



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**SINTESIS BIODIESEL RUTE NON ALKOHOL DARI  
MINYAK GORENG DENGAN BIOKATALIS  
TERIMMOBILISASI *ENTRAPMENT* PADA REAKTOR *BATCH*  
DAN REAKTOR *PACKED BED***

**SKRIPSI**

**REPUBLIK DAUDI PARTHU**

**0806460585**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES**

**DEPOK**

**JANUARI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**SINTESIS BIODIESEL RUTE NON ALKOHOL DARI  
MINYAK GORENG DENGAN BIOKATALIS  
TERIMMOBILISASI *ENTRAPMENT* PADA REAKTOR  
*BATCH* DAN REAKTOR *PACKED BED***

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana teknik**

**REPUBLIK DAUDI PARTHU**

**0806460585**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES**

**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 : Republik Daudi Parthu

NPM : 0806460585

Tanda Tangan :



Tanggal : 20 Januari 2012



## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Republik Daudi Parthu

NPM : 0806460585

Program Studi : Teknologi Bioproses

Judul Skripsi :

**Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol dari Minyak Goreng dengan Biokatalis Terimmobilisasi *Entrapment* pada Reaktor *Batch* dan Reaktor *Packed Bed***

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

### DEWAN PENGUJI

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

Penguji I : Ir. Rita Arbianti, MSi. (.....)

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

Penguji III : Ir. Yuliusman, M.Eng. (.....)

Ditetapkan di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Tanggal : 17 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus yang telah memberikan berkelimpahan anugrah, rahmat, karunia dan berkatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat waktu.

Skripsi dengan judul “Sintesis Biodiesel Rute Non alkohol dari Minyak Gorengdengan Biokatalis Terimmobilisasi *Entrapment* pada Reaktor *Batch* dan Reaktor *Packed Bed*” merupakan tugas akhir untuk memenuhi syarat kelulusan dari Program Studi Teknologi Bioproses Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Heri Hermansyah S.T., M.Eng. atas bimbingan, arahan, dan waktu yang telah diberikan. Selain itu, penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Widodo Wahyu Purwanto, DEA sebagai Ketua Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia
2. Semua Dosen Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia yang telah mengarahkan, membimbing, dan memberikan ilmu yang sangat berguna bagi penulis.
3. Keluarga tercinta yang selalu mendoakan dan memberikan semangat kepada penulis.
4. Teman-teman satu laboratorium rekayasa bioproses atas kerja sama dan bantuan yang telah diberikan.
5. Teman-teman Program Studi Teknologi Bioproses 2008 dan Teknik Kimia 2008 atas suasana akademis dan kemahasiswaan yang telah mendukung selama ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk menyempurnakan skripsi ini.

Depok, 28 Desember 2011

Republik Daudi Parthu

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

---

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

Nama : Republik Daudi Parthu

NPM : 0806460585

Program Studi : Teknologi Bioproses

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis karya : Skripsi

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

**Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol dari Minyak Goreng dengan Biokatalis Terimmobilisasi *Entrapment* pada Reaktor *Batch* dan Reaktor *Packed Bed***

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Pada tanggal : 17 Januari 2012

Yang menyatakan



(Republik Daudi Parthu)

## ABSTRAK

Nama : Republik Daudi Parthu  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul : Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol dari Minyak Goreng dengan Biokatalis Terimmobilisasi *Entrapment* pada Reaktor *Batch* dan Reaktor *Packed Bed*

Biodiesel dapat dihasilkan dengan bantuan biokatalis melalui reaksi enzimatis enzim lipase melalui rute non-alkohol atau reaksi interesterifikasi. Enzim lipase sebagai biokatalis dapat diaplikasikan tetapi enzim lipase merupakan enzim komersial dimana pemakaiannya dapat menaikkan harga jual produk biodiesel. Oleh karena itu, diperlukan metode immobilisasi enzim lipase untuk memaksimalkan penggunaan enzim lipase. Penelitian ini diarahkan pada optimalisasi metode immobilisasi enzim lipase terpilih yaitu metode *entrapment* dan sintesis biodiesel. Metode *entrapment* menggunakan serbuk zeolit sebagai *support* dan NaF agen pengemulsi gel. Kondisi optimal immobilisasi didapatkan dari besarnya konsentrasi enzim termobilisasi pada *support*. Pengukuran dilakukan dengan mengukur konsentrasi sisa enzim immobilisasi dengan metode Lowry dimana didapatkan rasio 3% enzim dalam *support* zeolit sebagai kondisi optimal dengan enzim *loading* 80%. Sintesis biodiesel rute non-alkohol dengan reaksi interesterifikasi antara minyak goreng yang merupakan minyak kelapa sawit dan metilasetat dengan perbandingan 1:12 di mana pada sistem *batch* diujikan dengan kondisi suhu 37°C, *shaker* 150 rpm dan menggunakan biokatalis hasil immobilisasi dengan rasio massa enzim 3% berbanding massa *support* maka didapatkan 64,52% *yield* biodiesel dalam waktu 40 jam. Pada sistem kontinu reaksi dilakukan pada reaktor *packed bed* berukuran ID 11 mm dan panjang 150 mm. Kondisi operasi dilakukan dengan laju alir umpan 1 mL/jam, suhu jaket 37°C, waktu tinggal 5 jam, dan kolom reaktor terisi 75% biokatalis dari volume total. Sistem kontinu ini mampu menghasilkan %*yield* biodiesel sebesar 40,62% pada sampel jam ke-50.

Kata kunci :  
Immobilisasi, *entrapment*, *batch*, kontinu, reaktor *packed bed*.

## ABSTRACT

Name : Republik Daudi Parthu  
Study Program: Tecnology Bioprocess  
Title: Biodiesel Synthesis by Non Alcohol Route from Cooking Oil with  
Biocatalyst Immobilized Entrapment in Reactor Batch and  
Reactor Packed Bed

Biodiesel can be produced with the help of biocatalyst lipase enzyme through an enzymatic reaction via the route of non-alcoholic or interesterification reaction. The enzyme lipase as a biocatalyst can be applied but enzyme lipase is commercial enzyme and use it can raise the selling price of biodiesel product. Therefore, lipase immobilization methods are needed to maximize enzyme lipase. This study aimed at optimizing the lipase enzyme immobilization method was chosen the method of entrapment and synthesis of biodiesel. Entrapment method using zeolite powder as a *support* and NaF emulsifying agent gel. Optimal immobilization conditions obtained from the large concentration of enzyme immobilized on a *support*. Measurements were made by measuring the residual concentration of enzyme immobilization by Lowry method which the ratio of 3% of enzyme obtained in *support* of zeolite as the optimal conditions with an enzyme loading of 80%. Biodiesel synthesis route of non-alcoholic interesterification performed on the reaction between vegetable oil which is palm oil and methyl acetate with a ratio of 1:12 which in batch system was tested with the conditions of 37° C, 150 rpm shaker and the results biocatalyst immobilization of enzymes with a ratio of 3% then 64.52% yield of biodiesel obtained within 40 hours. In continuous systems the reaction carried out in packed bed reactor sized ID 11 mm and length 150 mm. Operating conditions performed with the feed flow rate 1mL/jam, jacket temperature of 37 ° C, residence time 5 hours, and a column reactor filled with 75% of the total volume biocatalyst. Continuous system is capable of producing 40.62% at sampling 50 hour.

Keywords:

Immobilization, Entrapment, Batch, Continuous, Packed Bed Reactor.

## DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS..... ii

HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
ABSTRAK .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Batasan Masalah .....	4
1.5 Sistematika Penulisan .....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1. Biodiesel .....	6
2.2. Minyak Kelapa Sawit .....	7
2.3 Lipase .....	8
2.3.1 Sumber Lipase .....	9
2.3.2. Klasifikasi Lipase .....	11
2.3.2.1. Nonspesifik Lipase .....	11
2.3.2.2. Posisi Spesifik .....	12
2.3.2.3. Lipase Spesifik pada Panjang Asam Lemak .....	12
2.3.2.4. Lipase Spesifik pada Asam Lemak .....	12
2.3.3. Reaksi yang dikatalis Lipase .....	13
2.3.3.1. Hidrolisis .....	13
2.3.3.2. Esterifikasi .....	14
2.3.3.3. Transesterifikasi .....	15
2.3.3.4. Interesterifikasi .....	15
2.3.4. Sifat Propertis Lipase .....	16
2.3.4.1. Struktur Dimensi Lipase .....	16
2.3.4.2. Inhibitor dan Aktifator .....	18
2.3.4.3. PH Optimum Lipase .....	19
2.3.4.4. Optimal Temperatur dan Stabilitas Panas .....	20
2.3.4.5. Komposisi Asam Amino .....	21
2.3.4.6. Berat Molekul .....	22

2.3.4.7. Isoelektrik point .....	23
2.4. Imobilisasi Enzim .....	24
2.4.1 Keuntungan Imobilisasi .....	25
2.4.2. Material <i>Support</i> .....	25
2.4.3. Metode Imobilisasi.....	27
2.4.3.1. <i>Carrier Binding</i> .....	28
2.4.3.1.1. Adsorpsi ( <i>physical adsorption</i> ).....	29
2.4.3.1.2. Ikatan Ion ( <i>Ionic binding</i> ).....	31
2.4.3.1.3. Ikatan Kovalen ( <i>Covalent binding</i> ).....	31
2.4.3.2. <i>Cross-Linking</i> .....	32
2.5. <i>Entrapment</i> .....	33
2.6. <i>Support Zeolit</i> .....	34
2.6.1. Struktur Zeolit.....	36
2.6.2. Jenis-jenis Zeolit .....	37
2.6.3. Sifat Zeolit .....	38
2.6.4. Pengolahan Zeolit .....	40
2.7. <i>Packed Bed Reactor</i> .....	41
2.8. Mekanisme Michaelis-Menten.....	42
2.9. Pemetaan Penelitian .....	44
BAB 3 METODE PENELITIAN .....	47
3.1. Rancangan Penelitian.....	47
3.2. Persiapan Alat Dan Bahan .....	48
3.2.1. Persiapan Bahan.....	48
3.2.2. Persiapan Alat.....	48
3.3. Persiapan Percobaan .....	50
3.3.1. Pembuatan zeolit Dalam Bentuk Bubuk ( <i>powder</i> ).....	50
3.3.2. Pembuatan Zeolit Teraktifasi Dalam Bentuk Bubuk (Wafa, 2009).....	50
3.3.3. Pembuatan <i>Phosphatebuffer</i> buffer (Wafa, 2009) .....	51
3.3.4. Pembuatan Bahan Metode Lowry.....	51
3.4. Pembuatan Kurva Standar Enzim .....	52
3.5. Pengukuran Enzim <i>Loading</i> .....	53
3.6. Optimalisasi Imobilisasi Lipase Metode <i>Entrapment</i> .....	53
3.6.1. Perbandingan <i>support</i> zeolit dan zeolit teraktifasi.....	53
3.6.2. Imobilisasi Lipase Dengan Variasi Perbandingan Enzim dan Zeolit.....	55

3.6.3. Imobilisasi Lipase Dengan Variasi NaF .....	58
3.7. Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol Pada Reaktor <i>Batch</i> .....	60
3.8. <i>Set Up</i> Reaktor Kontinyu .....	61
3.9. Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol Pada Reaktor <i>Packed Bed</i> .....	62
3.10. Tahap Analisis biodiesel .....	64
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	66
4.1. Hasil Imobilisasi Lipase Berdasarkan Enzim <i>Loading</i> .....	66
4.1.1. Perbandingan <i>Support Zeolit</i> dan Zeolit teraktifasi .....	66
4.1.2. Variasi Perbandingan Enzim dan Zeolit .....	68
4.1.3. Imobilisasi Lipase dengan Variasi NaF .....	72
4.2. Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol Sistem Reaktor <i>Batch</i> .....	73
4.3. <i>Set Up</i> Reaktor Kontinyu.....	78
4.4. Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol Pada Sistem Kontinyu.....	79
4.5. Fitting Persamaan Michaelis Menten.....	81
BAB 5 KESIMPULAN.....	84
5.1. Kesimpulan .....	84
5.2. Saran .....	84
DAFTAR PUSTAKA .....	85
LAMPIRAN A .....	88
LAMPIRAN B .....	90
LAMPIRAN C .....	92
LAMPIRAN D .....	92
LAMPIRAN G .....	93
LAMPIRAN E .....	94
LAMPIRAN F .....	95
LAMPIRAN G .....	96
LAMPIRAN H .....	96
LAMPIRAN I .....	97

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Standar Nasional Biodiesel .....	7
Tabel 2.2. Komposisi asam lemak dari minyak kelapa sawit (%) .....	8
Tabel 2.3. Sumber Lipase Mikrobial .....	11
Tabel 2.4. Spesifikasi Substrat Trigliserida .....	13
Tabel 2.5. Inhibitor dan Aktifator lipase mikrobial .....	19
Tabel 2.6. pH optimum lipase mikrobial .....	20
Tabel 2.7. Optimum temperatur dan Stabilitas panas lipase mikrobial .....	21
Tabel 2.8. Komposisi asam amino lipase mikrobial .....	22
Tabel 2.9. Berat molekul beberapa lipase mikrobial.....	23
Tabel 2.10. Isoelektrik pH dari lipase mikrobial .....	24
Tabel 2.11. Faktor yang menjadi pertimbangan pemilihan matriks imobilisasi ....	27
Tabel 2.12. Klasifikasi mineral zeolit .....	35
Tabel 2.14. Studi literatur mengenai metode imobilisasi lipase <i>entrapment</i> .....	45
Tabel 2.15. State of the art sintesis biodiesel .....	46
Tabel 3.1. Alat yang digunakan dalam penelitian.....	48
Tabel 3.2. Perbandingan volum untuk larutan buffer .....	51
Tabel 3.3. Variasi konsentrasi enzim .....	52
Tabel 3.4. Spesifikasi HPLC .....	65
Tabel 4.3. Perbandingan rasio enzim <i>Candida rugosa</i> terhadap enzim <i>loading</i> ..	69
Tabel 4.4. Pengukuran enzim <i>loading</i> pada rasio 3% .....	71
Tabel 4.5. Perbandingan konsentrasi NaF terhadap enzim <i>loading</i> .....	73
Tabel 4.6. Perhitungan massa enzim dalam 1 g zeolit .....	74
Tabel 4.7. Persentase sintesis biodiesel rute non alkohol pada sistem <i>batch</i> .....	75
Tabel 4.8. Perbandingan % <i>yield</i> setiap komponen hasil reaksi .....	81
Tabel 4.9. Tabel perhitungan Michaelis Menten Eadie-Hofstee.....	82
Tabel A. Data kurva standar.....	89
Tabel B. Data standar HPLC untuk sintesis biodiesel melalui rute non alkohol ..	90
Tabel C. Data HPLC minyak goreng murni .....	92
Tabel D. Perhitungan % <i>yield</i> setiap komponen pada sistem <i>batch</i> .....	92
Tabel G. Perhitungan mol balance reaksi <i>batch</i> .....	93
Tabel E. Perhitungan mol balance sistem kontinyu .....	94
Tabel F. Perhitungan % <i>yield</i> setiap komponen sistem kontinyu .....	95

