tahap imobilisasi tidak dilakukan penyeragaman ukuran *immobilized* PPL. Fenomena ini dapat dilihat pada Gambar 4-14.

Tabel 4- 7. Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap Yield OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan Immobilized PPL sebagai Biokatalis (Waktu Reaksi 7,5 Jam ; Rasio Mol Substrat 1:6)

No. Eksperimen	Faktor			Sebelum Reaksi		Setelah Reaksi	
	C	Jam	Rasio Mol	Tripalmitat (%vol)	Etil Oleat (% vol)	Etil Palmitat (% vol)	Yield (%)
A1 Immo	50	7.5	6	20.00	85.71	0.56	6.37
A2 Immo	55	7.5	6	16.67	85.71	0.89	3.115
A3 Immo	60	7.5	6	14.29	85.71	1.62	13.685

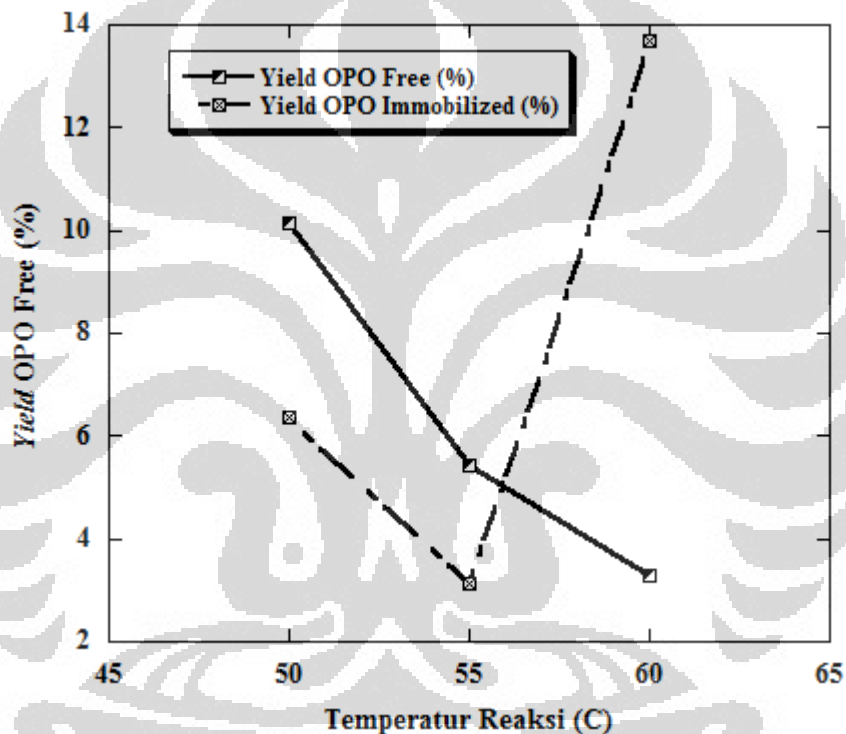


Gambar 4- 13. Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap Yield OPO pada Reaksi Interesterifikasi dengan Immobilized PPL sebagai Biokatalis (Waktu Reaksi 7,5 Jam ; Rasio Mol Substrat 1:6)



Gambar 4- 14. Kondisi Sampel Setelah Reaksi pada Nomor Reaksi A1 Immo (*Immobilized PPL* tercampur rata), A2 Immo (*Immobilized PPL* terkonsentrasi di satu tempat) dan A3 Immo (*Immobilized PPL* tercampur rata)

4.3.3.3. Perbandingan *Free PPL* dan *Immobilized PPL*



Gambar 4- 15. Perbandingan Pengaruh Temperatur Reaksi terhadap *Yield OPO* pada Reaksi Interesterifikasi dengan *Immobilized PPL* dan *Immobilized PPL* sebagai Biokatalis

Pada gambar di atas terlihat bahwa penggunaan *immobilized PPL* dan *free PPL* memberikan dampak yang sangat berbeda terhadap *yield OPO* yang dihasilkan terkait temperature reaksi yang digunakan. Pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh PPL dalam bentuk *free*, temperature reaksi memiliki hubungan negatif dengan *yield OPO* yang dihasilkan. Sementara pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis dengan PPL terimobilisasi, temperatur reaksi memiliki hubungan positif dengan *yield OPO* yang dihasilkan. Berdasarkan data penelitian yang diperoleh juga terlihat bahwa

persentase *yield* produk OPO tertinggi diperoleh pada temperatur reaksi 60⁰C saat digunakan PPL terimobilisasi sebagai katalis dalam interesterifikasi. Namun demikian, dapat dilihat pada gambar di atas bahwa pada umumnya reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL menghasilkan *yield* OPO yang lebih besar dibandingkan *yield* OPO pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL. Hal ini terjadi karena jumlah enzim PPL yang terdapat pada reaksi yang dikatalis oleh *immobilized* PPL hanya 6% dari massa biokatalis yang digunakan. Sementara pada reaksi interesterifikasi yang dikatalis oleh *free* PPL, keseluruhan (100%) biokatalis yang digunakan adalah berupa enzim PPL.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

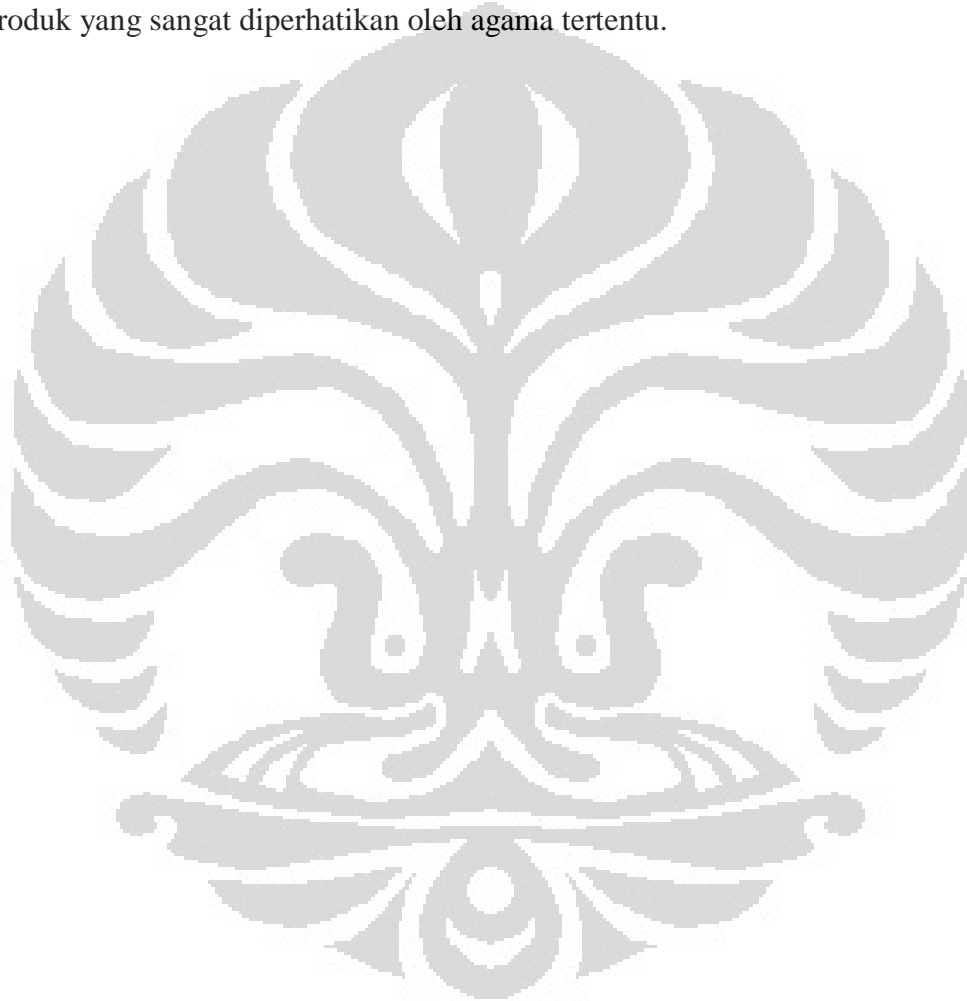
Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah

- Dari segi enzim *loading* dan konversi yang dihasilkan, metode *entrapment* dengan *support* karbon aktif lebih unggul dibandingkan metode dan *support* imobilisasi lainnya.
- Semakin lama waktu reaksi maka *yield* produk yang dihasilkan pada reaksi yang dikatalis oleh enzim bebas akan semakin menurun.
- Semakin lama waktu reaksi maka *yield* produk yang dihasilkan pada reaksi yang dikatalis oleh enzim yang terjebak pada karbon aktif akan semakin meningkat.
- Semakin tinggi temperatur reaksi maka *yield* produk yang dihasilkan pada reaksi yang dikatalis oleh enzim bebas akan semakin menurun.
- Semakin tinggi temperatur reaksi maka *yield* produk yang dihasilkan pada reaksi yang dikatalis oleh enzim yang terjebak pada karbon aktif akan semakin meningkat.
- Semakin besar rasio mol substrat yang digunakan maka *yield* produk yang dihasilkan pada reaksi yang dikatalis oleh enzim bebas ataupun enzim yang terjebak pada karbon aktif akan semakin meningkat.
- Enzim terimobilisasi memiliki stabilitas termal lebih tinggi dibandingkan enzim bebas sehingga dapat memperlambat terjadinya penurunan aktivitas katalitiknya.

5.2. Saran

Untuk penelitian-penelitian yang akan datang mengenai sintesis *Human Milk Fat Substitute* (HMFS), diharapkan dilakukan variasi terhadap metode dan *support* imobilisasi yang digunakan. Hal ini sangat penting dilakukan mengingat penggunaan

enzim terimobilisasi dapat menekan jauh pengeluaran biaya untuk mensintesis HMFS. Selain itu, juga diharapkan penelitian selanjutnya dapat mensintesis HMFS dengan trigliserida yang berbeda dari yang dihasilkan dalam penelitian ini, contohnya HMFS yang mengandung asam lemak omega-3. Selain itu, diharapkan juga penelitian selanjutnya dapat menggunakan lipase selektif *sn*-1,3 yang bukan berasal dari *porcine*. Hal ini sangat penting mengingat status halal dan haram dari suatu produk yang sangat diperhatikan oleh agama tertentu.