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Skema reaksi lipase .....	15
Gambar 2.2. Reaksi Interesterifikasi trigliserida .....	16
Gambar 2.3. Struktur Lipase <i>Candida rugosa</i> .....	17
Gambar 2.4. Klasifikasi Metode Imobilisasi Enzim .....	28
Gambar 2.5. Ilustrasi metode carrier binding.....	29
Gambar 2.6. Skema ilustrasi metode <i>cross-linking</i> .....	32
Gambar 2.7. Skema ilustrasi metode <i>entrapment</i> .....	33
Gambar 2.8. Struktur zeolit dan struktur zeolit Si/Al .....	37
Gambar 3.1. Diagram Alir Prosedur Penelitian .....	47
Gambar 3.2. Diagram imobilisasi variasi zeolit.....	55
Gambar 3.3. Diagram imobilisasi variasi rasio enzim dan <i>support</i> .....	57
Gambar 3.4. Diagram Imobilisasi variasi konsentrasi NaF .....	59
Gambar 3.5. Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem <i>batch</i> .....	60
Gambar 3.6. <i>Set up</i> reaktor kontinyu .....	62
Gambar 3.7. Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada PBR..	64
Gambar 4.2. Perbandingan enzim <i>loading</i> zeolit aktif dan tanpa aktivasi .....	67
Gambar 4.3. Kurva perbandingan rasio enzim dan enzim <i>loading</i> .....	70
Gambar 4.4. Perbandingan <i>yield</i> dan rasio biokatalis .....	76
Gambar 4.5. Perbandingan rasio enzim dan enzim <i>loading</i> .....	77
Gambar 4.6. <i>Set Up</i> Reaktor Packed Bed .....	78
Gambar 4.7. Kurva hasil reaksi interesterifikasi pada reaktor <i>packed bed</i> .....	80
Gambar 4.9. Fitting Michaelis Menten untuk Eadie-Hofstee .....	83
Gambar A. Kurva standar untuk larutan <i>Candida rugosa</i> dengan metode Lowry.	89
Gambar G. Reaksi interesterifikasi sistem <i>batch</i> pada <i>shaker batch</i> .....	96
Gambar H. Reaksi interesterifikasi sistem <i>batch</i> pada <i>shaker batch</i> .....	96

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Biodiesel merupakan sumber energi alternatif yang sangat populer di dunia dengan berbagai keunggulannya. Keunggulan yang utama adalah biodiesel sebagai sumber energi yang terbarukan merupakan satu-satunya sumber energi alternatif yang dapat dipakai langsung oleh mesin konvensional tanpa harus mengganti peralatan, selain itu biodiesel dapat dicampur dengan petroleum diesel dengan berbagai komposisi untuk meningkatkan kualitas pembakaran.

Keberadaan biodiesel sendiri belum terlalu populer di Indonesia dimana biodiesel masih sangat rendah pemanfaatannya di Indonesia sedangkan bahan dasar pembuatan biodiesel berlimpah di Indonesia. Bahan dasar itu adalah kelapa sawit yang menjadi ekspor non-migas terbesar di Indonesia. Pada tahun 2009 Indonesia telah mengekspor kelapa sawit dan turunannya sebanyak 13,87 juta ton *Crude Palm Oil* dengan luas perkebunan kelapa sawit di Indonesia sebesar 8,04 juta hektare. Indonesia telah mengubah sebagian besar perkebunan dan hutannya untuk dijadikan perkebunan kelapa sawit dikarenakan tingginya permintaan kelapa sawit dari berbagai negara seperti Cina, Belanda, Amerika, India, Jerman, dan lainnya. Indonesia sampai saat ini telah menjadi penghasil utaman minyak kelapa sawit, melewati negara Malaysia dengan permintaan yang terus meningkat seiring dengan gejolak dan naiknya harga minyak bumi, permintaan meningkat 14,23% *Crude Palm Oil* untuk setiap tahunnya dan masih terus berkembang (Statistik Republik Indonesia, 2009).

Keadaan bertolak belakang pada negara Indonesia, Indonesia terus mengekspor bahan baku pembuatan bahan bakar alternatif biodiesel tetapi Indonesia sendiri jauh dari mandiri bahan bakar. Pemerintah Indonesia masih melakukan subsidi untuk pemakaian bahan bakar minyak untuk masyarakat sehingga jika terjadi gejolak kenaikan harga minyak dunia maka Indonesia akan mengalami permasalahan ekonomi yang sulit.

Indonesia memiliki potensi besar untuk mengembangkan biodiesel sebagai energi alternatif dengan bahan baku yang berlimpah sehingga Indonesia dapat

menuju mandiri energi khusus untuk bahan bakar diesel yang digantikan dengan biodiesel. Keberadaan industri biodiesel saat ini mensintesis biodiesel dengan reaksi rute alkohol dimana trigliserida yang berasal dari minyak kelapa sawit direaksikan dengan senyawa alkohol seperti NaOH atau KOH untuk melangsungkan reaksi transesterifikasi antara trigliserida dan alkohol menghasilkan asam lemak metil ester yang merupakan biodiesel dan gliserol sebagai produk samping. Proses ini terdapat beberapa kelemahan seperti (Marchetti, 2007) ;

- Kebutuhan energi yang besar dimana reaksi harus dijaga pada suhu 70°C dan dengan pengadukan.
- Terbentuknya produk samping berupa senyawa sabun hasil reaksi antara katalis dengan asam lemak bebas.
- Kualitas kemurnian produk samping, gliserol yang rendah sehingga penjualan gliserol diperlukan pemurnian kembali.
- Kontaminasi biodiesel oleh katalis sehingga diperlukan penetralan dan pencucian.
- Air hasil pencucian mengandung senyawa alkohol yang berbahaya bagi lingkungan sehingga diperlukan penanganan khusus.

Kelemahan yang terdapat pada proses sintesis biodiesel dengan reaksi rute alkohol dapat digantikan dengan reaksi rute non-alkohol dimana trigliserida yang berasal dari minyak kelapa sawit direaksikan dengan senyawa alkilester seperti metil ester sebagai pengganti senyawa alkohol dengan bantuan biokatalis, enzim lipase menghasilkan asam lemak metil ester sebagai biodiesel dan triasilgliserol sebagai produk samping. Sintesis biodiesel dengan reaksi rute non-alkohol memiliki keunggulan sebagai berikut seperti (Marchetti, 2007):

- Reaksi berlangsung pada suhu yang lebih rendah, 30°-40°C sehingga reaksi tidak memerlukan energi yang besar.
- Tidak terjadi reaksi penyabunan
- Reaksi samping menghasilkan triasilgliserol yang memiliki harga jual tinggi
- Pemisahan produk dapat dilakukan dengan mudah
- Proses industri berjalan ramah lingkungan

Enzim lipase sebagai biokatalis menentukan keberhasilan terbentuknya biodiesel dengan *yield* yang tinggi sehingga diperlukan enzim lipase yang potensial dalam mengkatalis pembentukan biodiesel. Enzim lipase sendiri sebagai biokatalis telah dikembangkan dan dikomersialkan untuk berbagai reaksi senyawa minyak dan lemak seperti enzim lipase komersial *candida rugosa* dan enzim lipase *porcine pancreas*.

Penggunaan enzim lipase sebagai katalis biodiesel dapat meningkatkan biaya produksi sehingga akan menaikkan harga jual biodiesel. Harga biodiesel yang terlalu tinggi dibandingkan petroleum diesel akan menjadi pertimbangan bagi konsumen untuk menggunakan biodiesel. Oleh karena itu, penggunaan enzim lipase sebagai biokatalis sintesis biodiesel dimaksimalkan dengan metode immobilisasi enzim dimana enzim digabungkan dengan matriks padat (*support*) secara fisik sehingga enzim dapat digunakan berulang kali pada sistem kontinyu.

Dalam penelitian ini, percobaan difokuskan pada metode imobilisasi *entrapment* lipase untuk sintesis biodiesel dengan reaksi rute non alkohol. Penelitian dimulai dengan mengimobilisasi enzim lipase dengan *support* zeolit yang memiliki poros sebagai tempat mengunci lipase. Lipase yang telah terimobilisasi akan diujikan untuk sintesis biodiesel. Sintesis biodiesel akan dilakukan dalam reaktor batch dalam erlenmeyer dan kontinyu yaitu reaktor *packed bed* (PBR) dimana melalui reaktor ini akan diukur kemampuan (aktivitas) dari biokatalis untuk mengkonversi minyak kelapa sawit menjadi biodiesel. Hasil reaksi yang didapatkan akan dianalisis menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) dan besarnya konversi biodiesel digunakan untuk menentukan keaktifan imobilisasi lipase.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan maka dapat disimpulkan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Berapakah kondisi optimal total enzim dalam *support* zeolit dengan metode imobilisasi *entrapment* ?
- Berapakah enzim *loading* atau enzim lipase yang termobilisasi dengan menggunakan metode *entrapment* pada *support* zeolit ?

- Berapakah % *yield* biodiesel yang dihasilkan dari sintesis biodiesel rute non-alkohol menggunakan enzim lipase terimobilisasi pada reaktor *batch* ?
- Berapakah % *yield* biodiesel yang dihasilkan dari sintesis biodiesel rute non-alkohol menggunakan enzim lipase terimobilisasi pada reaktor kontinyu, reaktor *packed bed* ?
- Bagaimanakah model kinetika reaksi enzim yang mengikuti reaksi interesterifikasi dalam sintesis biodiesel dan penentuan nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$ ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah

- Mendapatkan kondisi optimal total enzim dalam *support* zeolit dengan metode imobilisasi *entrapment*.
- Mendapatkan enzim lipase terimobilisasi didalam zeolit dengan aktifitas dan konsentrasi yang tinggi sebagai biokatalis.
- Mendapatkan persentase *yield* biodiesel yang dihasilkan melalui sintesis biodiesel rute non-alkohol menggunakan biokatalis terimobilisasi pada sistem *batch* dan kontinyu, reaktor *packed bed*.
- Mendapatkan pendekatan model kinetika reaksi enzim yang mengikuti reaksi interesterifikasi dalam sintesis biodiesel untuk menentukan nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$ .

### 1.4 Batasan Masalah

Dalam penelitian ini, pembatasan masalah yang akan dibahas adalah sebagai berikut :

1. Lipase yang digunakan dalam penelitian ini adalah lipase *Candida rugosa*
2. Substrat yang digunakan untuk memproduksi biodiesel adalah minyak sayur dari kelapa sawit dan metil asetat.
3. Metode imobilisasi yang digunakan adalah *entrapment* dengan *support* zeolit bogor dan agen NaF.
4. Sintesis biodiesel rute non alkohol pada sistem *batch* dilakukan dalam erlenmeyer.

5. Sintesis biodiesel rute non alkohol pada sistem kontinyu dalam reaktor *packed bed*.
6. Analisa konversi biodiesel menggunakan HPLC berdasarkan standar metiloleat.

### **1.5 Sistematika Penulisan**

Sistematika penulisan dalam skripsi ini adalah sebagai berikut :

#### **BAB I PENDAHULUAN**

Menjelaskan tentang latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

#### **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

Menjelaskan tentang prinsip dasar ilmu yang berkaitan dengan penelitian ini.

#### **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

Menjelaskan tentang diag alir percobaan, bahan dan alat yang digunakan serta prosedur penelitian yang akan dilakukan.

#### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

Menjelaskan hasil penelitian dan berbagai analisis terkait hasil penelitian sehingga menjelaskan keadaan sebab-akibat dari keadaan penelitian secara keseluruhan.

#### **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

Menjelaskan hasil akhir dari penelitian yang dapat digunakan atau dilanjutkan pada tahap penelitian selanjutnya.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Biodiesel**

Biodiesel merupakan nama yang diberikan untuk bahan bakar yang terdiri dari monoalkil ester yang dapat terbakar dengan bersih. Nama biodiesel juga telah disetujui oleh *Department of Energy (DOE)*, *Environmental Protection Agency (EPA)* dan *American Society of Testing Materials (ASTM)* sebagai industri energi alternatif, berasal dari asam lemak nabati sehingga dapat diperbaharui (Thessen, 2007). Biodiesel juga dapat ditulis sebagai B100. B100 menunjukkan bahwa biodiesel tersebut murni 100% terdiri atas mono-alkyl ester (Wafa, 2009). Pada Tabel 2.1 merupakan spesifikasi biodiesel secara standar nasional.