DAFTAR PUSTAKA

- Adameczak, M. (2004). The Application of Lipases in Modifying the Composition, Structure and Properties of Lipids – A Review. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*, 13, 3–10.
- Aegerter, M. A., & Mennig, M. (2004). *Sol-gel technologies for glass producers and users*. New York: Springerlink.
- Aritonang, E. (2007). *Peran ASI Bagi Bayi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Bagi, K., Simon, L. M., & SzajPni, B. (1997). Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 20.
- Balducci, A., Dugas, R., Taberna, P., Simon, P., D.Pl´ee, Mastragostino, M., et al. (2006). High temperature carbon–carbon supercapacitor using ionic liquid as electrolyte.
- Basiron, Y. (2005). Palm Oil. In F. Shahidi, *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Boonpoke, A., Chiarakorn, S., Laosiripojana, N., Towprayoon, S., & Chidthaisong, A. (2011). Synthesis of Activated Carbon and MCM-41 from Bagasse and Rice Husk and their Carbon Dioxide Adsorption Capacity . 2.
- Chandler, Quinlan, & McNeill. (1998). Lipase Catalyzed synthesis of chiral triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1513–1518.
- Chang, S.-W., Shaw, J.-F., Yang, K.-H., Chang, S.-F., & Shieh, C.-J. (2008). Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM. *Bioresource Technology*, 99, 2800–2805.
- Ghaly, A., Dave, D., Brooks, M., & Budge, S. (2010). Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review . *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 54-76.
- Goel, M. K. (1994). *Immobilized Enzymes*. Retrieved 4 19, 2011, from <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/goel2nd.htm#A1.1.2>

- Huang, X.-J., Ge, D., & Xu, Z.-K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, *43*, 3710–3718.
- Huang, X.-J., Yu, A.-G., & Xu, Z.-K. (2008). Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresource Technology*, *99*, 5459–5465.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Chile: Springer Science + Business Media B.V.
- Irimescu, Furihata, Hata, Y, I., & Yamane. (2001). Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, *78*, 743–748.
- Karabulut, I., Turan, S., Vura, H., & Kayahan, M. (2007). Human Milk Fat Substitute Produced by Enzymatic Interesterification of Vegetable Oil Blend. *Food Technol. Biotechnol.*, *4*, 434–438.
- Karra-Châabouni, M., Bouaziz, I., Boufi, S., Rego, A. M., & Gargouri, Y. (2008). Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *66*, 168–177.
- Kharrat, N., Ali, Y. B., Marzouk, S., Gargouri, Y.-T., & Karra-Châabouni, M. (2011). Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *46*.
- Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., & Mojović, L. V. (2004). Immobilized Lipases as Practical Catalysts. *APTEFF*, *35*, 1-280.
- Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., & Prodanovic, R. (2006). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*, *30*, 269–278.
- Lee, G., & Hongil Joo, J.-h. L. (2008). The use of polyaniline nanofibre as a support for lipase mediated reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *54*, 116–121.

- Lee, J. H., Son, J. M., Akoh, C. C., Kim, M. R., & Lee, K.-T. (2010). Optimized synthesis of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *New Biotechnology*, 38-45.
- Lei, L., Bai, Y., Li, Y., Yi, L., Yang, Y., & Xia, C. (2009). Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 252–258.
- Li, S.-F., & Wen-TengWu. (2009). Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 45.
- Liu, Y.-Y., Xu, J.-H., Wu, H.-Y., & Shen, D. (2004). Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. *110*.
- Martinek, K. (1993). Need for Thermostability, Its Benefits and Main Strategies for Thermostabilization. In M. N. Gupta, *Thermostability of Enzymes* (pp. 76-82). Berlin: Springer-Verlag.
- McGillivray, I. H. (1930). The Inactivation of Pancreatic Lipase By Heat.
- Mendes, A. A., Giordano, R. C., Giordano, R. d., & Castro, H. F. (2011). Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 109–115.
- Meunier, S. M., & Legge, R. L. (2010). Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 54–58.
- Miletic, N., Rohandi, R., Vukovic, Z., Nastasovic, A., & Loos, K. (2009). Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization. *Reactive & Functional Polymers*, 69, 68–75.
- Moreno-Pirajan, J., & Giraldo, L. (2010). Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 55–62.

- Nielsen, N. S., Yang, T., Xu, X., & Jacobsen, C. (2006). Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food Chemistry*, 53–60.
- Nieto, I., Rocchietti, S., Ubiali, D., Speranza, G., Morelli, C. F., Fuentes, I. E., et al. (2005). Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract Enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 514–520.
- Nik, W. B., Rahman, M. M., Yusof, A., Ani, F., & Adnan, C. C. (2006). Production of Activated Carbon from Palm Oil Shell Waste and Its Adsorption Characteristics. *Proceedings of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology*, 1. Johor.
- Nunes, G. S., & Marty, J.-L. (2006). Immobilization of Enzymes on Electrodes. In J. M. Guisan, *Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Oxford University. (2011). *Mother and Child Nutrition in the Tropics and Subtropics*. Retrieved March 6, 2011, from Oxford Journals: www.oxfordjournals.org/tropej/online/mcnts_chap5.pdf
- Polyakov, N., Dubinin, M., Kataeva, L., & Petuhova, G. (1993). Porous structure and adsorption properties of active carbon. *10*.
- Sahin, N., Akoh, C. C., & Karaali, A. (2005). Enzymatic Production of Human Milk Fat Substitutes Containing [gamma]-Linolenic Acid: Optimization of Reactions by Response Surface Methodology. *82*, 549-557.
- Sahin, N., Akoh, C. C., & Karaali, A. (2005). Human Milk Fat Substitutes Containing Omega-3 Fatty Acids. *J. Agric. Food Chem*, 54, 3717–3722.
- Sahin, N., Akoh, C. C., & Karaali, A. (2005). Lipase-Catalyzed Acidolysis of Tripalmitin with Hazelnut Oil Fatty Acids and Stearic Acid To Produce Human Milk Fat Substitutes. *Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5779–5783.
- Salis, A., Sanjust, E., Solinas, V., & Monduzzi, M. (2003). Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. *24–25*, 75–82.




- Scott, C. E. (2009). *Betapol™ structured lipid – A close match to mother’s milk for a healthy start to life*. Netherlands: Wellness Foods Europe.
- Scrimgeour, C. (2005). Chemistry of Fatty Acids. In F. Shahidi, *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products* (Vol. 6). Dundee: John Wiley & Sons, Inc.
- Shah, P., Sridevi, N., Prabhune, A., & Ramaswamy, V. (2008). Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15. *Microporous and Mesoporous Materials*, 116.
- Shapiro, K. (2005, November 11). (Princeton University) Retrieved March 3, 2011, from Princeton University Blog Service: http://blogs.princeton.edu/chm333/f2005/group3/archives/02_novalipid/interesterification/
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R., & Langen, L. M. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates. In J. M. Guisan, *Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Silva, R. C. (2009). Physical properties of structured lipids from lard and soybean oil produced by enzymatic interesterification. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 3, 652-660.
- Sorensen, A.-D. M., Xu, X., Zhang, L., Kristensen, J. B., & Jacobsen, C. (2010). Human Milk Fat Substitute from Butterfat: Production by Enzymatic Interesterification and Evaluation of Oxidative Stability. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 87, 185-194.
- University of Saskatchewan. (2008). *Immobilization of Enzyme - College of Engineering*. Retrieved March 8, 2011, from University of Saskatchewan: www.engr.usask.ca/.../lecture%20notes-enzyme-immobilization%20of%20enzyme.ppt
- Wang, H.-X., Wu, H., Wu, H., & Weng, X.-C. (2006). Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*, 97.

- Wang, Y. H., Qin, X. L., Zhu, Q. S., Zhou, R., Yang, B., & Li, L. (2009). Lipase-catalyzed acidolysis of lard for the production of human milk fat substitute. *230*, 769–777.
- Watanabe, Shimada, Yamauchi-Sato, Kasai, Yamamoto, Tsutsumi, et al. (2002). Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, *79*, 891–896.
- Waterborg, J. H. (2008). The Lowry Method for Protein Quantitation. In J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press Inc.
- Xu, X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 287–303.
- Yadav, G. D., & Jadhav, S. R. (2005). Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. *86*.
- Yang, G., JianpingWu, Xu, G., & Yang, L. (2009). Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *57*, 96–103.
- Yang, T., Fruekilde, M.-B., & Xu, X. (2003). Applications of Immobilized *Thermomyces lanuginosa* Lipase in Interesterification. *80*, 881-887.
- Zhang, Y.-T., Zhi, T.-T., Zhang, L., Huang, H., & Chen, H.-L. (2009). Immobilization of carbonic anhydrase by embedding and covalent coupling into nanocomposite hydrogel containing hydrotalcite. *Polymer*, *50*, 5693–5700.

Lampiran 1: Gambar Proses Penelitian

A. Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar

Tabel i. Gambar Penelitian Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar

No.	Prosedur	Gambar
1.	Memvariasikan konsentrasi PPL menjadi beberapa konsentrasi dengan cara mengencerkan 0,01 gram/ml larutan PPL dan 0,1 gram/ml. Kemudian menyiapkan tiap-tiap larutan pada tabung reaksi.	
2.	Menambahkan 2 ml Lowry Reagent ke setiap sample konsentrasi PPL.	
3.	Menginkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.	
4.	Menambahkan 0,2 ml larutan phenol reagent pada setiap tabung.	
5.	Vortex (melakukan pencampuran dengan bantuan vibrator) segera setiap tabung tersebut.	
6.	Menginkubasi selama 30 menit pada suhu ruang	
7.	Mengambil tiap sampel ke dalam kuvet.	
8.	Menentukan absorbansi setiap sampel menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. (Sampel dibuat duplo dan blanko menggunakan larutan aquades)	

B. Entrapment Lipase

(Lanjutan)

Tabel ii. Gambar Penelitian *Entrapment Lipase*


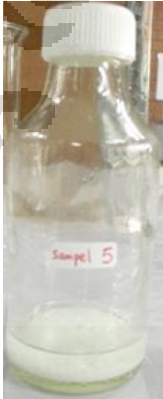
No.	Prosedur	Gambar
1.	Melakukan <i>stirring</i> pada 200 rpm selama 15 menit untuk mencampurkan larutan 10ml <i>porcine pancreatic lipase</i> (PPL) 0,1gr/ml, 16,67gr karbon aktif dan 0,5ml larutan NaF 0,5M.	
2.	Inkubasi dalam keadaan tertutup pada temperatur ruang selama 24 jam	
3.	Inkubasi dalam keadaan terbuka pada temperature 37°C selama 48 jam	
4.	Filtrasi menggunakan melalui metode filtrasi vakum	

(Lanjutan)

5. Inkubasi dalam keadaan terbuka pada temperature 37°C selama 48 jam (untuk pengeringan)







C. Sintesis Human Milk Fat Substitute

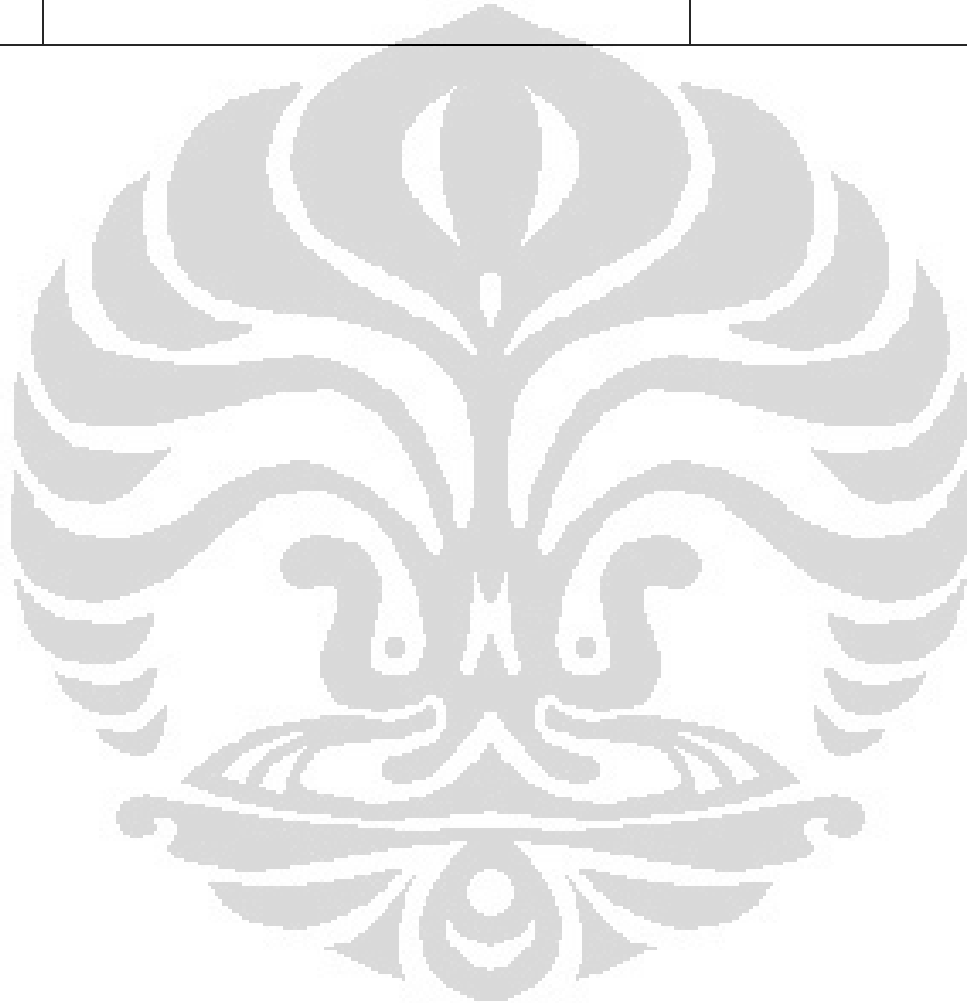
No.	Prosedur	Gambar
1.	<p>Tripalmitin dicampur dengan etil oleat di dalam Erlenmeyer flask (250 ml) dengan screw cap dengan rasio mol substrat yang bervariasi, yaitu 4, 5 dan 6</p>	<p>Sampel sebelum reaksi dengan rasio mol substrat 1:4</p>  <p>Sampel sebelum reaksi dengan rasio mol substrat 1:5</p>  <p>(Lanjutan)</p> <p>Sampel sebelum reaksi dengan rasio mol substrat 1:6</p>