Biodiesel sebagai bahan alternatif, mulai diteliti sebagai akibat semakin sadarnya manusia akan pencemaran yang ditimbulkan bahan bakar konvensional (bahan bakar fosil) serta persediaan minyak bumi yang terus menipis. Sebagai bahan bakar yang dapat diperbaharui, biodiesel mempunyai keuntungan antara lain karena mudah digunakan (memerlukan hanya sedikit atau bahkan tidak memerlukan sama sekali modifikasi dari mesin diesel yang telah ada), dapat diurai alam secara alamiah, dan dapat diproduksi secara domestik dari hasil pertanian.

Dibandingkan dengan minyak solar, biodiesel dapat menghasilkan jumlah power, dan torsi yang sama dengan minyak solar dalam jumlah yang sama. Hal ini dikarenakan umumnya biodiesel mempunyai nilai setana yang lebih tinggi dari minyak solar. Selain itu biodiesel juga mempunyai efek pelumasan yang lebih baik daripada minyak solar. Biodiesel juga sesuai dengan komponen mesin disel emisi gas buang yang dihasilkan ternyata juga lebih baik dalam beberapa hal bila dibandingkan dengan menggunakan bahan bakar fosil.

**Tabel 2.1. Standar Nasional Biodiesel (Badan Standardisasi Nasional, 2006)**

No	Parameter	Unit	Nilai	Metode
1	Densitas (40°C)	Kg/m <sup>3</sup>	850 - 890	ASTM D 1298
2	Viskositas (40°C)	Mm <sup>2</sup> /s (cSt)	2,3 – 6,0	ASTM D 445
3	Cetane Number		Min. 51	ASTM D 613
4	<i>Flash Point (close up)</i>	°C		
5	<i>Cloud point</i>	°C		
6	<i>Copper Strip Corrosion</i> (3 jam, 50°C)		Max. No 3	ASTM D 130
7	Karbon Residu	% massa	Max. 0,05 (Max. 0,3)	ASTM D 4530
	Sampel 10% dist residu			
8	Air dan sedimen	% vol	Max. 0,05*	ASTM D 2709 atau ASTM D1160
9	Temperatur destilasi, 90% recovered	°C	Max. 360	ASTM D 1160
10	<i>Sulfated ash</i>	% mass	Max. 0,02	ASTM D 874
11	Sulfur	Ppm (mg/kg)	Max. 100	ASTM D 5453 atau ASTM D1266
12	<i>Phosphorous content</i>	Ppm (mg/kg)	Max. 10	AOCS Ca 12- 55
13	Bilangan asam (NA)	Mg-KOH/g	Max. 0,8	AOCS Cd 3-36 atau ASTM D 664
14	<i>Free Gliserin</i>	% mass	Max. 0,02	AOCS Ca 14- 56 atau ASTM D6584
15	Total Gliserin (Gttl)	% mass	Max. 0,24	AOCS Ca 14- 56 atau ASTM D6584
16	Kandungan <i>freeester</i>	% mass	Min. 96,5	Metode Titrasi
17	Bilangan iodin	% mass (g I <sub>2</sub> /100g)	Max. 115	AOCS Cd 1-25
18	<i>Halphen test</i>		Negative	AOCS Cd 1-25

## 2.2. Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit terdiri dari sebagian besar trigliserida, serta monogliserida dan digliserida. Terdapat berbagai variasi struktur dan jumlah karbon dari rantai asam lemak yang ada dalam trigliserida minyak sawit. Variasi

tersebut menentukan sifat kimia dan fisika minyak sawit Panjang asam lemak yang ada dalam trigliserida bervariasi tetapi secara umum minyak kelapa sawit terdiri dari asam lemak palmitat dan oleat. Pada Tabel 2.2 adalah perbandingan komposisi minyak kelapa sawit dengan beberapa minyak nabati lainnya dimana kandungan asam lemak palmitat dan oleat sebagai bahan baku biodiesel dimiliki oleh minyak kelapa sawit.

**Tabel 2.2. Komposisi asam lemak dari minyak kelapa sawit (%) (Marchetti, 2007)**

Asam Lemak	Kacang Kedelai	Minyak kapas	Minyak Sawit	Lard	Tallow	Kelapa
Laurat	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	46,5
Meristat	0,1	0,7	1	1,4	2,8	19,2
Palmitat	10,2	20,1	<b>42,8</b>	23,6	23,3	9,8
Stearat	3,7	2,6	4,5	14,2	19,4	3
Oleat	22,8	19,2	<b>40,5</b>	44,2	42,4	6,9
Linoleat	53,7	55,2	10,1	10,7	10,7	2,2
Linolenic	8,6	0,6	0,2	0,4	0,4	0

### 2.3 Lipase

Lipase ( EC. 3.1.1.3, triasilgliserol asilhidrolase) merupakan enzim yang menghidrolisis secara *reversible* lemak nabati dan hewani dibawah kondisi alami dari lipase. Enzim lipase berkembang mulai dari enzim lipase yang kurang mendapat perhatian dikarenakan produksi enzim lipase yang belum dimanfaatkan secara ekonomi sehingga masih tinggi nilai ekonominya. Pada saat ini ekonomi enzim dapat ditekan menggunakan ilmu dan teknologi molekular biologi seperti teknologi rekombinan DNA dan protein *engineering* yang digunakan untuk produksi pada skala yang besar dan sifat propertis yang sempurna.

Penelitian mengenai enzim lipase pada saat ini ditunjukkan pada kemampuan dari enzim lipase seperti berbagai kemungkinan substrat, stabilitas enzim lipase pada suhu ekstrim, pH dan pelarut organik, dan bagian-bagian struktural enzim lipase. Propertis ini dioptimalkan untuk katalis berbagai reaksi dengan hasil produk yang lebih sederhana, menurunkan biaya pengolahan limbah, dan pada kondisi suhu atau tekanan yang dibutuhkan. Selain itu, penelitian juga

ditunjukkan pada berbagai sumber lipase baik dari hewan, tanaman, dan mikroorganisme dimana aktifitas enzim dicari yang terbaik pada sistem air-substrat tidak terlarut dan pada sistem substrat pada permukaan minyak-air.

Pada sistem emulsi aktifitas maksimum didapatkan dari aktifitas enzim lipase pada area permukaan substrat. Lipase tidak hanya aktif pada sistem emulsi dimana substrat dilarutkan pada sistem minyak dalam air tetapi juga aktif pada sistem emulsi air dalam minyak dan dalam sistem berkebalikan yang mengandung pelarut organik dari substrat.

### 2.3.1 Sumber Lipase

Enzim Lipase terdapat pada hewan tingkat tinggi, tumbuhan, dan mikroorganisme yang menggunakan reaksi biologis dari lemak. Organisme ini membutuhkan enzim lipase untuk mencerna lemak, aliran lemak sebagai sumber energi dalam organisme tersebut, menyimpan lemak, dan fasilitas transfer lemak dari satu organisme ke organisme lainnya.

Lipase dari hewan terdapat pada pankreas dan lambung yang diekstrak dari babi atau pankreas manusia. Lipase ini memotong trigliserida, minyak, lemak, lemak ester sederhana, dan aryl ester. Lipase dari hewan baik untuk menghidrolisis asam lemak lebih dari 12 atom karbon (C) dan dominan pada posisi gliserol C-1. Laju reaksinya menurun berdasarkan substrat tri-, di-, dan monogliserida. Pada lipase *porcine* terdiri dari rantai tunggal 449 asam amino dan berat molekul protein 50.000 serta tambahan berat residu glikosidik menjadi berat total 52.000 dengan analisis kesetimbangan endapan. Residu serin merupakan tempat melekatnya substrat pada lokasi 152 dan terjadi dalam sekuens Gly-His-Ser-Leu-Gly yang homolog dengan lipase lainnya.

Lipase lainnya yang berasal dari lambung (*pregastric*) lipase berasal dari kambing, domba, dan sapi. Lipase ini cenderung menghidrolisis rantai asam lemak pendek seperti asam lemak dalam susu dan digunakan sebagai rasa spesial dalam keju.

Lipase tipe kedua berasal dari tumbuhan, *crude* lipase bisa didapatkan dari isolasi *rabe* (*Brassica napus*), *mustard* (*Sinaps alba*), *castor bean* (*Ricinus communis*) dan kotyledon dari *lupine* (*Lupinus albus*), dan minyak nabati

*Germinating*. Lipase ini menghidrolisis posisi 1,3 triasilgliserol dengan aktivitas maksimum pada pH 8 dan 9. Lipase yang terakhir dan paling umum berasal dari mikroorganisme yang diproduksi secara fermentasi oleh jamur atau bakteri. Produk industri biasanya menggabungkan lipase dan *esterase*, bakteri seperti *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Chromobacterium spp.*, *Achromobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, merupakan bakteri yang umum memproduksi lipase (Banu, 2001).

Lipase dari *Aspergillus species* seperti *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* memiliki massa molekul 200.000 sampai 250.000 dengan pH optimum antara 4,5 sampai 6,5. Lipase dari *Aspergillus species* bekerja pada minyak kelapa, minyak *linseed*, dan minyak zaitun dengan *yield* 48-93%. Lipase dari *Candida rugosa* memiliki massa molekul 120.000 dengan titik isoelektrik pH 4,5 dan optimum pada pH 6,5 sampai 7,5 dapat menghidrolisis minyak zaitun dengan *yield* 95-97% (Banu, 2001).

Lipase dari *Rhizopus* seperti *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. niveus*, *R. delemar* memiliki massa molekul 43.000 dengan isoelektrik pada pH 6,3. Enzim lipase dari *Rhizopus* merupakan glikopeptida yang terdiri dari 13-14% mannose untuk setiap molekul. Lipase ini aktif pada 1,3 spesifik dengan pH optimum 5 – 7 dan suhu maksimum 30-45°C. Lipase dari *Mucor species*, mengkatalis gliserol pada reaksi transesterifikasi pada posisi sn-1,3 pada spesifik rantai asam lemak (Banu, 2001).

Lipase dari *Pseudomonas*, memiliki massa molekul 29.000 dan isoelektrik pH 5,8 dan pH optimum sekitar 6,5-8,5. Lipase dari *Pseudomonas* aktif dan stabil pada alkali sehingga dapat digunakan pada detergent sama seperti lipase dari *Hunicola languinosa* dengan pH 5. Secara umum sumber lipase terangkum pada Tabel 2.3.

**Tabel 2.3. Sumber Lipase Mikrobial (Banu, 2001)**

Mikroorganisme Penghasil Lipase	
<i>Bacterial</i>	<i>Fungal</i>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Candida curvata</i>
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Candida deformans</i>
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Candida quillermonti</i>
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Geotrichum</i>
	<i>Candidum</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Geotrichum</i>
	<i>cyclopium</i>
	<i>Humicola lanuginosa</i>

### 2.3.2. Klasifikasi Lipase

Keuntungan utama dari enzim lipase sebagai reaksi enzimatik dari reaksi kimia adalah enzim lipase yang spesifik. Spesifik lipase dikontrol dengan molekular propertis dari enzim, struktur substrat, dan faktor binding dari substrat enzim. Spesifik asam lemak dari lipase telah digunakan untuk memproduksi struktur lemak untuk makanan sehat dan memperkaya lemak dengan spesifik asam lemak tertentu ditingkatkan sebagai nutrisi dari minyak atau lemak. Terdapat tiga tipe dari lipase spesifik: positional, substrat, dan stereospesifik (Banu, 2001).

#### 2.3.2.1. Nonspesifik Lipase

Lipase nonspesifik merupakan lipase yang menghidrolisis semua ikatan gliserida yang terbentuk antara asam lemak dan gliserol secara acak, dimana posisi molekul gliserida tidak mempengaruhi hidrolisis. Lipase nonspesifik seperti lipase dari *Candida rugosa*, *Corynebacterium acnes*, *Chromobacterium spp.*, dan *Staphylococcus aureus* (Banu, 2001).

### 2.3.2.2. Posisi Spesifik

Lipase spesifik merupakan lipase yang memotong ikatan ester posisi sn-1,3 dari triasilgliserol yang dipotong pada terminal posisi. Stearat hidrat (*hidrance*) mencegah asam lemak posisi sn-2 untuk masuk sisi aktif. Pada reaksi ini terjadi asil migrasi, 2-asam lemak akan tertekan kearah posisi 1 tau 3 dari molekul gliserol. Proses ini berlangsung lambat, hidrolisis berjalan lambat menunggu migrasi asil selesai sehingga lipase dapat menyerang gliserida pada posisi 1 dan 3. Lipase dengan spesifikasi ini dihasilkan oleh *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, dan *Rhizopus delemar* (Banu, 2001).

### 2.3.2.3. Lipase Spesifik pada Panjang Asam Lemak

Beberapa enzim lipase mempunyai afinitas terhadap asam lemak pendek tertentu (asetic, butiric, capric, caproic, caprylic, dan lainnya) dan juga enzim lipase tertentu terhadap panjang asam lemak sedang dan panjang. Sebagai contoh, enzim lipase *porcine* yang lebih spesifik pada asam lemak pendek, lipase dari *Pinicillium cyclopium* yang spesifik pada asam lemak panjang, dan lipase dari *Aspergillus niger* dan *Aspergillus delemar* yang spesifik pada panjang asam lemak medium dan pendek. Namun terdapat juga enzim lipase yang teridentifikasi dapat spesifik pada semua ukuran panjang asam lemak. Seperti pada enzim lipase *Candida rugosa* (Banu, 2001).

### 2.3.2.4. Lipase Spesifik pada Asam Lemak

Kebanyakan lipase memiliki spesifikasi substrat asam lemak, lipase dari mikroorganisme memiliki rentang spesifikasi yang rendah hanya *Geotrichum candidum* spesifik pada asam lemak yang mengandung cis-9 ikatan rangkap. Lipase spesifik pada hidrolisis asam lemak dari ikatan gliserida yang terbentuk dari cis-9 ikatan asam lemak tidak jenuh. Rantai asam lemak yang spesifik dari *Candida rugosa* adalah dimulai dari oleat > laureat > palmitat > myristat > stearic. Secara menyeluruh dijelaskan pada Tabel 2.4.

**Tabel 2.4. Spesifikasi Substrat Trigliserida (Banu, 2001)**

Sumber Lipase	Trigliserida
<i>C. Viscosum</i>	C4-FA
<i>Bacillus spp.</i>	C8-FA
<i>G. Candidum</i>	C18-FA
	C8-FA
	C16-FA
<i>H. Lanugiosa</i>	C12-FA
<i>P. Nitens</i>	C8-FA
<i>S. Lipolytica</i>	C18-FA
<i>C. Cylindracea</i>	C18-FA
<i>P. Cyclopium</i>	C18-FA
	C16-FA

### 2.3.3. Reaksi yang dikatalis Lipase

Lipase telah digunakan pada berbagai variasi reaksi dimana tidak seperti enzim hydrophilik lainnya, enzim lipase memiliki sifat unik tersendiri yang stabil dalam pelarut organik nonpolar dan dapat menerima substrat dengan rentang tertentu dan struktur stereo substrat yang kompleks. Enzim lipase memiliki struktur utama protein yang fleksibel atau memiliki berbagai perubahan susunan sehingga memungkinkan enzim lipase memaksimalkan berbagai reaksi seperti hidrolisis dan kebalikannya hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi (asidolisis, interesterifikasi, alkoholisis), aminolisis, oximolysis, dan thiotransesterifikasi. Keseimbangan antara reaksi hidrolisis dan reaksi kebalikannya atau sintesis diatur oleh aktifitas air dalam campuran reaksi.

#### 2.3.3.1. Hidrolisis

Enzim lipase mengkatalis pemotongan ikatan ester pada triasilgliserol dengan mengkonsumsi molekul air, yang disebut hidrolisis terlihat pada Gambar 2.1. Industri pemisahan asam lemak di Amerika menggunakan metode Colgate-Emery menggunakan *superheated steam* untuk disemprotkan menuju lemak menggunakan *sparger* dengan kondisi proses pada tekanan 700 psig dan suhu 240-260°C atau lebih tinggi dengan lemak yang masuk dalam proses dipisahkan

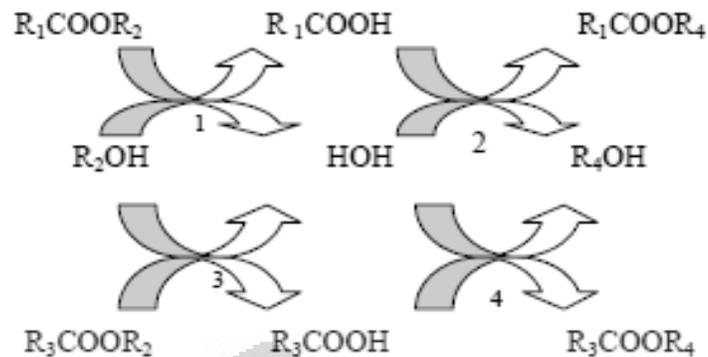
dengan gas nitrogen. *Polyunsaturated* lemak dapat terdegradasi dengan baik tetapi pemisahannya harus menggunakan operasi distilasi. Metode ini membutuhkan 340 *Btu* untuk setiap *pound* (lb) lemak yang dipisahkan sehingga proses ini mahal.

Metode lainnya yang murah dan efisien untuk menghidrolisis molekul besar lemak menjadi asam lemak dan gliserol telah dikembangkan yaitu menggunakan enzim lipase sebagai katalis dalam reaksi. Hidrolisis dilakukan dengan menambahkan pelarut organik dan suhu ruang menghasilkan *yield* dalam bentuk perubahan warna dan oksidasi peralatan. Asam lemak yang dihasilkan merupakan asam lemak bebas dibandingkan dengan bentuk asam basa yang hilang pada saat menggunakan pelarut organik sebagai pencuci.

Penggunaan enzim lipase sebagai pemisah asam lemak dengan kehadiran air berlebih pada kondisi tekanan dan suhu tertentu yang spesifik menghasilkan *yield* yang tinggi dan mengurangi limbah. Metode ini digunakan untuk memproduksi asam lemak, digliserida, dan monogliserida, agen pewangi dan detergen.

#### **2.3.3.2. Esterifikasi**

Reaksi esterifikasi merupakan reaksi antara asam lemak bebas dan alkohol, kebalikan dari reaksi hidrolisis. Reaksi dikatalis dengan enzim lipase dalam sistem sedikit air pelarut organik dengan kondisi reaksi tingkat aktifitas air yang rendah atau sistem pembebasan pelarut. Sintesis ester dapat dilakukan dengan reaksi kimia menggunakan katalis asam atau basa ditambahkan dengan teknologi enzim yang menghasilkan reaksi yang maksimal dimulai dari kondisi reaksi, mengurangi reaksi samping, dan reaksi yang spesifik. Sebagai contoh, reaksi kimia ditambahkan katalis enzim lipase menghasilkan nilai tinggi pada sintesis ester asam oleat, *aliphatic*, dan terpenoid alkohol. Berikut dalam Gambar 2.1 dijelaskan berbagai reaksi esterifikasi.



Gambar 2.1. Skema reaksi lipase dimana 1. Hidrolisis; 2. Sintesis Ester; 1 dan 2 alkoholisis; 1 dan 3 asidolisis; 1, 2, 3, dan 4 transesterifikasi (Banu, 2001).

### 2.3.3.3. Transesterifikasi

Transesterifikasi merupakan proses pertukaran radikal asil antara ester dan asam (asidolisis), antara ester dan ester lainnya (interesterifikasi), dan antara ester dan alkohol (alkoholisis) sesuai pada Gambar 2.1. Transesterifikasi pada industri dilakukan dengan memanaskan campuran ester dan reaktan lainnya pada suhu tinggi. Aplikasi enzim lipase dapat melangsungkan reaksi pada kondisi yang alami, mengurangi reaksi samping, dan reaksi yang spesifik. Sebagai contoh, produksi mentega dari kelapa dapat lebih murah dengan penyempurnaan reaksi menggunakan lipase sebagai katalis transesterifikasi yang menyertakan setengah fraksi minyak sawit dan asam stearat, atau minyak sawit dan triasilgliserol.

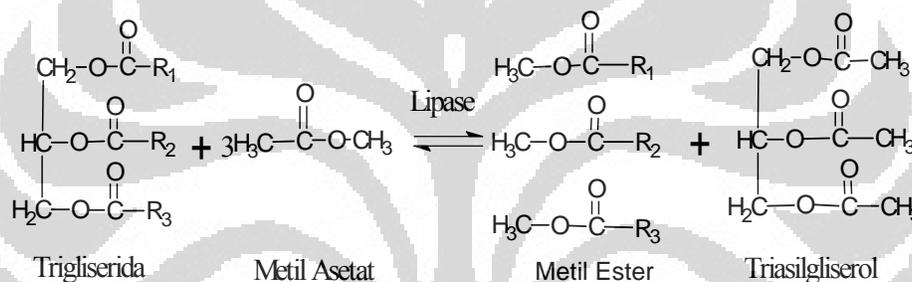
### 2.3.3.4. Interesterifikasi

Enzim lipase digunakan sebagai pengganti katalis alkali dalam pembuatan biodiesel rute alkohol atau reaksi esterifikasi. Triglicerida direaksikan dengan senyawa alkohol seperti metanol sebagai sumber gugus alkil berupa metil untuk menyusun biodiesel berupa metil ester. Penggantian katalis alkali menjadi enzim lipase bertujuan untuk meningkatkan konversi triglicerida menjadi biodiesel terhambat oleh sifat enzim lipase yang menjadi tidak aktif pada kondisi beralkohol. Oleh karena itu, alkohol sebagai sumber alkil digantikan dengan senyawa metil asetat sebagai sumber alkil untuk membentuk biodiesel.

Penggantian alkohol dengan alkil asetat menjadikan reaksi berupa reaksi interesterifikasi yang menghasilkan biodiesel dan triasilgliserol. Reaksi interesterifikasi merupakan reaksi yang memodifikasi sifat fisik campuran minyak

atau minyak atau lemak dengan menyusun ulang gugus asam lemak di dalam dan diantara trigliserida yang berbeda. Reaksi interesterifikasi dalam mensintesis biodiesel disebut dengan sintesis biodiesel rute non alkohol dimana bertujuan untuk mendukung lipase sebagai biokatalis yang digunakan dalam sintesis biodiesel.

Hasil reaksi interesterifikasi berupa biodiesel dengan tingkat konversi atau *yield* yang tinggi dan produk samping bernilai jual tinggi berupa triasgliserol. Peningkatan stabilitas enzim lipase sebagai katalis dan produk samping yang bernilai tinggi diharapkan dapat mendukung berkembangnya sintesis biodiesel sebagai bahan bakar energi alternatif. Mekanisme interesterifikasi dapat dilihat pada gambar 2.2 ;



**Gambar 2.2. Reaksi Interesterifikasi trigliserida (Wafa, 2009)**

Terdapat beberapa kelebihan interesterifikasi enzimatis dibandingkan dengan reaksi esterifikasi menggunakan katalis alkali diantaranya (Marchetti, 2007):

- Tidak melibatkan NaOH (*flammable* dan *reaktif*)
- Tidak menghasilkan limbah cair atau limbah padat
- Mengurangi kehilangan minyak
- Lebih ramah lingkungan

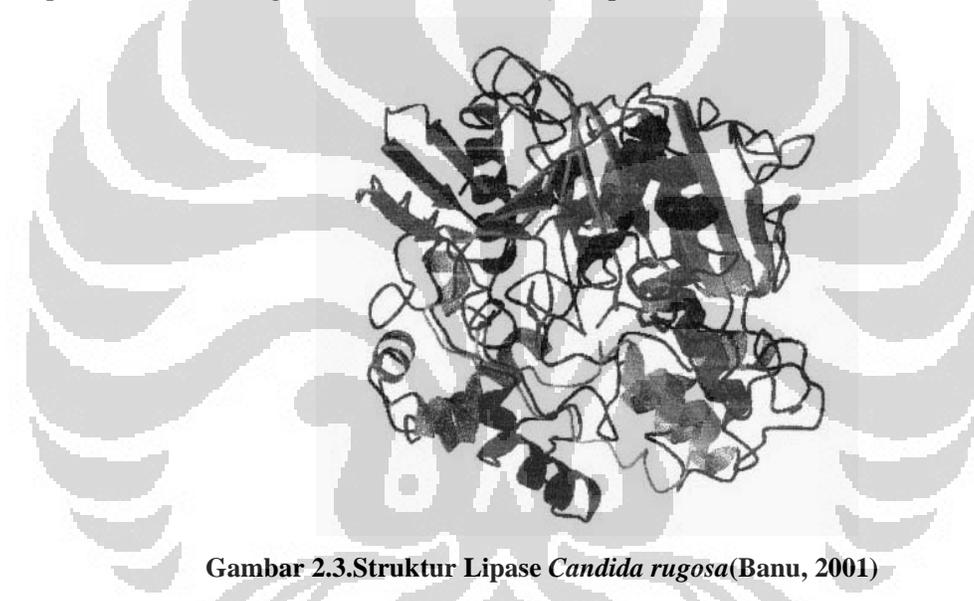
### 2.3.4. Sifat Propertis Lipase

#### 2.3.4.1. Struktur Dimensi Lipase

Lipase bisa didapatkan dari berbagai sumber tetapi memiliki struktur tiga dimensi yang hampir sama. Pada tahun 1990 sampai 1995, seorang ahli grafik

kristal telah mengidentifikasi struktur 11 lipase berbeda dan esterase yang meliputi 4 enzim lipase fungi, lipase bakteri, dan lipase pankreas manusia. Struktur ini telah dilihat dari berbagai sisi dari ukuran, homolog sequence, substrat, aktivator, inhibitor, dan propertis lainnya.

Karakteristik umum dari semua lipase adalah berbentuk  $\alpha/\beta$  struktur dengan campuran pada bagian tengah  $\beta$ - lapisan yang mengandung residu katalitik. Struktur interior dari  $\alpha/\beta$  hidrolase adalah lipatan besar protein  $\beta$  teruntai lima lembar pada enzim lipase, terpisah dari  $\alpha$  -heliks, dan seperti dua lembar berbentuk superheliks. Heliks peptida terpaket dalam permukaan depan dari protein. Struktur tiga dimensi *Candida rugosa* pada Gambar 2.3.



**Gambar 2.3. Struktur Lipase *Candida rugosa* (Banu, 2001)**

Secara umum, lipase merupakan polipeptida yang terlipat menjadi dua domain, terminal C-domain dan terminal N-domain. Terminal N-domain mengandung sisi aktif yang hydrophobik berasal dari bagian serin menuju permukaan sehingga dapat mengikat asam lemak yang panjang. Pada bagian tengah lipase pada umumnya terdiri atas histidin dan asam amino seperti (Asp atau Glu) dengan nuklephilic serin pada bagian sisanya diantara  $\beta$  strand dan  $\alpha$  heliks (Banu, 2001).

### 2.3.4.2. Inhibitor dan Aktifator

Ion logam berat merupakan inhibitor untuk aktifitas lipase tetapi ion dari logam alkali meningkatkan aktifitas lipase. Ion alkali yang paling efektif sebagai aktifator adalah kalsium. Ion menstimulasi katalis minyak zaitun dengan;

1. Mengikat ion dengan bagian enzim sehingga mengubah bentuk sesuaian enzim
2. Mempertinggi adsorpsi pada lipase permukaan sentuh (interfacial)
3. Menghilangkan asam lemak hasil hidrolisis pada interfacial minyak-air dengan mengikatkannya pada ester lainnya sehingga mencegah asam lemak menjadi inhibitor

Banyak zat yang dapat menghambat aktifitas lipase seperti anion dari surfaktan, protein tertentu,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ , asam boronic, senyawa yang mengandung fosfat seperti dietil—dinitrophenilfloro fosfat. Selain itu juga,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , EDTA, dan natrium duodesil sulfat yang sedikit menghambat aktifitas lipase.