Universitas Indonesia

(Lanjutan)

		
2.	Memasukkan <i>Porcine Pancreatic Lipase</i> (PPL) dalam bentuk terimobilisasi dan PPL dalam bentuk bebas ke dalam campuran masing-masing campuran dengan berat sebesar 10% dari total berat substrat.	
3.	Campuran direaksikan di dalam shaking water bath pada 200 rpm dengan kondisi reaksi temperatur dan waktu yang bervariasi.	<p>50⁰C; 200 rpm</p>  <p>55⁰C; 200 rpm</p>  <p>60⁰C; 200 rpm</p> 
4.	Setelah reaksi, campuran difiltrasi dengan menggunakan corong dan kertas saring di dalam <i>water bath</i> pada temperature 60 ⁰ C.	Proses Filtrasi

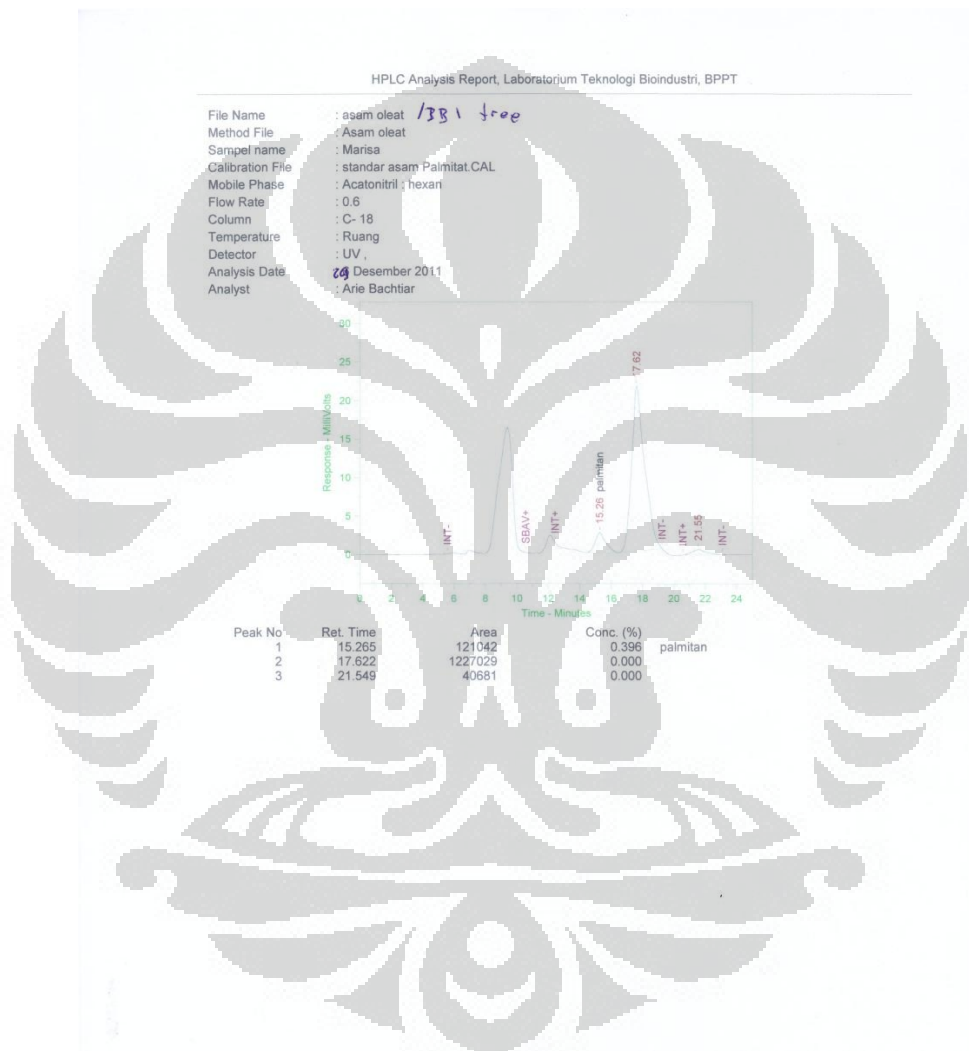
(Lanjutan)



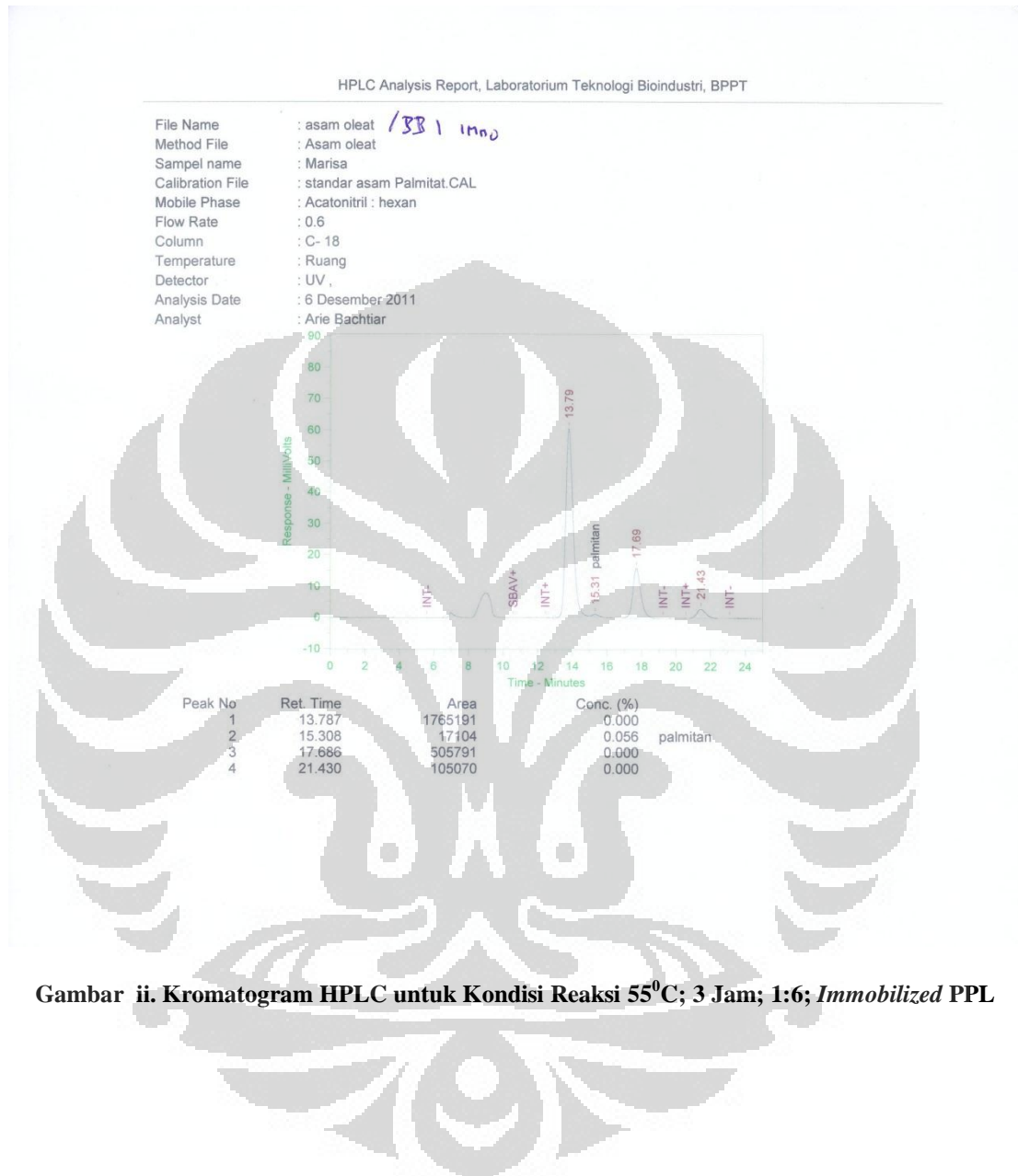
Lampiran 2: Data Kromatogram Hasil Analisis HPLC

Variasi Waktu Reaksia. 55⁰C; 3 Jam; 1:6

Free PPL

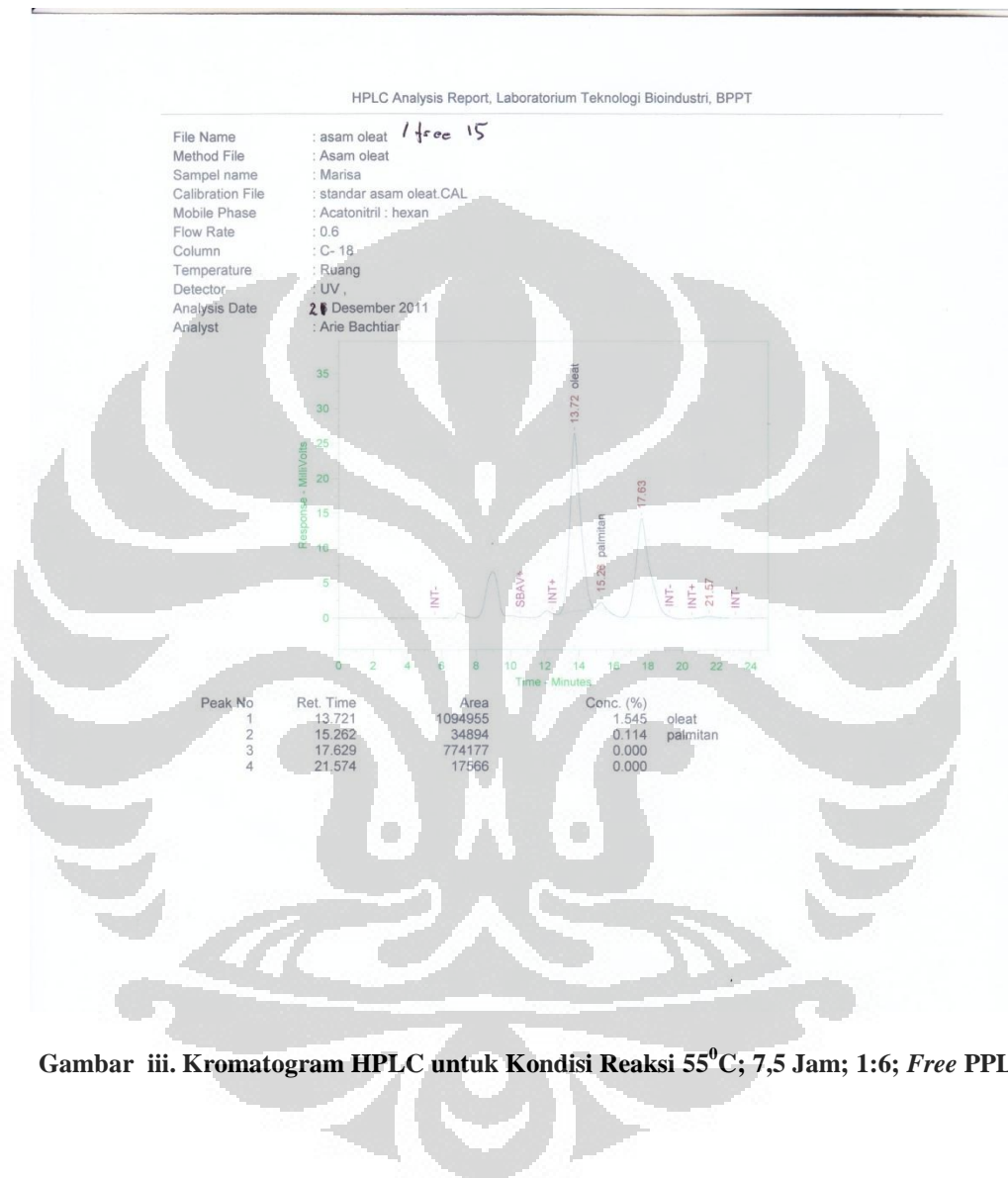
Gambar i. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 3 Jam; 1:6; Free PPL