Aktifator atau inhibitor lipase yang ada baik ion atau reagen bergantung pada substrat, sumber enzim, dan kondisi pengujian. Garam empedu, natrium tauodeoxycolate menghambat lipase pankreas ketika mengkatalis substrat tributirin dan 10 kDa (kilo dalton) protein lipase dapat berbalik menghambat inhibitor, tetapi garam empedu dapat menstimulasi proses hidrolisis ketika substrat yang digunakan adalah triolein. Hal ini terjadi dikarenakan triolein merupakan substrat alami dibandingkan dengan tributirin.

Untuk lipase *Candida rugosa*, aktifitasnya dapat ditingkatkan dengan stimulasi garam kalsium yang meningkatkan produk asam lemak tetapi hanya dalam fase emulsi. Garam kalsium hanya menjadi aktifasi pada substrat minyak zaitun tidak pada tributirin. Pada sistem tidak teremulsi, kalsium tidak mempengaruhi lipase *Candida rugosa* untuk menghidrolisis minyak zaitun tetapi garam empedu cenderung menjadi inhibitor. Penambahan natrium *taurocholate* dalam pengujian hidrolisis minyak zaitun oleh lipase *Candida rugosa* dapat menghambat dari 0,1 mM sampai 0,8 mM per konsentrasi garam empedu. Penambahan garam empedu pada sistem hidrolisis tersebut dapat membuat luas permukaan reaksi untuk adsorpsi oleh lipase tetapi inhibisi terjadi ketika interaksi dengan enzim berupa penurunan tingkat adsorpsi (Banu, 2001).

**Tabel 2.5. Inhibitor dan Aktifator lipase mikrobial (Banu, 2001)**

Sumber	Inhibitor	Aktifator
<i>H. lanuginosa</i>	$\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Sn}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$	Lipase <sup>+</sup> , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$
<i>P. nitens</i>	$\text{Ag}^+$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{KMnO}_4$	Garam empedu mamalia
<i>C. deformans</i>	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , EDTA	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$
<i>A.niger</i>	$\text{Ag}^+$ , iodoasetamide	-----
<i>C. rugosa</i>	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	-----
<i>Bacillus spp</i>	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$	-----
<i>P. fluorescens</i>	$\text{I}_2$ , $\text{Fe}^{3+}$	$\text{Ba}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$
<i>C.viscosum</i>	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Sn}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , garam empedu
<i>B. bassiana</i>	$\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , Tween-80	$\text{Mg}^{2+}$
<i>Porcine Pankreas</i>	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Sr}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , iodine

#### 2.3.4.3. PH Optimum Lipase

Lipase dapat aktif mengkatalis hanya pada pH tertentu bergantung pada sumber lipase tersebut dan bentuk ion dari residu sisi aktif lipase. Basa, asam, dan netral residu merupakan bagian dari sisi aktif lipase, residu pada sisi aktif ini hanya aktif pada keadaan ion tertentu. PH optimum untuk lipase secara keseluruhan sekitar 7,0 – 9,0 dan terdapat juga lipase yang mampu pada pH asam dan basa sekitar pH 4 dan pH 10.

Lipase mikrobial menunjukan kestabilan paling baik pada pH sekitar 6,0 – 7,5 dengan pH asam lebih dari 4,0 dan pH basa lebih dari 8,0. Pada *Pseudomonas* lipase, lipase aktif optimum pada pH 7 dan stabil pada rentang pH 5,0 – 10,5. Selain itu, kondisi pertumbuhan menjadi pertimbangan dikarenakan adaptasi alami yang dilakukan oleh mikroorganisme dapat mengubah aktifitas dan stabilitas. Jika organisme tumbuh pada pH alkali, lipase yang dihasilkan akan

memiliki pH optimum pada pH alkali. Optimal pH dari beberapa lipase mikrobia dapat dilihat Tabel 2.6.

**Tabel 2.6. pH optimum lipase mikrobia (Banu, 2001)**

Sumber	Substrat	pH Optimum
<i>C. cylindraceae</i>	Minyak Zaitun	5,0-7,0
	Tributirat	7,0
<i>P. fluorescens</i>	Minyak Sesame	7,0
<i>Bacillus spp</i>	Minyak Zaitun	5,5-7,2
<i>Lipase I</i>	Minyak Zaitun	8
<i>Lipase II</i>	Minyak Zaitun	6
<i>H. lanuginosa</i>	Minyak Zaitun	7
<i>P. nitens</i>	Minyak Zaitun	6
<i>C. rugosa</i>	Minyak Zaitun	7,1
<i>S. thermophilus</i>	Tributirat	9
<i>S. faecalis</i>	Minyak mentega	7,5
<i>Pseudomonas spp.</i>	Minyak jagung	8,5

#### 2.3.4.4. Optimal Temperatur dan Stabilitas Panas

Kestabilan panas pada enzim dipengaruhi oleh dua faktor, struktur utama protein yang menyusun struktur enzim dan komponen spesifik lainnya seperti polisakarida dan kation divalen ataupun molekul yang membuat stabil. Struktur utama protein yang banyak mengandung asam amino hidrofobik membuat struktur enzim menjadi lebih padat sehingga sulit untuk didenaturasi oleh keadaan lingkungan sekitar. Selain itu, jembatan disulfida dan ikatan lainnya yang membuat struktur menjadi resisten dari denaturasi panas dan denaturasi kimia.

Secara umum, lipase dikenal aktif pada rentang temperatur yang luas. Lipase yang berasal dari hewan dan tanaman biasanya memiliki kestabilan yang lebih rendah dibandingkan lipase ekstraselular dari mikrobia. Lipase pankreas kehilangan aktifitasnya pada temperatur diatas 40°C sedangkan lipase dari *Aspergillus niger* stabil pada 50°C. Temperatur optimal dan kestabilan panas dapat dilihat pada Tabel 2.7.

**Tabel 2.7. Optimum temperatur dan Stabilitas panas lipase lipase mikrobia(Banu, 2001)**

Sumber	Optimum Temperatur °C	Stabilitas °C
<i>P. fluorescens</i>	45	n.d
<i>P. nitens</i>	40	20°C (10 min)
<i>Bacillus spp</i>	60	40°C (30 min)
<i>C. deformans</i>	40-50	n.d
<i>G. candidum</i>	40	55°C (15 min)
<i>S.thermophilus</i>	45	45°C (1 minggu)
<i>H. lanuginosa</i>	45-55	65°C (60 min)
<i>C. viscosum</i>	65	60°C (10 min)
<i>S. faecalis</i>	40	40°C (10 min)
<i>C. rugosa</i>	30-35	n.d
n.d = tidak ditentukan		

#### 2.3.4.5. Komposisi Asam Amino

Adsorpsi lipase pada daerah interfasial bersifat hidrofobik secara alami yang menjadi interaksi paling bermanfaat untuk lipase sebagai katalis reaksi. Hal ini dipengaruhi oleh komposisi asam amino dari masing-masing enzim yang menentukan fungsional struktur. Komposisi dari asam amino dari beberapa lipase dapat dilihat pada Tabel 2.8.

**Tabel 2.8. Komposisi asam amino lipase mikrobial (Banu, 2001)**

Asam Amino residu	Bacillus spp.	P. Nitens	C. Viscosum		G. candidum	C. Rugosa
			A	B		
Penilalanin	4	10	21	6	28	26
Tirosin	10	13	29	8	18	17
Leusin	22	16	96	26	40	41
Isoleusin	7	11	33	8	18	23
Metionin	1	2	17	1	0	12
Valin	18	21	87	23	24	24
Cistein setengah	1	4	2	0	0	5
Alanin	26	17	120	31	34	43
Glisin	24	17	112	18	40	46-47
Prolin	9	10	34	8	26	28
Asam Glutamat	16	20	89	19	30	33
Serin	14	18	80	22	28	39
Theronin	22	17	105	28	22	31-32
Asam Aspartat	22	36	110	26	54	58
Arginin	7	8	34	9	20	12
Histidin	6	5	27	7	10	4
Lisin	4	11	51	4	16	17
Tritophan	2	2	3	3	8	5
Total	215	238	1050	247	416	464-466

#### 2.3.4.6. Berat Molekul

Berat masing-masing dari enzim lipase berbeda-beda bergantung pada sumber lipase yang digunakan, tetapi secara umum rentang berat molekul sekitar 20 sampai 60 kDa. Beberapa lipase memiliki berat yang sangat tinggi seperti pada *Candida cylindraceae* yang memiliki berat sekitar 120 kDa. Hal ini bergantung pada kumpulan unit protein yang menjadi enzim. Enzim dengan sebuah unit memiliki berat molekul sekitar 30-40 kDa, tetapi lipase dari *Geotrichum candidum* dan *Candida rugosa* lebih besar dari itu sekitar 60 kDa. Berat molekul dari masing-masing mikrobial lipase dapat dilihat Tabel 2.9.

**Tabel 2.9. Berat molekul beberapa lipase mikrobial (Banu, 2001)**

Mikroorganisme	MW (kDa)	Metode Analisis
<i>P. Fluorescens</i>	32	Gel filtrasi
<i>Bacillus spp</i>	22	Gel filtrasi
<i>A. Japonicus</i>	155	SDS-PAGE , Gel filtrasi
<i>G. Candidum</i>	53	Gel filtrasi
	61,6	SDS-PAGE
<i>H. Lanuginosa</i>	39	Gel filtrasi
<i>P. Nitens</i>	26,5	SDS-PAGE , Gel filtrasi
<i>C. Deformans</i>	207	PAGE
<i>S. Faecalis</i>	20,9	Gel filtrasi
<i>C. Cylindraceae</i>	67	SDS-PAGE , Gel filtrasi

#### 2.3.4.7. Isoelektrik point

Isoelektrik point adalah kondisi dimana besarnya nilai muatan listrik adalah nol. Pada keadaan ini protein akan sulit terlarut tetapi jauh dari titik isoelektrik protein akan lebih mudah larut. Pada sistem larutan, gugup protein bermuatan akan berinteraksi dengan molekul air yang polar dan menstabilkan protein, dimana protein pada umumnya hidrophobik. Sedikitnya muatan dan dominasi rantai aliphatik dan aromatik membuat karakter protein untuk sulit terlarut dalam air. Dari isoelektrik point ini, bisa diperkirakan peningkatan gugup berbentuk ion dan kelarutan akan meningkat sehingga dapat digambarkan titik isoelektrik point sangat berpengaruh terhadap kelarutan protein yang berhubungan dengan interaksinya. Berikut ini beberapa pada Tabel 2.10 terdapat beberapa titik isoelektrik dari mikrobial lipase.

**Tabel 2.10. Isoelektrik pH dari lipase mikrobial(Banu, 2001)**

Sumber	Titik Isoelektrik
<i>H. Lanuginosa</i>	6,6
<i>P. Nitens</i>	5,9
<i>G. Candidum</i>	4,4-4,8
<i>S. Faecalis</i>	3,6
<i>P. Fluorescens</i>	4,8-5,1
<i>S. Lipolytica</i>	5,2 (lipase I)
	4,6 (lipase II)
<i>A. Niger</i>	4,0 (lipase I)
	3,5 (lipase II)
<i>C. Rugosa</i>	4,5
<i>C. Antartica</i>	6,5
<i>P. Glumae</i>	7,0

#### 2.4. Imobilisasi Enzim

Imobilisasi mulai dilakukan oleh Nelson dan Giffin pada tahun 1916, dimana mengimobilisasi invertase pada adsorpsi batubara dan aluminium hidroksida (pitcher, 1980). Sedangkan imobilisasi lipase pertama kali dipelajari oleh Brandenberger pada tahun 1956 menggunakan ikatan kovalen pada resin ion-exchange tetapi menggunakan lipase terimobilisasi untuk hidrolisis atau sintesis ester dalam reaksi telah dilakukan Iwai pada tahun 1964 (Aksamoglu., 1997).

Industri pertama yang mengaplikasikan imobilisasi lipase dilaporkan oleh Tosa di Jepang tepatnya di Tanabe Seiyaku yang mengembangkan kolom imobilisasi *Aspergillus oryzae* aminoasilase untuk resolusi sintesis racemic-asam amino untuk perubahan struktur optikal enantiomer. Sekitar tahun 1970, sistem imobilisasi pada skal pilot kembali dibuat di Inggris dan USA. Di Inggris, imobilisasi penicillin asilase dan penicillin amidase digunakan untuk menghasilkan 6-asam amino *penicillanic* (6-APA) dari penicillin sedangkan di USA, imobilisasi glukosa isomerase dikembangkan untuk mengubah glukosa menjadi fruktosa. Keberhasilan aplikasi pada dunia industri mendorong untuk pengembangan lebih lanjut pada teknologi enzim untuk meningkatkan proses industri yang terfokus pada reaktor imobilisasi lipase. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi imobilisasi enzim, faktor penting adalah pemilihan *support* dan metode.

### 2.4.1 Keuntungan Imobilisasi

Proses imobilisasi enzim memberikan beberapa keuntungan ekonomi, keuntungan tersebut berkaitan penggunaan enzim dan *support* yang digunakan. Berikut ini adalah keuntungan mengimobilisasi enzim:

1. Enzim dapat digunakan kembali
2. Proses dapat dilakukan secara kontinyu dan dapat dikontrol
3. Produk lebih mudah dipisahkan
4. Pada kasus tertentu, kemampuan enzim (aktifitas dan stabilitas) dapat diubah dengan baik
5. Produk yang dihasilkan lebih tinggi dan murni, dimana produk samping lebih sedikit terbentuk
6. Kestabilan pH dan Suhu
7. Tidak ada kontaminasi yang ditambahkan enzim
8. Proses berlangsung kontinyu
9. Fleksibelitas pada desain reaktor

Disamping dengan berbagai keuntungan tersebut, aplikasi pada industri masih dibatasi oleh

1. Perbandingan
2. Perilaku tradisional
3. Investasi memerlukan tambahan peralatan baru untuk diimplementasikan pada proses alami dan biaya imobilisasi support serta proses imobilisasi
4. Hilangnya sebagian aktifitas enzim
5. Performa sistem

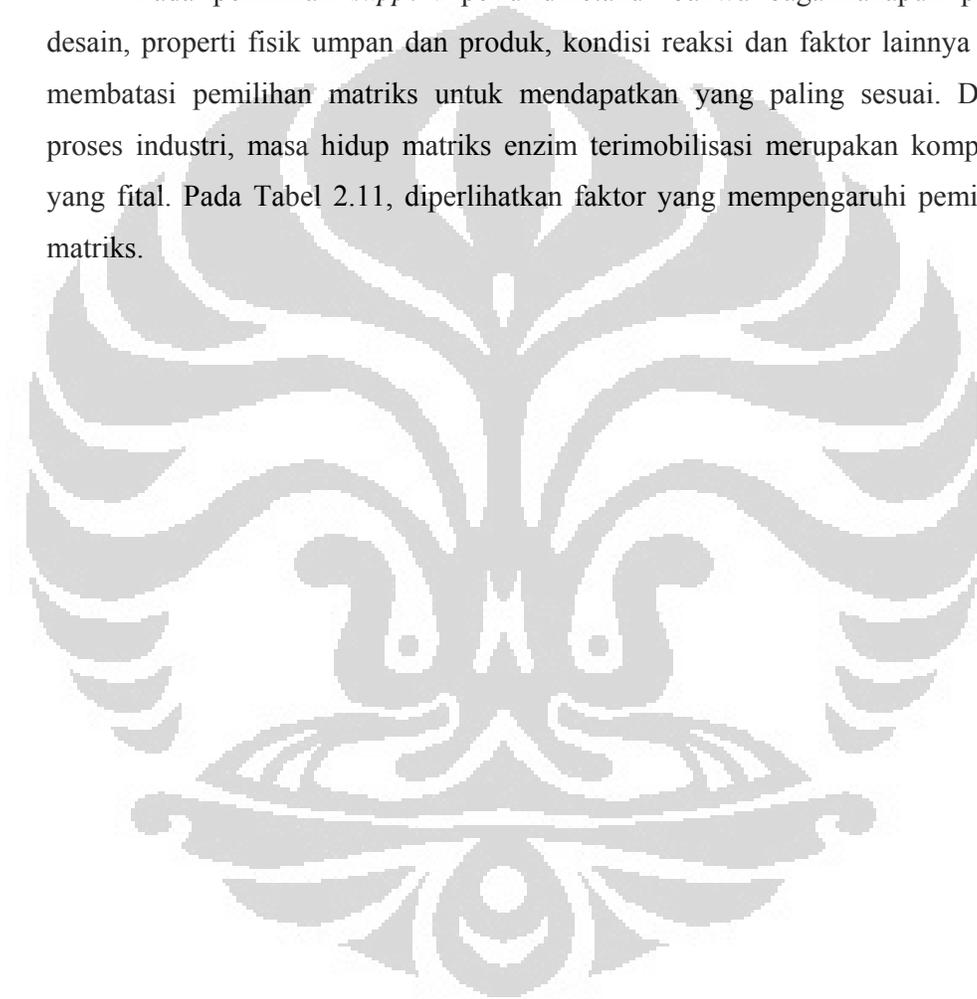
### 2.4.2. Material *Support*

Beberapa material yang memiliki berbagai matriks telah dipelajari untuk imobilisasi di laboratorium. Pemilihan *support* yang optimum berdasarkan beberapa parameter yang berpengaruh pada performa dari hasil imobilisasi. Parameter yang perlu dimiliki *support* ditinjau dari :

1. Luas permukaan area
2. Permeabilitas

3. Ketidaklarutan
4. Stabilitas secara kimia, mekanik dan panas
5. Bentuk dan ukuran yang sesuai
6. Tinggi kekakuan
7. Resistan terhadap serangan mikroba
8. Dapat diregenerasi

Pada pemilihan *support* perlu diketahui bahwa bagaimanapun proses desain, properti fisik umpan dan produk, kondisi reaksi dan faktor lainnya akan membatasi pemilihan matriks untuk mendapatkan yang paling sesuai. Dalam proses industri, masa hidup matriks enzim terimobilisasi merupakan komponen yang vital. Pada Tabel 2.11, diperlihatkan faktor yang mempengaruhi pemilihan matriks.



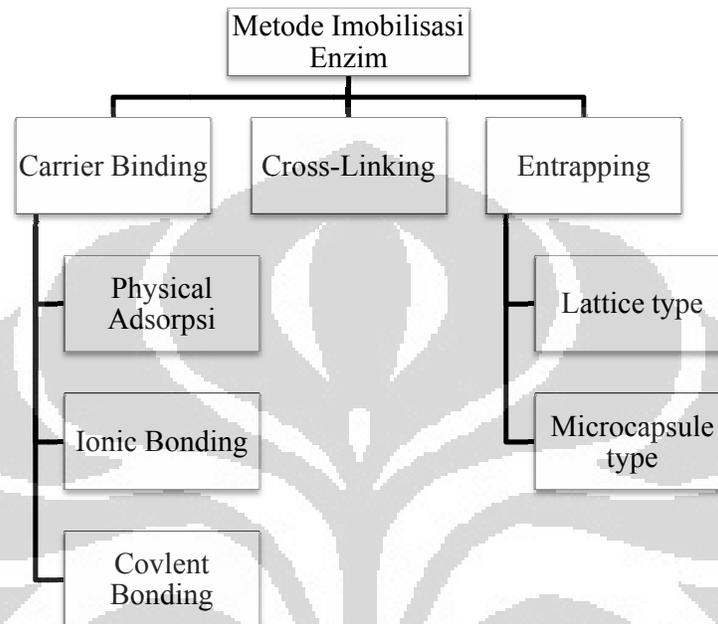
**Tabel 2.11. Faktor yang menjadi pertimbangan pemilihan matriks imobilisasi (Banu, 2001)**

Faktor Pertimbangan	Contoh
Biaya Matriks	Permukaan dextran dan pengontrolan permukaan kaca lebih mahal dibandingkan dengan keramik atau selulosa
Matriks resistan secara kimia	Matriks silika akan mulai larut pada pH diatas 8 sedangkan matriks selulosa dan dekstran dapat didegradasi secara enzimatik. Beberapa polimer organik dapat berubah bentuk pada pelarut organik.
Sifat fisik matriks	Matriks keramik lebih resistan terhadap tekanan dibandingkan dengan permukaan dekstran
Kekompleksan imobilisasi kimia	Ion exchange adsorpsi dapat dihasilkan dengan cepat dan mengurangi terdiaktifasi enzim yang tidak stabil
Stabilitas antara enzim-matriks	Enzim yang diimobilisasi secara fisik mengalami kerusakan lambat perlahan dibandingkan dengan ikatan kovalen dengan enzim.
Kebutuhan khusus untuk proses	Matriks yang sensitif dengan tekanan ( seperti agarosa) tidak sesuai untuk reaktor <i>plug-flow</i> . Matriks magnetik dapat berguna untuk mengembalikan enzim pada reaktor CSTR.

#### 2.4.3. Metode Imobilisasi

Pemilihan metode imobilisasi berdasarkan pada spesifikasi proses yang berlangsung untuk katalis, termasuk parameter secara keseluruhan dari aktifitas enzim, efektifitas penggunaan lipase, deaktivasi dan sifat regenerasi, biaya prosedur imobilisasi, tingkat berbahaya reagen imobilisasi, dan sifat akhir dari imobilisasi. Metode kimia memiliki sifat pembentukan formasi dengan ikatan kovalen antara lipase dan *support*, sementara metode fisik bersifat ikatan yang lemah antara enzim dan *support*. Metode untuk mengimobilisasi terbagi menjadi tiga klasifikasi yaitu, *carrier binding*, *entrapment* dan *cross linking*. Pembagiannya terdapat pada

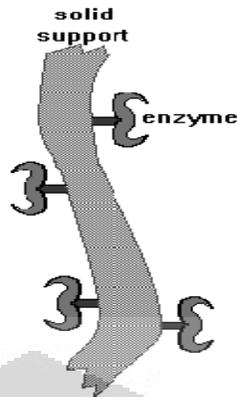
Gambar 2.4 menunjukkan dimana untuk metode ikatan atau *carrier binding* masih terbagi lagi berdasarkan jenis ikatan dan metode penguncian atau *entrapment* diklasifikasi kembali berdasarkan sistem penangkapan enzim.



**Gambar 2.4. Klasifikasi Metode Imobilisasi Enzim(Banu, 2001)**

#### 2.4.3.1. *Carrier Binding*

Metode ini merupakan metode imobilisasi tertua untuk enzim, metode ini mengikatkan enzim kepada *support* yang tidak larut dalam air. Pada metode ini, jumlah enzim yang terikat pada *support* dan aktifitas setelah imobilisasi tergantung pada sifat alami dari *support*. Gambar 2.5 merupakan ilustrasi yang menggambarkan ikatan yang terjadi pada enzim dengan *support* pada metode ini.



**Gambar 2.5. Ilustrasi metode carrier binding (Banu, 2001)**

Pemilihan *support* tergantung pada sifat alami *support* dan enzim tersebut seperti,

- Ukuran partikel
- Permukaan area
- Rasio mol antar grup hidrofilik dan hidrofobik
- Komposisi kimia

Secara umum peningkatan rasio grup hidrofilik didalam membuat enzim loading atau tingkat imobilisasi yang lebih tinggi dan tingkat keaktifan yang lebih tinggi. *Support* yang paling umum digunakan untuk imobilisasi adalah turunan polisakarida seperti selulosa, dekstran, agarose, dan poliakrilamida gel.

Berdasarkan bentuk pengikatan antara *support* dengan enzim maka metode *carrier binding* dapat diklasifikasi kembali menjadi beberapa bagian,

- Adsorpsi (*physical adsorption*)
- Ikatan ion (*Ionic binding*)
- Ikatan kovalen (*Covalent binding*)

#### **2.4.3.1.1. Adsorpsi (*physical adsorption*)**

Metode ini mengimobilisasi enzim berdasarkan pada adsorpsi secara fisik protein enzim kedalam permukaan *support* yang bersifat tidak larut dalam air. Metode ini dicoba pertama kali pada adsorpsi beta-D-fructo-furanosidase kedalam alumunium hidroksida. Metode ini hanya membuat sedikit perubahan struktur enzim atau tidak sama sekali tidak mengubah dan tidak merusak sisi aktif enzim. Pada penggunaan *support* yang tepat, metode ini dapat digunakan dengan mudah dan murah. *Support* juga akan menjaga seminimal mungkin tidak bercampur dalam reaksi dan *support* dengan untuk adsorpsi fisik dapat bertahan lama dan

dapat digunakan kembali, hal ini yang memungkinkan metode ini dapat diaplikasikan pada skala besar imobilisasi.

Bagaimanapun juga terdapat beberapa kelemahan pada metode ini yaitu pada proses penggunaan, enzim dapat terlepas dari *support* dikarenakan gaya ikat antar enzim dan *support* terlalu lemah. Enzim yang diimobilisasi pada *support* padat cenderung hanya memiliki energi ikat yang lemah seperti gaya Van der Waals, interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan ikatan ion. Beragam *support* dapat digunakan tetapi pemilihan *support* lebih cenderung pada aplikasi industri yang dituju seperti kekuatan mekanik, kestabilan fisik dan kimia, sifat hidrofobik/hidrophilik, kapasitas enzim, dan biaya. Pada awalnya, *support* berupa mineral seperti permukaan kaca berporos, tanah diatom, silika, dan alumina tetapi sekarang ini *support* yang umum digunakan berupa *ion exchange resin*, *celite*, dan biopolimer (Banu, 2001).

Keberhasilan dan efisiensi adsorpsi fisik bergantung beberapa parameter. Ukuran protein yang teradsorpsi pada permukaan *support* berupa spesifik area *support* dan permukaan alami *support* seperti porositas dan ukuran pori-pori. Penggunaan *support* berporos merupakan sebuah keuntungan selama enzim teradsorpsi pada permukaan luar *support* dan pori-pori. Efisiensi bergantung pada konsentrasi enzim, besarnya enzim yang teradsorpsi untuk setiap *support* meningkat untuk setiap peningkatan konsentrasi enzim sampai *support* mencapai kejenuhan. Proses ini biasanya berlangsung pada temperatur yang konstan dan adsorpsi berlangsung isotermis mengikuti persamaan Langmuir atau Freundlich. Parameter lainnya adalah pH yang mempengaruhi interaksi ion saat berlangsungnya adsorpsi dan menentukan keberhasilan imobilisasi. Biasanya, maksimum adsorpsi ditinjau dari besarnya pH yang berdekatan dengan *isoelektrik point* dari enzim. Parameter yang terakhir, penambahan air untuk mencampur pelarut selama proses imobilisasi akan membantu adsorpsi dengan mengurangi tingkat kelarutan enzim pada fase larutan.

Selama proses imobilisasi lipase dengan metode adsorpsi, interaksi hidrofobik merupakan gaya utama yang mendorong terjadinya adsorpsi. Interaksi hidrofobik berasal dari tolakan antara interaksi bagian polar-nonpolar sehingga interaksi hidrofobik terbentuk. Interaksi yang terbentuk dalam grup

hidrophobik bukanlah ikatan antara komponen tetapi interaksi yang dipaksa oleh lingkungan polar disekitarnya seperti air. Jika struktur sekitar berubah dengan melarutkan garam atau pelarut organik dalam air maka akan mempengaruhi ikatan hidrophobik. Secara umum, penambahan ion kuat akan meningkatkan ikatan hidrophobik dengan berkaitan langsung dengan temperatur dan pH.