(Lanjutan)

Immobilized PPL

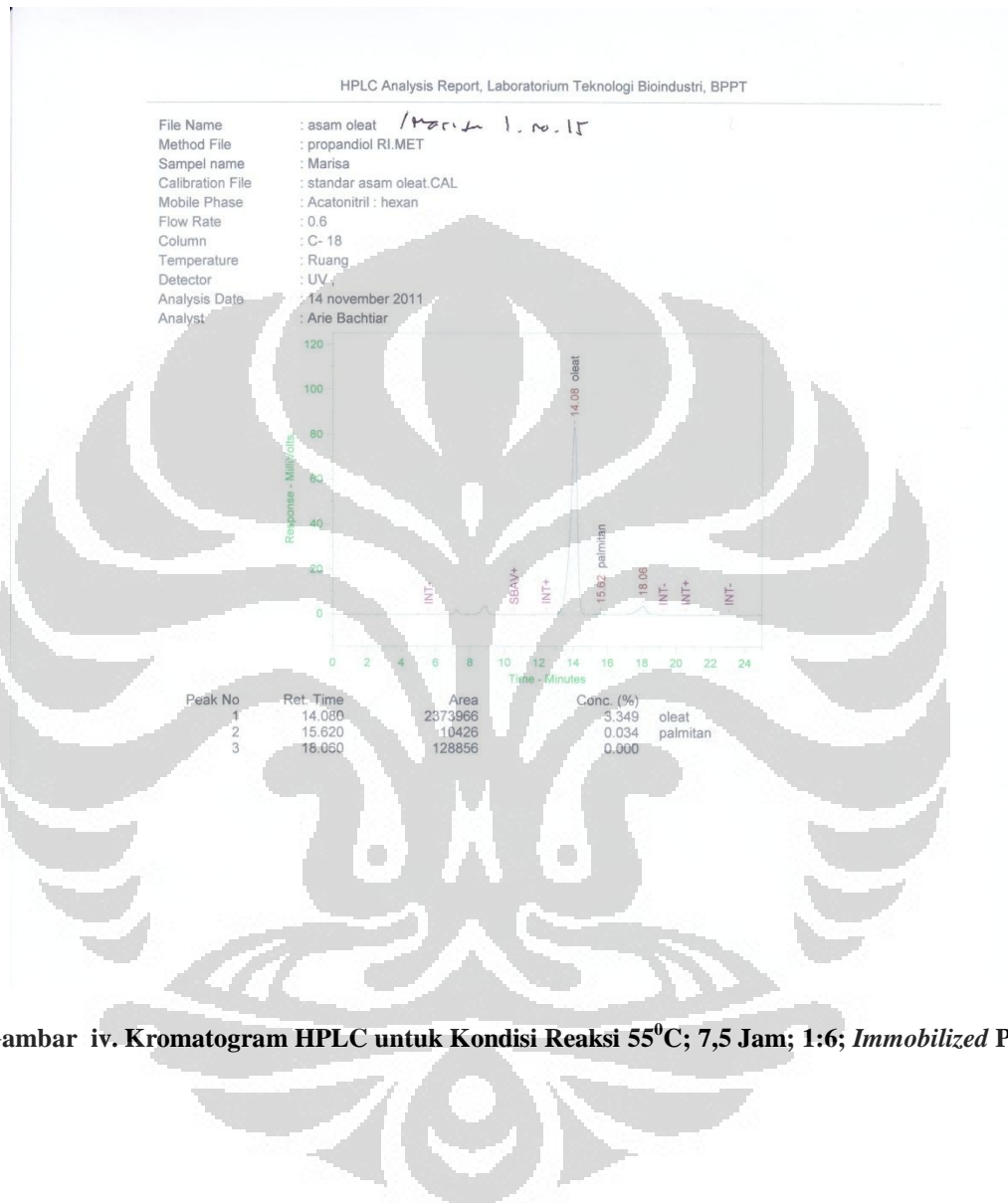
Gambar ii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 3 Jam; 1:6; Immobilized PPL

(Lanjutan)

b. 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6*Free PPL*

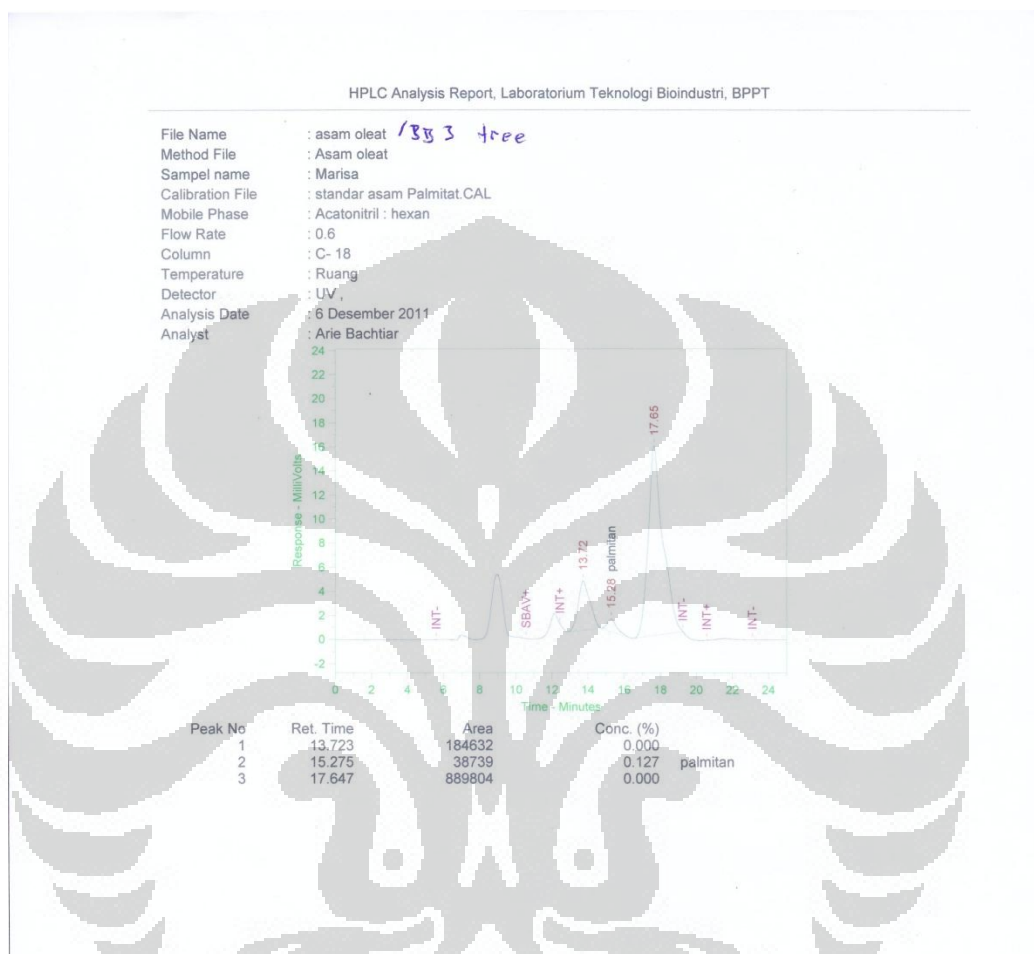
Gambar iii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6; *Free PPL*

(Lanjutan)

Immobilized PPL

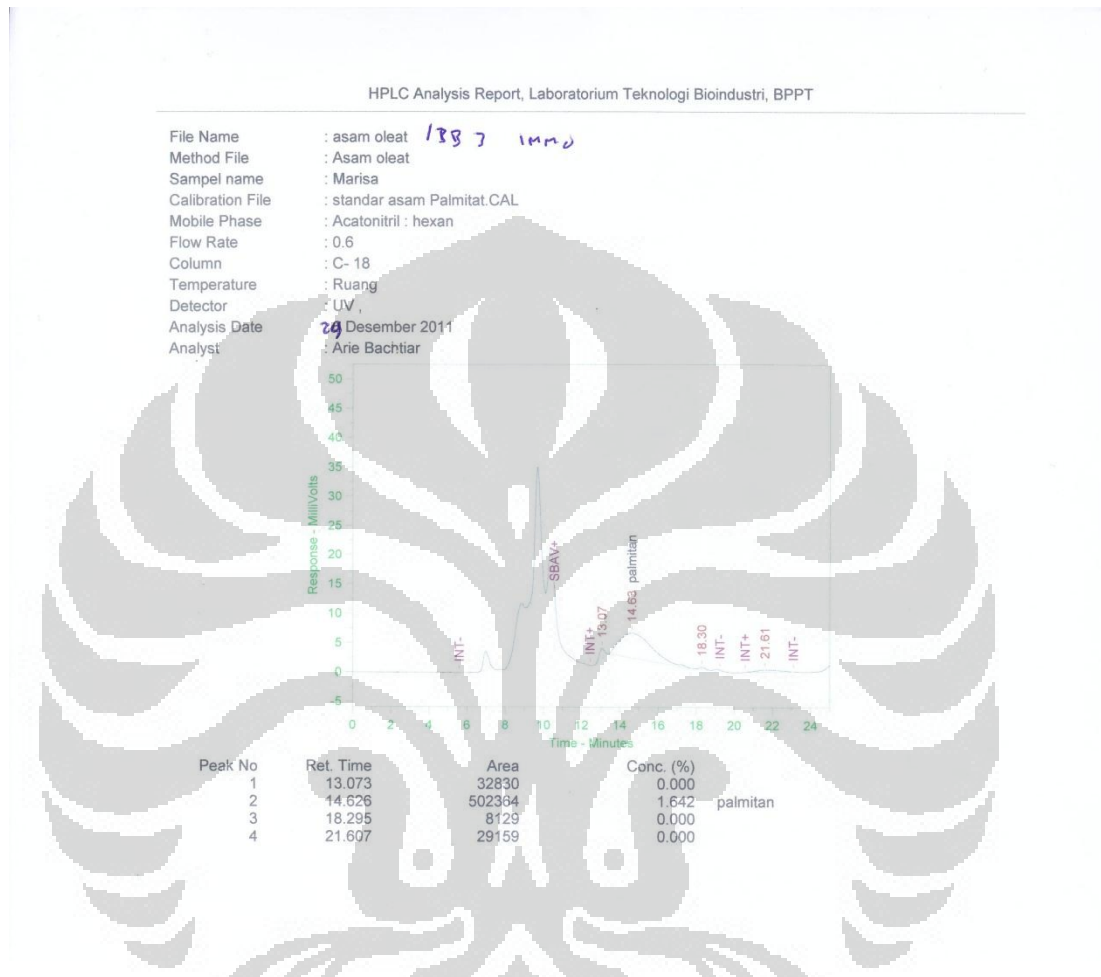
Gambar iv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6; Immobilized PPL

(Lanjutan)

c.55⁰C; 12 Jam; 1:6*Free PPL*

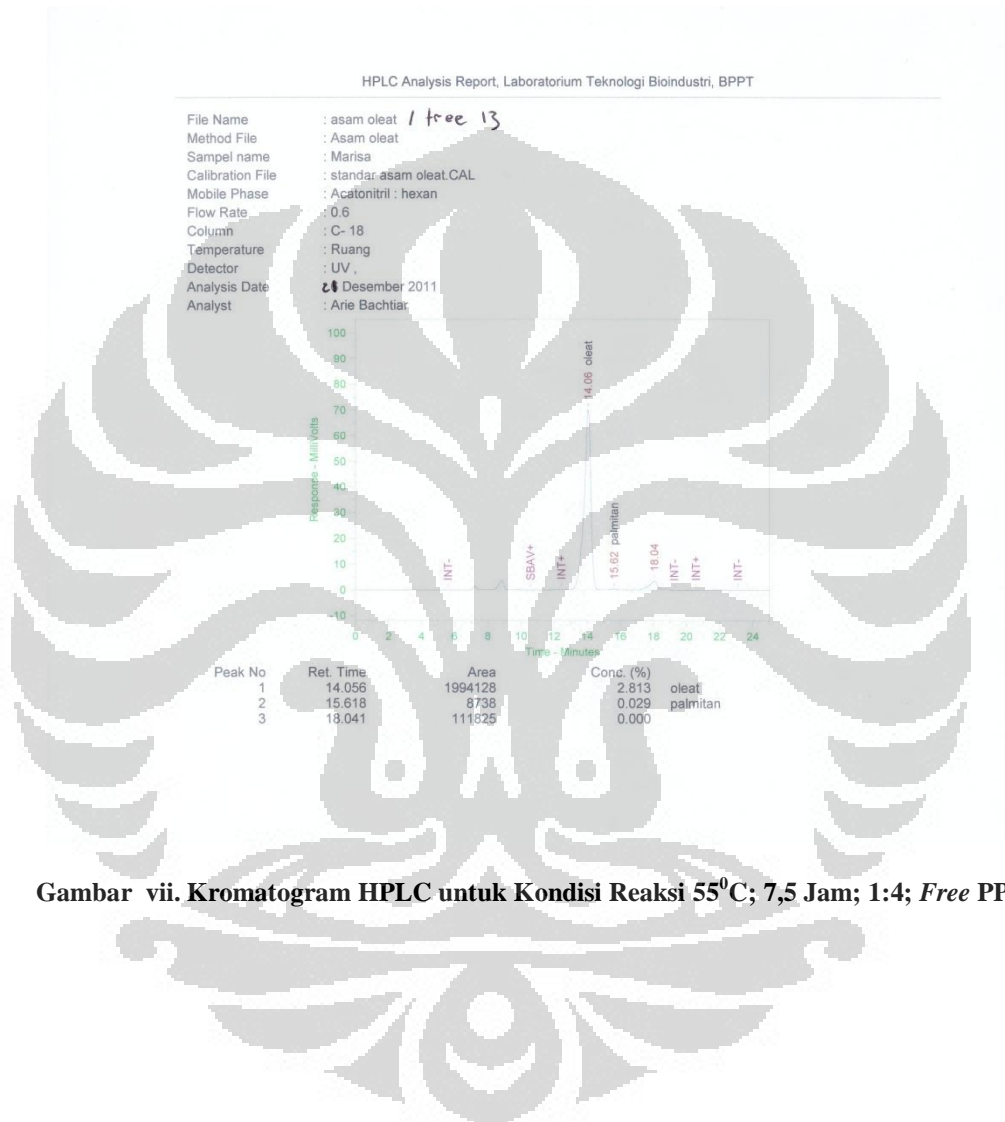
Gambar v. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 12 Jam; 1:6; *Free PPL*

(Lanjutan)

Immobilized PPL

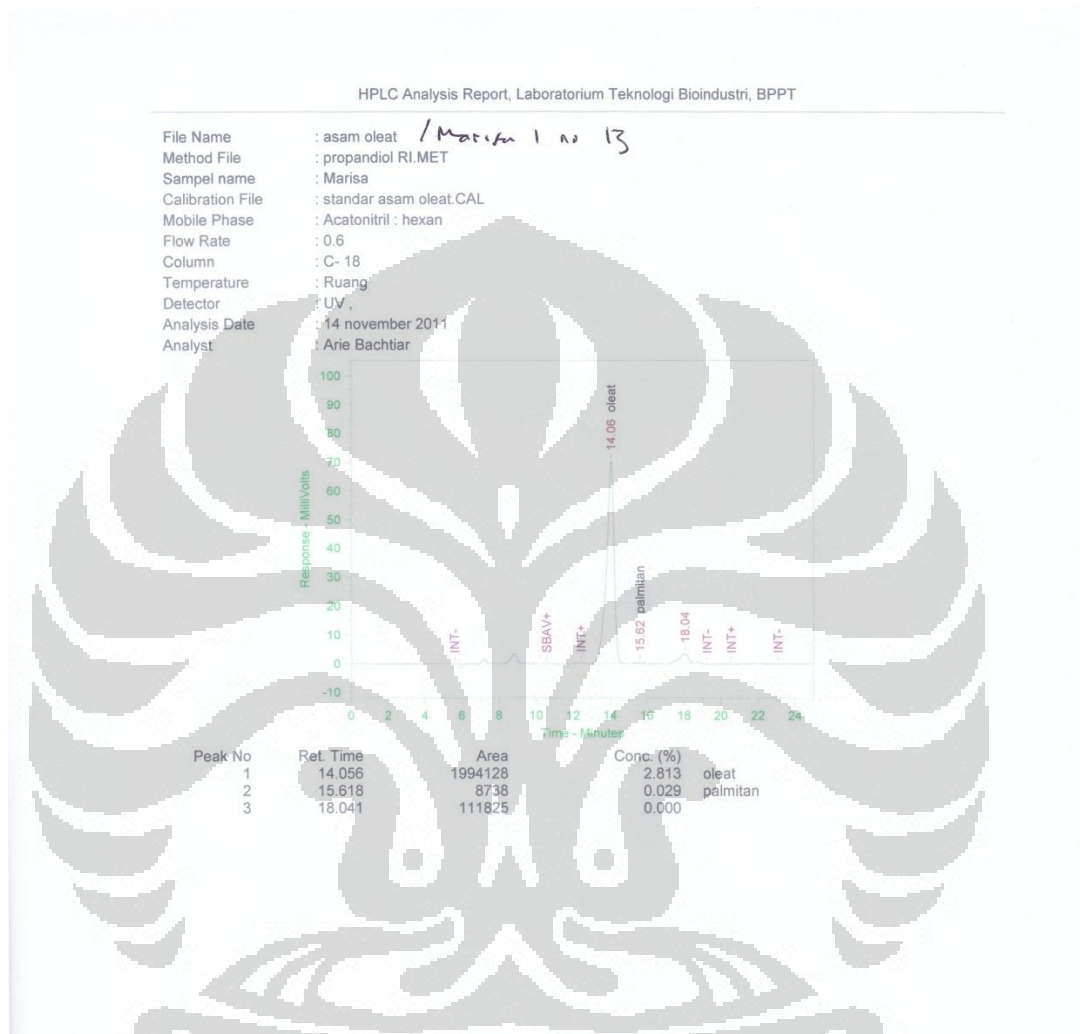
Gambar vi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 12 Jam; 1:6; *Immobilized PPL*

(Lanjutan)

Variasi Rasio Mol Substrata. 55⁰C; 7,5 Jam; 1:4*Free PPL*

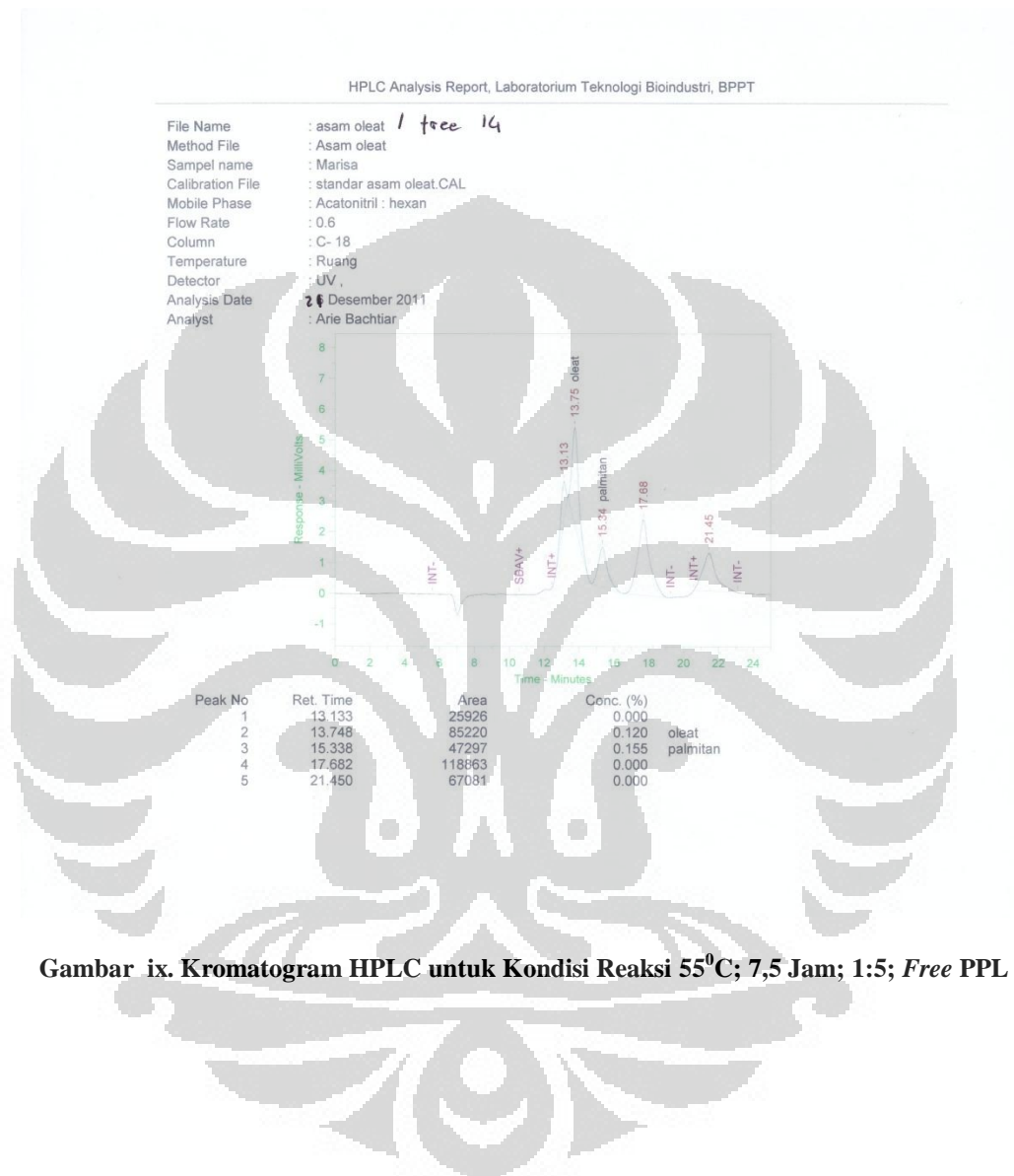
Gambar vii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:4; Free PPL