#### **2.4.3.1.2. Ikatan Ion (*Ionic binding*)**

Metode imobilisasi ikatan ion berdasarkan pada pengikatan protein enzim oleh *support* yang mengandung residu pertukaran ion (*ion-exchange*). Polisakarida dan polimer sintetik mempunyai residu ion ditengah sehingga biasanya digunakan sebagai *support*. Ikatan yang terjadi dengan mudah dibentuk dengan kondisi yang lebih alami dibandingkan dengan metode ikatan kovalen. Metode ikatan ion mengakibatkan sedikit perubahan struktur dan sisi aktif enzim sehingga konversi imobilisasi enzim biasanya memiliki tingkat aktifitas yang tinggi. Gaya ikat antara protein enzim dan *support* lebih kuat dibandingkan dengan ikatan kovalen, ikatan ini dapat lepas jika substrat yang digunakan memiliki ion kuat atau variasi pH.

Perbedaan utama antara ikatan ion dan adsorpsi fisik adalah ikatan ion pada *support* lebih kuat dibandingkan dengan secara fisik walaupun hanya lebih sedikit kuat dari ikatan kovalen.

#### **2.4.3.1.3. Ikatan Kovalen (*Covalent binding*)**

Metode ikatan kovalen berdasarkan ikatan enzim dan *support* dengan ikatan kovalen. Gugus fungsional membentuk ikatan kovalen ini seperti amino, karboksil, sulfidril, hidroksil, imidazol, atau phenolik grup yang tidak esensial untuk aktifitas enzim. Untuk menjaga sisi aktif, imobilisasi dapat mengeluarkan kehadiran substrat atau inhibitor kompetitif. Kekuatan ikatan kovalen dan enzim bergantung pada ukuran dan bentuk *support*, komposisi *support*, dan kondisi selama pembentukan.

Keunggulan utama ikatan kovalen adalah imobilisasi yang sangat kuat. Tidak seperti pada metode fisik adsorpsi, ikatan kovalen antara enzim dan *support* sangat kuat dan enzim tidak lepas pada kehadiran substrat atau larutan ionik yang kuat. Hasil imobilisasi yang didapatkan sangat stabil dan tahan pada kondisi ekstrim. Berbagai *support* untuk metode ini telah dikembangkan dan metode

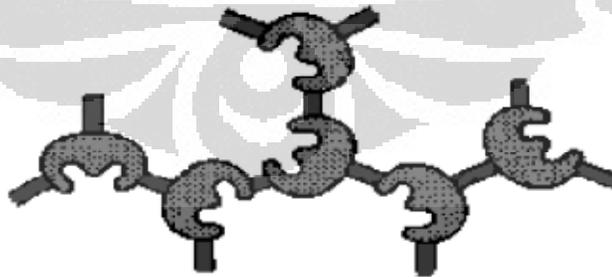
untuk mengimobilisasi telah tersedia tetapi prosedur eksperimen yang ada sangat sulit dilakukan jauh dibandingkan dengan adsorpsi fisik. Struktur 3 dimensi protein akan berubah setelah pelekatan *support* sehingga modifikasi ini sedikit mengurangi aktifitas enzim (Banu, 2001).

#### 2.4.3.2. *Cross-Linking*

Metode ini dapat didefinisikan sebagai intermolekul cross-linking enzim dalam bentuk fungsional atau multifungsional reagen dan berbasiskan pada ikatan kimia, sama seperti pada ikatan kovalen tetapi *support* padat tidak dibutuhkan. Imobilisasi terbentuk dengan formasi intermolekul *cross link* antara molekul enzim dengan dua atau multi reagen. Reagen yang paling umum digunakan adalah glutaraldehida. Reaksi *cross link* berlangsung pada kondisi keras yang mengakibatkan perubahan struktur dari sisi aktif enzim sehingga mengurangi aktifitas enzim.

Metode ini dapat diaplikasikan dengan tiga cara yaitu,

- Mencampur prepolimer dengan *photosensitif* (seperti benzoin etil eter), lelehkan, campurkan dengan larutan enzim dan berikan radiasi ultraviolet agar membentuk gel
- Bekukan larutan monomer yang mengandung enzim menjadi ukuran kecil kemudian polimerisasi dengan bantuan radiasi sinar gamma.
- Mencampurkan enzim dengan larutan buffer dari monomer acrylamida dan *crosslink* agen. Polimerisasi dimulai dengan penambahan zat kimia.



Gambar 2.6. Skema ilustrasi metode *cross-linking*(Banu, 2001)

## 2.5. Entrapment

Metode *entrapment* membentuk enzim menjadi molekul-molekul kecil gel semipermeabel gel atau memasukan enzim dalam membran semipermeabel. Metode *entrapment* berdasarkan pada penempatan enzim didalam kisi-kisi matriks polimer atau membran dengan tujuan mempertahankan protein saat terjadi penetrasi substrat. Metode ini berbeda dengan metode ikatan kovalen dan cross-link dimana enzim tidak terikat dalam matriks gel atau membran. Metode ini berlangsung pada kondisi khusus, pada reaksi polimerisasi reaksi berlangsung pada kondisi keras. Pemilihan kondisi yang sesuai untuk imobilisasi merupakan bagian paling penting.



Gambar 2.7. Skema ilustrasi metode *entrapment* (Banu, 2001)

*Entrapment* dapat dibagi menjadi dua yaitu menempatkan enzim dalam kisi-kisi dan pembentukan mikrokapsul.

- *Entrapment* dengan menempatkan kisi melibatkan ruang kosong dari polimer tidak larut. Sintesis polimer seperti poliakrilamida, polivinilalkohol, dan lainnya atau polimer alami dapat digunakan untuk imobilisasi teknik ini.
- *Entrapment* dengan mikrokapsulasi, memasukan enzim kedalam polimer semipermeabel membran. Metode ini belum banyak dikembangkan untuk teknik imobilisasi. Mikrokapsulasi membentuk sel tiruan dengan batasan membran. Molekul besar seperti enzim yang tidak dapat terdifusi melalui membran sintetik tetapi substrat dan produk dapat melalui membran tersebut. Preparasi enzim untuk mikrokapsul membutuhkan kondisi ekstrim yang terkendali dan prosedur untuk mikrokapsul pengeringan cairan (*liquid drying*), phase separasi, dan metode interfasi polimerisasi (Banu, 2001).

Keuntungan dari imobilisasi teknik tidak memerlukan interaksi kimia antara enzim dengan polimer dan denaturasi dapat terhindar. Fenomena transfer massa disekitar membran menjadi permasalahan. Transfer massa terjadi dengan terjadinya difusi yang melalui membran dimana substrat dan produk biasanya menjadi pemabatas. *Entrapment* enzim lebih baik menggunakan substrat yang berukuran kecil untuk dapat melalui membran dan mencapai sisi aktif biokatalis.

## 2.6. Support Zeolit

Zeolit menurut *J.V Smith* pada tahun 1984 adalah mineral dengan struktur kristal aluminasilikat yang berbentuk rangka (*framework*) tiga dimensi, mempunyai rongga dan saluran serta mengandung ion-ion logam seperti Na, K, Mg, Ca dan Fe serta molekul air. Pertama kali zeolit ditemukan oleh seorang ahli mineralogi asal Swedia bernama *Axel Frederick Cronstedt* pada tahun 1756. Mineral yang ditemukan akan dengan cepat melepaskan air bila dipanaskan dan seolah-olah mendidih sehingga mineral alam ini dinamakan zeolit yang dalam bahasa Yunani berarti batu didih (*zeo: boil* dan *lythe: stone*) (Togar, 2011).

Komposisi kimia dan sifat dari zeolit alam ini banyak dipengaruhi oleh kondisi hidrotermal lingkungan sekitar seperti temperatur, tekanan uap air dan komposisi air tanah di lokasi tempat pembentukan zeolit alam. Maka zeolit alam memiliki komposisi kimia yang berbeda-beda, baik karena perbedaan lokasi meskipun warna dan teksturnya sama, sehingga akan menimbulkan beragam jenis zeolit alam yang terbentuk. Tabel 2.13. menunjukkan klasifikasi mineral zeolit alam lengkap dengan rumus kimia.

Tabel 2.12. Klasifikasi mineral zeolit (Togar, 2011)

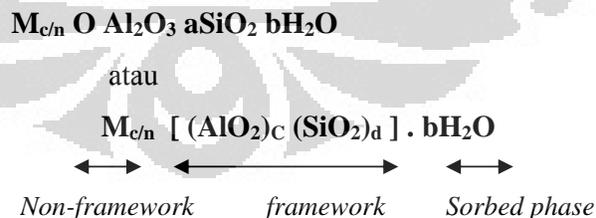
<b>Zeolit</b>	<b>Rumus Kimia</b>
<b>Gup Analsim</b> Analsim Wairakit	$\text{Na}_{16}[\text{Al}_{16}\text{Si}_{31}\text{O}_{96}] 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_8[\text{Al}_{16}\text{Si}_{31}\text{O}_{96}] 6\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Natrolit</b> Natrolit Thomsonit	$\text{Na}_{16}[\text{Al}_{16}\text{Si}_{24}\text{O}_{80}] 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_{16}\text{Ca}_8[\text{Al}_{20}\text{Si}_{20}\text{O}_{80}] 24\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Heulandit</b> Heulandit Klinoptilolit	$\text{Ca}_4[\text{Al}_8\text{Si}_{28}\text{O}_{72}] 24\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_6[\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}] 24\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Fillipsit</b> Fillipsit Zeolit Na-P-1	$\text{K}_2\text{Ca}_{1.5}[\text{Al}_6\text{Si}_{10}\text{O}_{32}] 12\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_8[\text{Al}_{31}\text{SiO}_{16}] 16\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Mordenit</b> Mordenit Ferrierit	$\text{Na}_8[\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96}] 24\text{H}_2\text{O}$ $\text{NaCa}_{0.5}\text{Mg}_2[\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}] 24\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Kabasit</b> Kabasit Zeolit L	$\text{Ca}_2[\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{24}] 13\text{H}_2\text{O}$ $\text{K}_6\text{Na}_3[\text{Al}_9\text{Si}_{27}\text{O}_{72}] 21\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Faujasit</b> Faujsit Zeolit A	$\text{Na}_{12}\text{Ca}_{12}\text{Mg}_{11}[\text{Al}_{58}\text{Si}_{134}\text{O}_{384}] 235\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_{12}[\text{Al}_{12}\text{Si}_{12}\text{O}_{48}] 27\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Laumontit</b> Laumontit	$\text{Ca}_4[\text{Al}_8\text{Si}_{16}\text{O}_{46}] 16\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Pentasil</b> ZSM-5	$\text{Na}_n[\text{Al}_n\text{Si}_{96}\text{O}_{192}] 16\text{H}_2\text{O}$
<b>Gup Zeotype</b> ALPO <sub>4-5</sub>	$[\text{Al}_{12}\text{P}_{12}\text{O}_{48}] (\text{C}_3\text{H}_7)_4 \text{NOH } q \text{H}_2\text{O}$

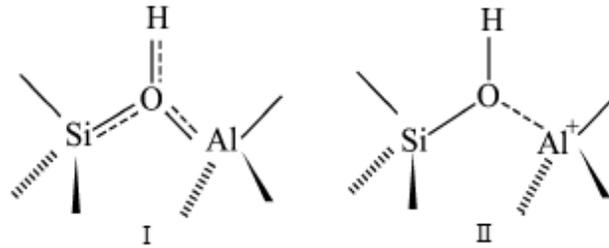
Secara umum, zeolit berfungsi sebagai katalis padatan memiliki beberapa karakterisasi, antara lain :

- Mempunyai kapasitas adsorpsi yang tinggi
- Dapat memisahkan atau mereaksikan produk dan reaktan
- Luas permukaan yang besar
- Memiliki dimensi pori molekuler
- Memiliki kemampuan modulasi sifat elektronik dengan aktif
- Adanya kemungkinan melakukan *preactivation* molekul ketika pori-pori oleh medan listrik kuat dan kekangan molekul.

### 2.6.1. Struktur Zeolit

Zeolit merupakan mineral yang terdiri dari kristal alumino-silikat yang terhidrasi dan mengandung kation alkali dan alkali tanah. Struktur kristal zeolit yang terkoordinasi Si, Al, atau P, atau sekelompok elemen seperti B, Ga, Fe, Cr, Ge, Ti, V, Mn, Co, Zn, Be, Cu, dan lain-lain, dan dapat juga disintesis, yang disebut *zeotypes*, menghasilkan  $ALPO_4$ , SAPO, MeAPO, dan *molecular sieve* MeAPSOS . Struktur kristal zeolit mempunyai diameter ruang hampa sekitar 3-30 $\text{\AA}$ . Kerangka dasar struktur zeolit adalah unit-unit tetrahedral  $AlO_4$  dan  $SiO_4$  yang saling berhubungan melalui atom oksigen dan didalam struktur tersebut ion  $Si^{4+}$  dapat digantikan oleh ion  $Al^{3+}$  (Togar, 2011). Rumus kimia zeolit sebagai berikut:





**Gambar 2.8. Struktur zeolit dan struktur zeolit Si/Al(Togar, 2011)**

Keterangan:

$M_{c/n}$  : kation bervalensi  $n$  yang dapat dipertukarkan, kationnya dapat berupa alkali atau alkali tanah.

B: menunjukkan jumlah molekul air.

$c$  dan  $d$  : menunjukkan jumlah tetrahedron alumina dan silika dalam satu unit sel, dimana  $d > c$  sehingga rasio  $d/c$  atau  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}$  dapat bervariasi dari 1 sampai 5.

[ ] : lambang struktur rangka aluminasilika

### 2.6.2. Jenis-jenis Zeolit

Menurut proses pembentukannya zeolit dapat digolongkan menjadi dua bagian yaitu zeolit alam dan zeolit sintesis.