(Lanjutan)

Immobilized PPL

Gambar viii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:4; *Immobilized PPL*

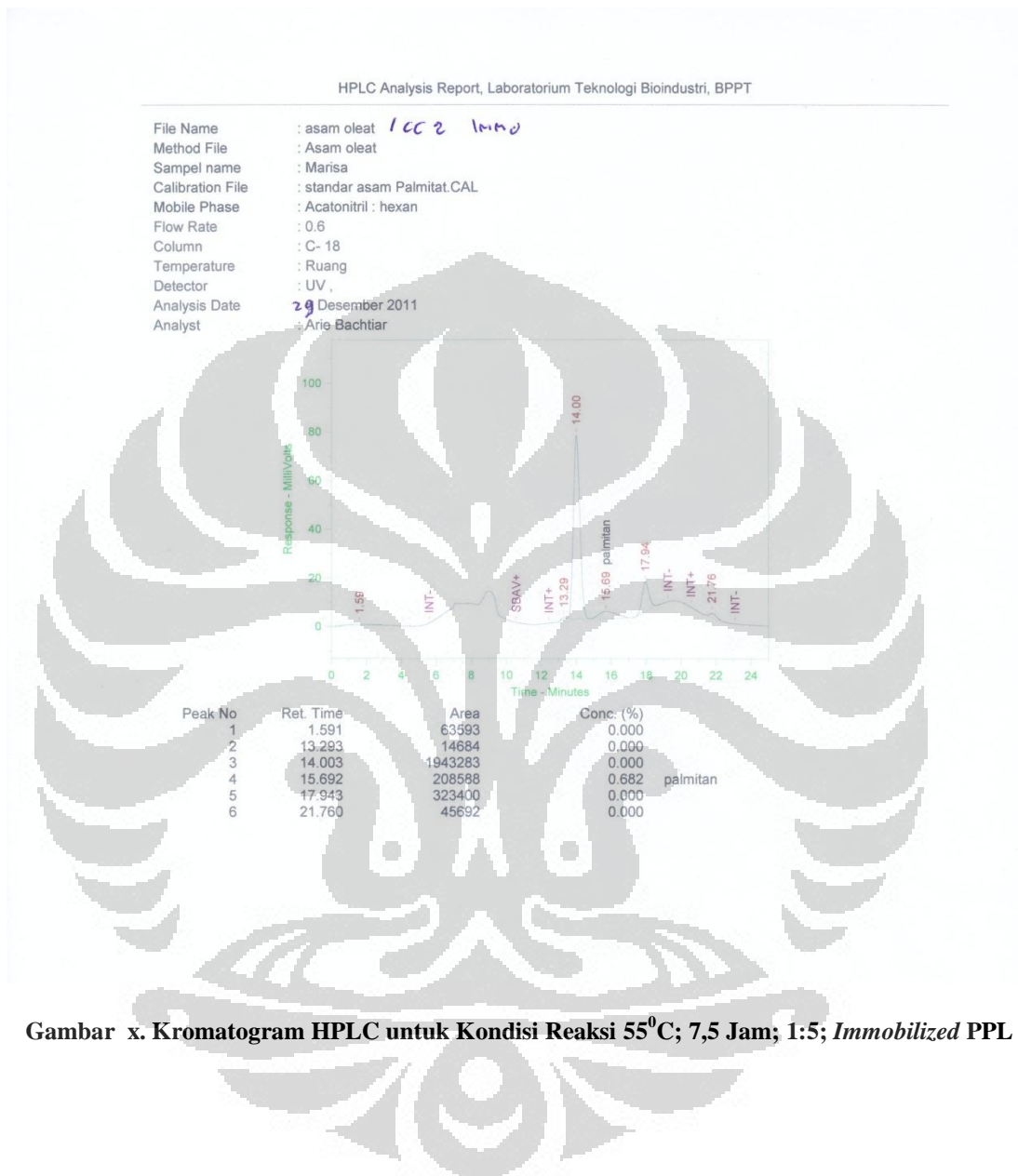
(Lanjutan)

b. 55⁰C; 7,5 Jam; 1:5*Free PPL*

Gambar ix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:5; Free PPL

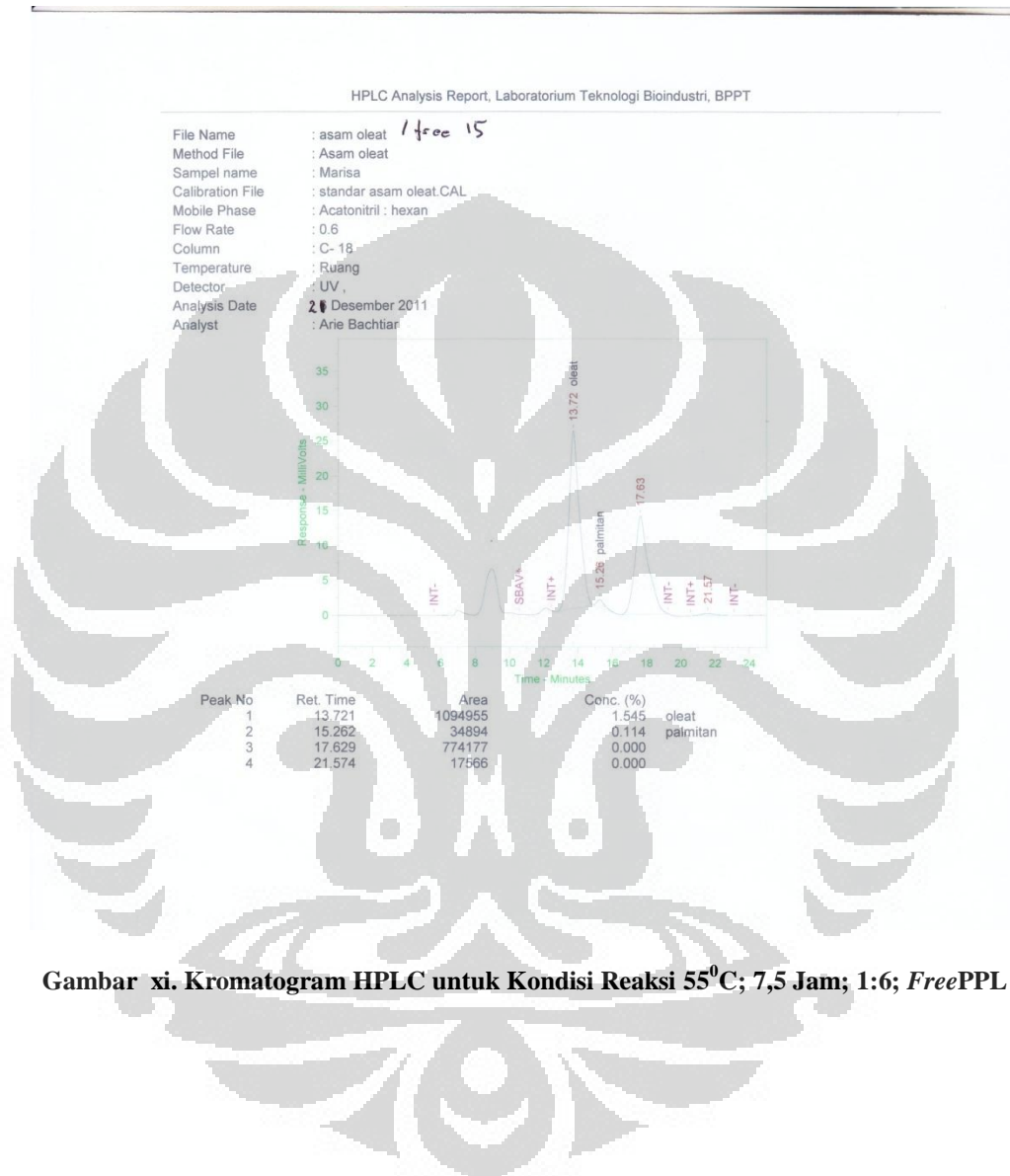
(Lanjutan)

Immobilized PPL



Gambar x. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:5; Immobilized PPL

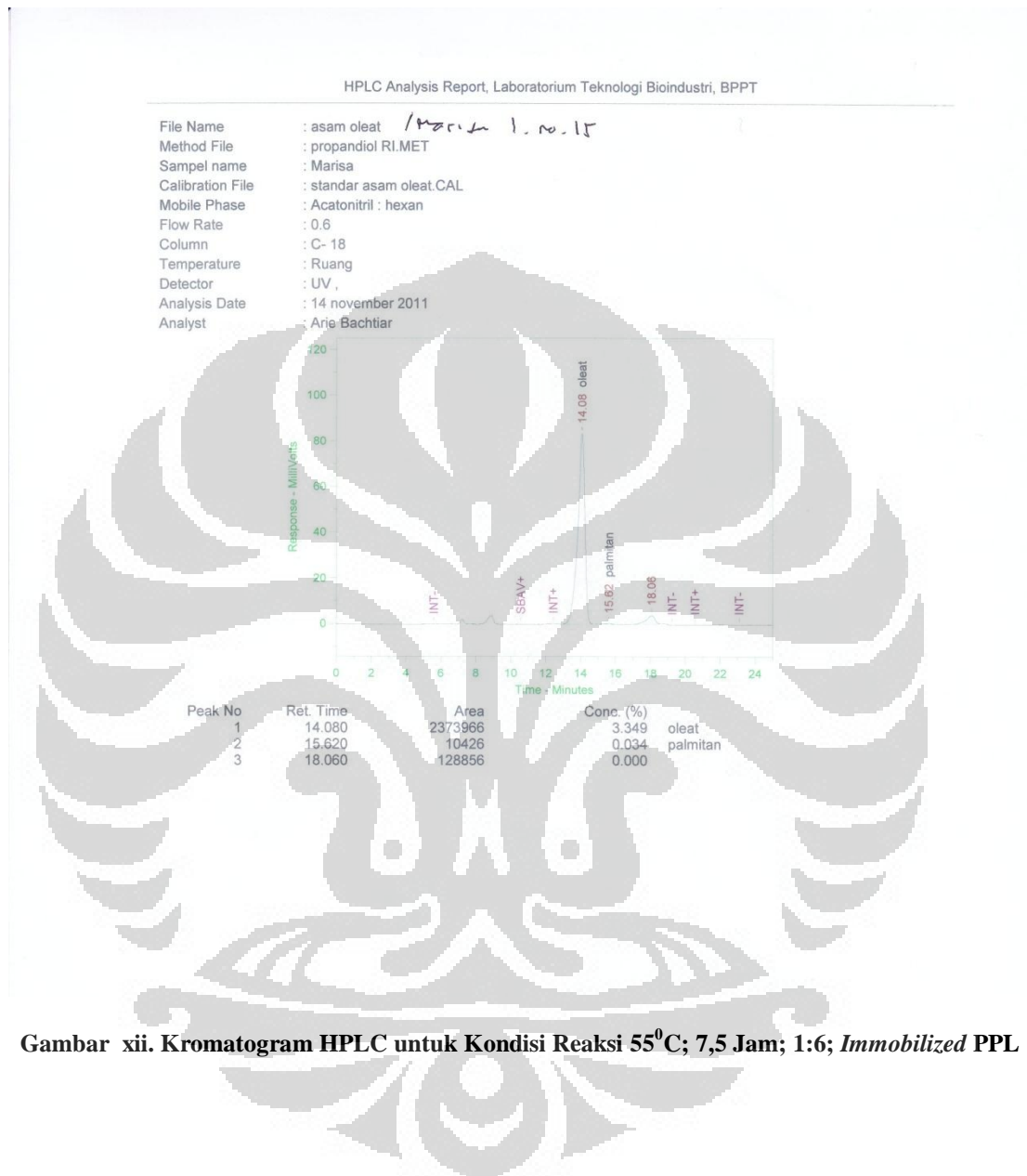
(Lanjutan)

c. 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6*Free PPL*

Gambar xi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6; FreePPL

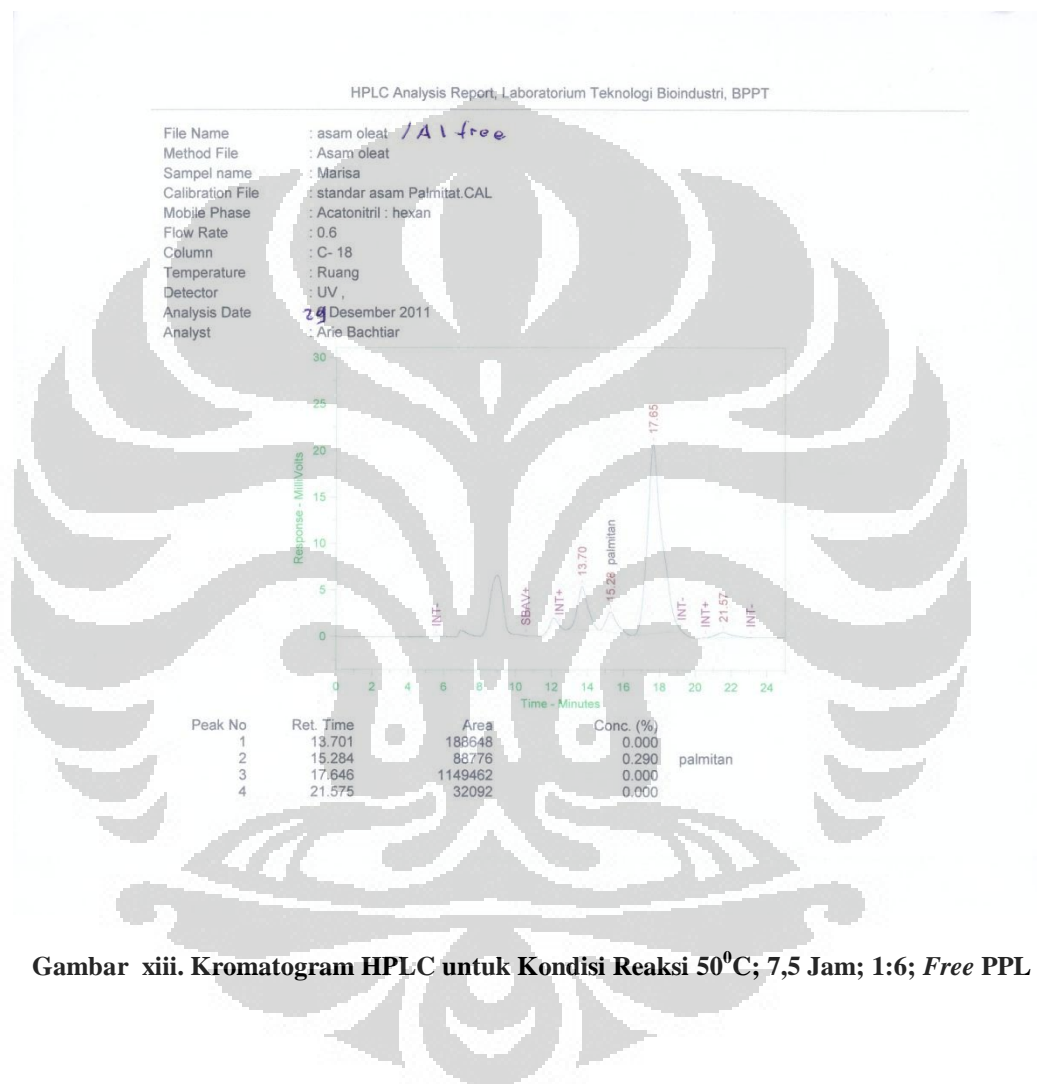
(Lanjutan)

Immobilized PPL

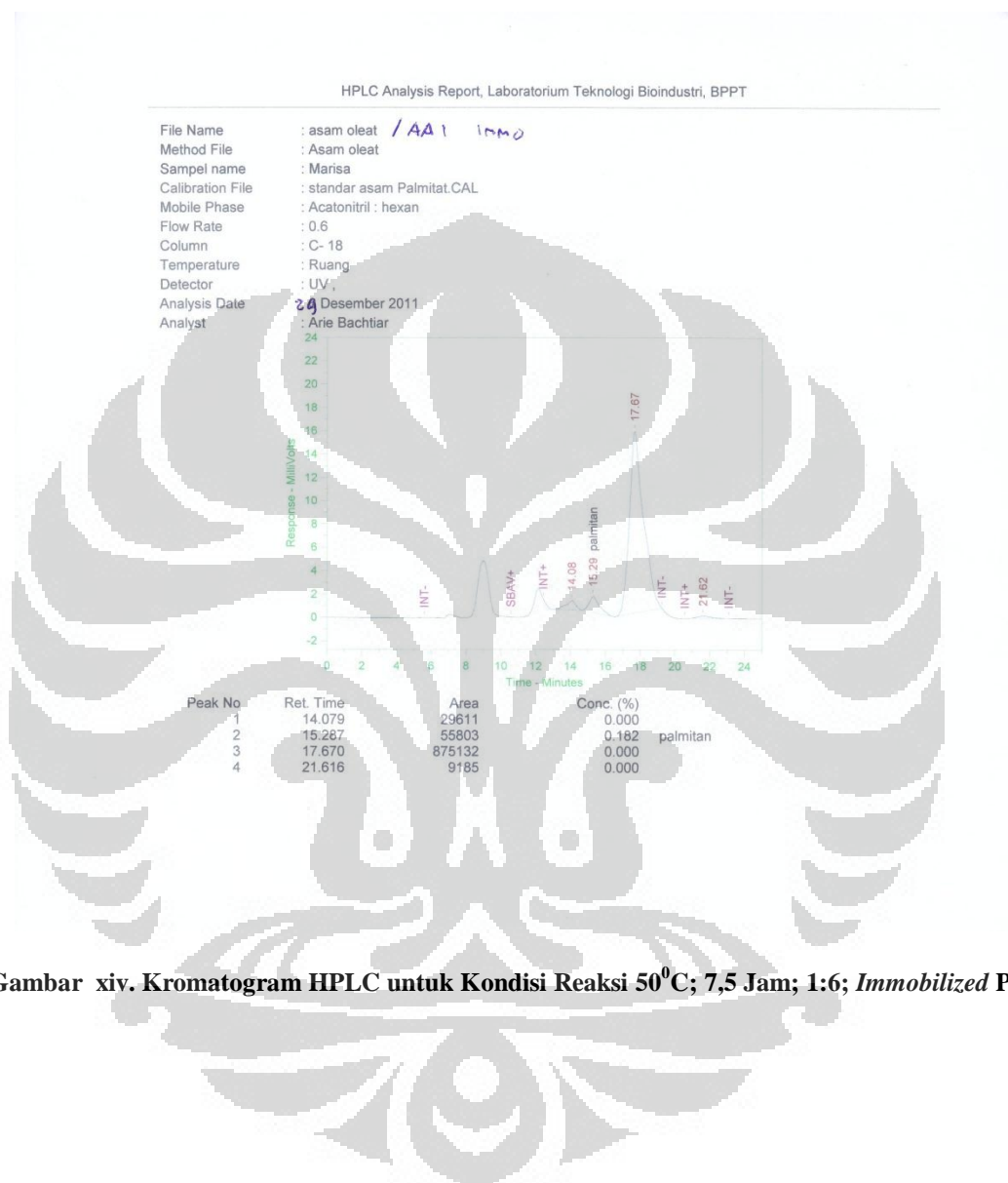


Gambar xii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6; Immobilized PPL

(Lanjutan)

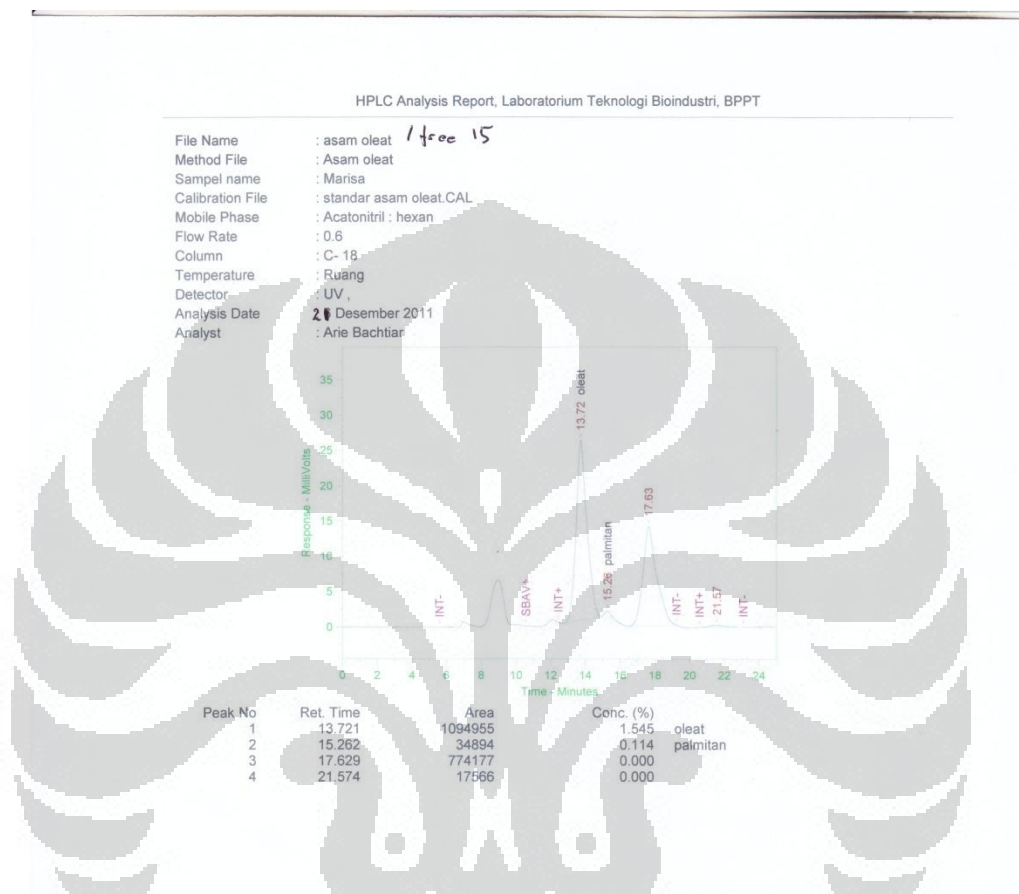
Variasi Temperatura. 50⁰C; 7,5 Jam; 1:6*Free PPL*Gambar xiii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 50⁰C; 7,5 Jam; 1:6; *Free PPL*

(Lanjutan)

Immobilized PPL

Gambar xiv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 50⁰C; 7,5 Jam; 1:6; *Immobilized PPL*

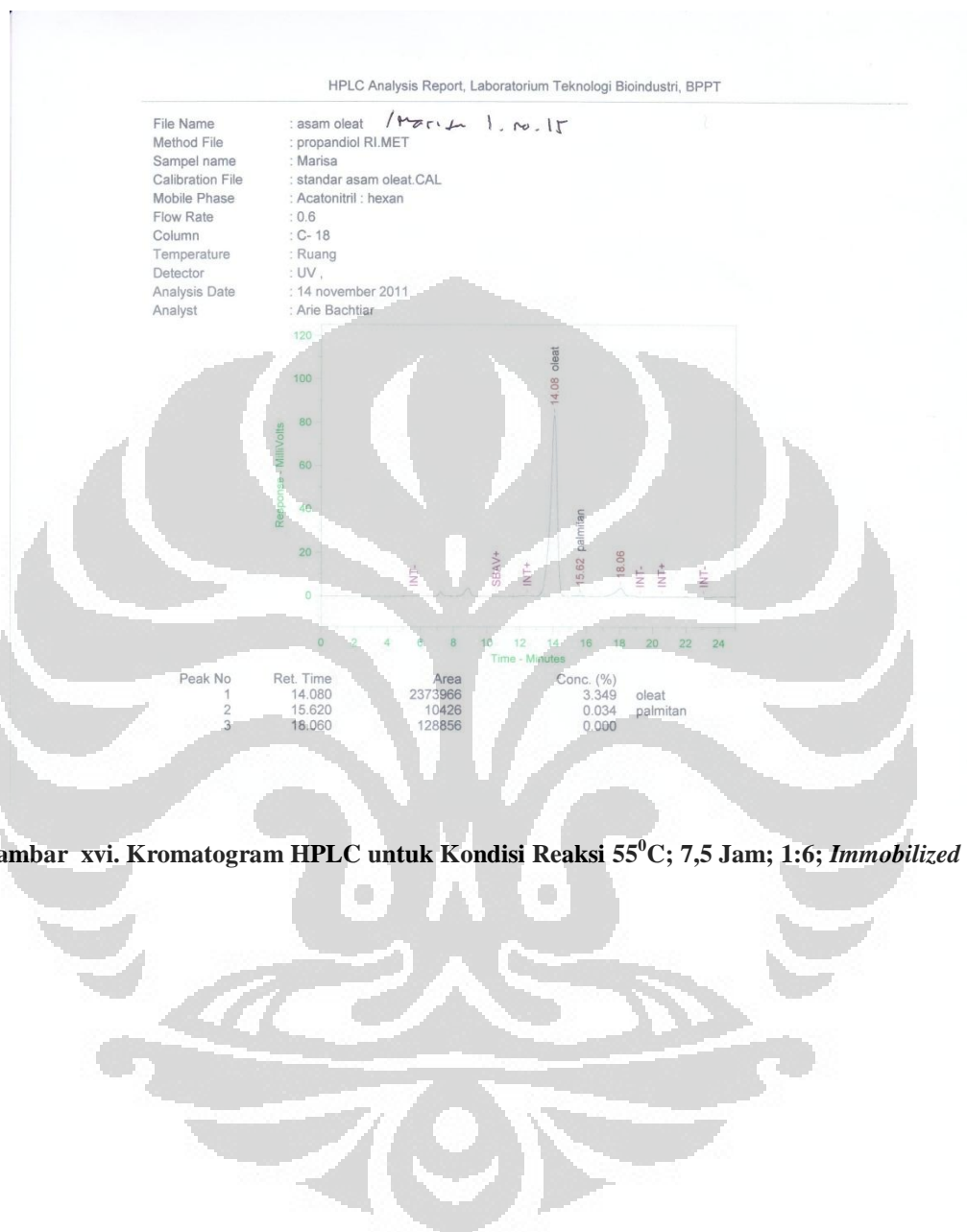
(Lanjutan)

b. 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6*Free PPL*

Gambar xv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6; *Free PPL*

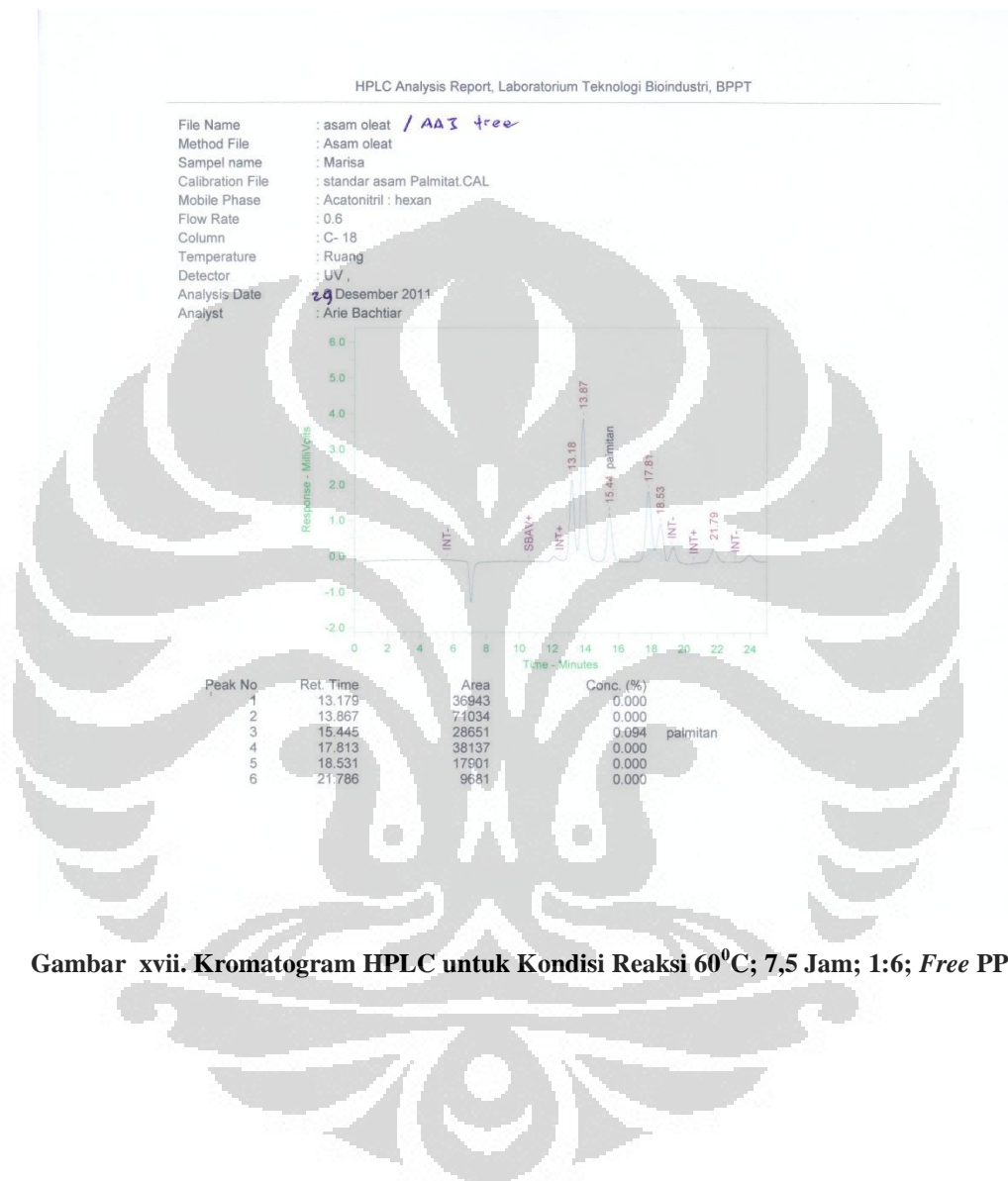
(Lanjutan)

Immobilized PPL



Gambar xvi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 55⁰C; 7,5 Jam; 1:6; *Immobilized PPL*

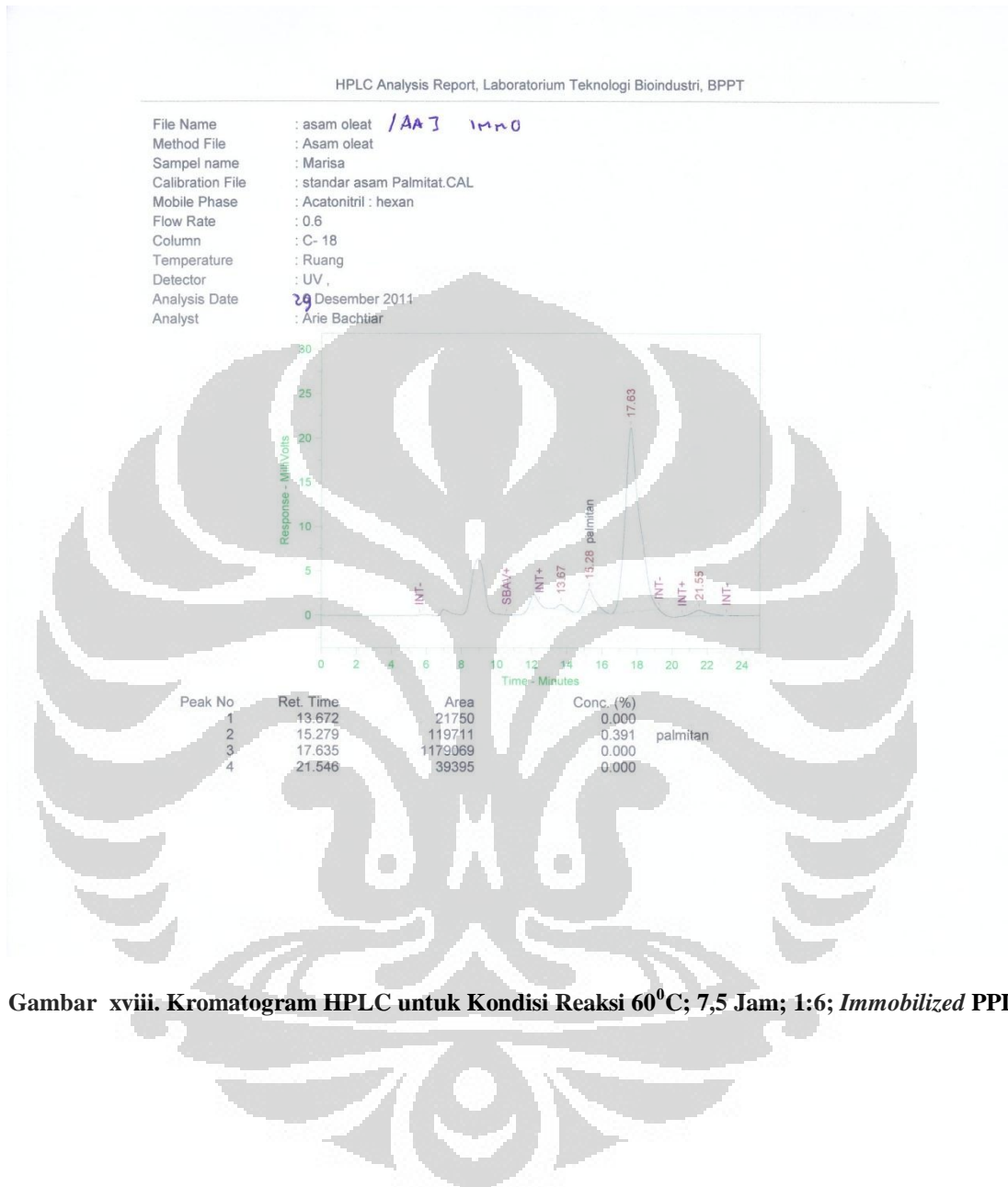
(Lanjutan)

c. 60⁰C; 7,5 Jam; 1:6*Free PPL*

Gambar xvii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 60⁰C; 7,5 Jam; 1:6; *Free PPL*

(Lanjutan)

Immobilized PPL



Gambar xviii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 60°C; 7,5 Jam; 1:6; Immobilized PPL