#### a. Zeolit alam

Zeolit alam merupakan mineral yang terbentuk karena adanya proses perubahan alam (zeolitisasi). Di alam banyak dijumpai zeolit dalam lubang batuan lava dan dalam batuan sedimen terutama sedimen piroklastik berbutir halus. Jenis zeolit di alam terdiri dari hampir 50 spesies, antara lain zeolit Klinoptilolit, Analsim, Kabasit, Erionit, Faujasit, Ferrierit, dan Heulandit. Pada proses pembentukannya, mineral zeolit yang terbentuk lebih dahulu adalah Klinoptilolit dan Filipisit yang merupakan mineral penurun bagi mineral zeolit yang lain. Di Indonesia jenis zeolit yang terbesar adalah Klipnotilotit dan Modenit.

Jenis dari zeolit alam tersebut dapat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu, zeolit yang terdapat di antara celah-celah batuan atau di

antaratapisan batuan. Zeolit jenis ini terdiri dari beberapa jenis mineral zeolit bersama-sama dengan mineral lain seperti kalsit, kwarsa, renit, fluorit, mineral, dan sulfida. Zeolit yang berupa batuan, jenis zeolit yang berbentuk batuan hanya sedikit, diantaranya adalah klinoptilolit, analsim, laumontit, mordenit, filipsit, erionit, kabsit dan heulandit (Togar, 2011).

Zeolit alam banyak ditemukan di India, Siprus, Jerman dan Amerika Serikat, sedangkan daerah di Indonesia yang diperkirakan mempunyai cadangan zeolit sangat besar dan berpotensi untuk dikembangkan, yaitu Jawa Barat dan Lampung.

#### b. Zeolit Sintesis

Zeolit sintesis merupakan hasil rekayasa manusia melalui proses kimia yang dibuat secara laboratorium ataupun dalam skala industri dan memiliki sifat khusus sesuai dengan keperluannya. Sifat zeolit sangat tergantung dari jumlah komponen Al dan Si. Oleh sebab itu, zeolit sintesis dikelompokkan menjadi tiga jenis, berdasarkan perbandingan kadar komponen Al dan Si dalam zeolit, yakni (Togar, 2011):

- Zeolit Si

Zeolit ini sama sekali tidak mengandung sisi kation (Al), bersifat sangat hidropilik-hidrofobik, sehingga dapat mengeluarkan atau memisahkan suatu molekul organik dari suatu campuran air.

- Zeolit dengan kadar Si rendah

Zeolit jenis ini kaya Al, dan memiliki pori-pori, komposisi serta saluran rongga optimum, sehingga memiliki nilai ekonomi tinggi karena sangat efektif untuk proses pemisahan atau pemurnian dalam skala besar.

- Zeolit dengan kadar Si tinggi

Sifat zeolit jenis ini sangat hidropilik dan akan menyerap molekul yang tidak polar dan baik digunakan sebagai katalisator asam untuk hidrokarbon.

#### 2.6.3. Sifat Zeolit

Sifat zeolit yang terpenting adalah sebagai penyerap yang selektif, penukar ion, dan mempunyai sifat katalisis yang tinggi. Sifat-sifat serapan zeolit dipengaruhi oleh muatan-muatan kation. Kation-kation ini terkoordinasi pada

atom oksigen. Pada zeolit terhidrasi penuh, kation-kation mobil dapat diganti kation-kation lain tidak harus monovalen. Penggantian kation dengan kation lain yang berbeda ukurannya dan muatan listriknya dapat mempengaruhi ukuran pori-pori yang akhirnya mempengaruhi sifat-sifat serapannya. Perubahan sifat zeolit tergantung pada sifat-sifat dan ukuran kation, temperatur, tekanan, konsentrasi larutan, dan struktur zeolit (Togar, 2011). Kation-kation yang ada dalam zeolit mempengaruhi sifat fisiknya. Berikut adalah sifat-sifat zeolit antara lain :

a. Dehidrasi

Sifat dehidrasi zeolit akan berpengaruh terhadap sifat adsorpsinya. Zeolit dapat melepaskan molekul air dalam rongga permukaan yang menyebabkan medan listrik meluas ke dalam rongga utama dan akan efektif berinteraksi dengan molekul yang akan diadsorpsi. Jumlah molekul air sesuai dengan jumlah pori-pori atau volume ruang hampa yang akan terbentuk bila unit sel kristal zeolit tersebut diaktifkan dengan jalan pemanasan.

b. Absorpsi

Dalam keadaan normal ruang hampa kristal zeolit terisi oleh molekul air bebas yang berada di sekitar kation bila kristal zeolit dipanaskan pada suhu 300-400<sup>0</sup>C maka molekul air tersebut akan keluar sehingga zeolit dapat berfungsi sebagai penyerap gas atau cairan. Zeolit juga mampu memisahkan molekul zat berdasarkan ukuran dan kepolarannya, karena adanya pengaruh kutub antara molekul zeolit dengan zat tersebut. Molekul yang tidak jenuh atau memiliki kutub akan lebih mudah lolos daripada yang jenuh atau yang tidak ber kutub. Selektivitas adsorpsi zeolit terhadap ukuran molekul tertentu dapat disesuaikan dengan jalan: penukaran kation, dekationisasi, dealuminasi secara hidrotermal dan perubahan perbandingan kadar Si dan Al.

c. Pertukaran ion

Kemampuan zeolit sebagai penukar ion tergantung pada banyaknya kation tukar pada zeolit. Banyaknya kation tukar pada zeolit ditentukan oleh banyaknya kation Si<sup>4+</sup> yang digantikan oleh kation yang bervalensi tiga atau lima. Pada zeolit alam kation Si<sup>4+</sup> yang biasanya dapat digantikan oleh kation Al<sup>3+</sup>, sehingga kapasitas tukar kation ditentukan oleh rasio Si/Al. Kation tukar pada zeolit dapat dipertukarkan dengan kation lain dari golongan logam alkali atau alkali tanah

yang lain, karena kation tukar tidak terikat dalam rangka zeolit oleh empat atom oksigen seperti  $\text{Si}^{4+}$  dan  $\text{Al}^{3+}$ .

d. Katalis

Zeolit merupakan katalisator yang baik karena memiliki pori-pori yang besar dengan permukaan yang maksimum. Zeolit memiliki ciri paling khusus yang secara praktis akan menentukan sifat khusus di dalam mineral ini, yaitu adanya ruang kosong yang akan membentuk saluran di dalam strukturnya. Pada proses penyerapan atau katalisis, pemakaian zeolit akan mengakibatkan difusi molekul ke dalam ruang bebas atau hampa di antara kristal sehingga dimensi dan lokasi saluran sangat penting dalam proses difusi tersebut.

Sistem saluran terdiri dari 3 jenis, yaitu: satu, dua dan tiga dimensi. Pada saluran satu dimensi molekul hanya dapat bergerak ke satu arah saja. Saluran dua dimensi memberikan kemungkinan molekul berdifusi ke dua arah atau dalam satu bidang datar, sedangkan pada saluran tiga dimensi molekul yang berdifusi dapat bergerak ke semua arah atau sisi kristal. Saluran tersebut akan berulang tergantung dari sistem simetri kristal.

#### **2.6.4. Pengolahan Zeolit**

Zeolit merupakan bahan mineral yang langsung dapat dimanfaatkan, namun untuk keperluan tertentu diperlukan pengolahan secara khusus. Pengolahan zeolit dapat dilakukan melalui 3 tahap, yaitu pengecilan ukuran (*sizing*), aktivasi dan modifikasi (Togar, 2011).

a. Pengecilan ukuran (*sizing*)

Pengecilan ukuran terhadap zeolit meliputi tahap pemecahan (*crushing*) dan penggerusan (*grinding*). Proses pengecilan ukuran diperlukan untuk mendapatkan zeolit dengan ukuran tertentu. Pemecahan yang dilakukan dengan penggerusan akan menghasilkan berbagai ukuran, bahkan sampai dengan 200 mesh.

b. Aktivasi

Proses aktivasi zeolit dilakukan untuk menaikkan daya serap dan daya tukar ionnya. Aktivasi yang dikenakan pada zeolit dapat berupa aktivasi secara fisika maupun aktivasi kimiawi. Aktivasi secara fisika berupa pemanasan pada suhu 300-400°C (untuk skala laboratorium) atau

dengan pemanasan secara penghampaan selama 3 jam atau tanpa penghampaan selama 5-6 jam (skala besar). Proses pemanasan ini bertujuan untuk menguapkan air yang terperangkap dalam pori-pori kristal zeolit, sehingga luas permukaan pori-pori bertambah.

Sedangkan aktivasi secara kimia dapat dilakukan dengan cara perendaman atau pengadukan zeolit ke dalam suatu larutan asam ( $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $HCl$ ) atau dengan larutan soda kaustik ( $NaOH$ ), yang bertujuan untuk membersihkan permukaan pori, membuang senyawa pengotor dan mengatur kembali letak atom yang dapat dipertukarkan.

c. Modifikasi

Modifikasi zeolit yang telah diaktivasi perlu dilakukan untuk menaikkan daya serap zeolit, agar zeolit tidak hanya menyerap logam berat berupa kation saja tetapi dalam bentuk anion, mikroorganisme serta zat organik lain. Modifikasi zeolit dapat dilakukan dengan jalan: melapisi zeolit dengan polimer organik sintesis yaitu vinil klorida, dengan polimer organik alam yaitu kitosan, atau dengan melapisi zeolit dengan mangan.

### **2.7. Packed Bed Reactor**

Reaktor *packed bed* telah digunakan secara luas untuk enzim dan sel yang telah diimobilisasi. Pada sistem ini perlu dipertimbangkan *pressure drop* pada *packed bed* dan kolom reaktor serta efek dari dimensi kolom pada laju alir reaksi. Ada tiga kemungkinan aliran yang mungkin digunakan pada reaktor *packed bed* (Nanda, 2008), yaitu:

1. Aliran dari atas ke bawah
2. Aliran dari bawah ke atas
3. Aliran sirkulasi

Untuk aplikasi industri, aliran dari bawah ke atas secara umum digunakan daripada aliran dari atas ke bawah. Hal ini dikarenakan aliran tidak akan menekan *bed* yang ada di dalam reaktor sehingga *bed* tidak terbawa aliran. Reaktor *packed bed* mempunyai beberapa keuntungan, yaitu:

1. Mudah dalam operasi dan pengontrolan
2. Mengurangi upah pekerja

3. Kondisi operasi yang stabil
4. Mudah dalam mnegontrol produk

## 2.8. Mekanisme Michaelis-Menten

Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis penguraian, atau reaksi katalis lain yang disebut *velocity* atau disingkat V. Harga V dari suatu reaksi enzimatik pada umumnya sangat tergantung pada konsentrasi substrat. Semakin tinggi konsentrasi substrat reaksi enzim semakin cepat, sampai mencapai kecepatan yang tetap.

Substrat dipengaruhi oleh gaya (dorongan) secara fisik yang diberikan enzim. Sifat kompleks ini kemudian mengarah terhadap terjadinya perubahan kimia, menghasilkan pembentukan produk dan pelepasan produk oleh enzim, dengan orde pertamanya tergantung terhadap konsentrasi enzim-substrat yang kompleks. Secara sistematisnya reaksinya dituliskan sebagai berikut:



Notasi E dan S adalah enzim dan substrat, P merupakan produk, dan notasi ES merupakan enzim-substrat kompleks. Pembentukan senyawa kompleks ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan  $k_1$ . Kompleks ES kemudian mengalami 2 kemungkinan penguraian yaitu pertama kembali terurai menjadi E dan S dengan konstanta kecepatan  $k_2$  atau melanjutkan reaksi dengan menghasilkan produk P dan E dengan konstanta kecepatan  $k_3$ , dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S.

Kemudian dijabarkan hubungan antara kecepatan penguraian, baik dengan konsentrasi substrat maupun konsentrasi enzim. Kecepatan reaksi sangat tergantung pada konsentrasi ES dan konstanta laju reaksi  $k_3$  yang dapat dijelaskan dalam rumus ini adalah sebagai berikut :

$$v = k_3[ES] \quad (2.2)$$

Dimana laju penguraian kompleks [ES] :

$$\text{Penguraian } [ES] = k_2[ES] \quad (2.3)$$

$$\text{Penguraian } [ES] = k_3[ES] \quad (2.4)$$

$$\text{Total penguraian } [ES] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.5)$$

Sedangkan laju pembentukan kompleks [ES] :

$$\text{Pembentukan } [ES] = k_1[E][S] \quad (2.6)$$

Dalam keadaan kesetimbangan jumlah [ES] tetap, yang berarti baik ES yang terbentuk maupun yang terurai sama banyaknya, meskipun bahan awal dan produk jumlahnya dapat saja berubah-ubah. Hal ini hanya mungkin terjadi bila laju pembentukan = laju penguraian.

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.7)$$

Dengan mengarahkan persamaan kedalam bentuk kompleks [ES] maka persamaan menjadi :

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{(k_2 + k_3)} \quad (2.8)$$

Persamaan disusun untuk membentuk ketetapan Michaelis Menten ( $K_m$ ) dimana,

$$K_m = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} \quad (2.9)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (2.10)$$

Bila konsentrasi substrat awal sangat tinggi atau berlebihan, konsentrasi substrat yang belum terikat dapat dianggap sama dengan konsentrasi substrat awal.

[E] = konsentrasi enzim yang tidak terikat. Jadi berarti sama dengan konsentrasi E mula-mula atau total [ET] dikurangi konsentrasi E dari ES. Oleh karena itu persamaan untuk [ES] menjadi :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[ET - ES][S] \quad (2.11)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.12)$$

Dengan menyamakan kedua persamaan untuk [ES] maka,

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.13)$$

Menggabungkan semua konstanta untuk  $k_1$ ,  $k_2$ , dan  $k_3$  membentuk  $K_m$  maka persamaan disusun menjadi :

$$[ES] \frac{(k_2+k_3)}{k_1} = [ET][S] - [ES][S] \quad (2.14)$$

Persamaan diarahkan dalam bentuk [ES] maka, penyusunan kembali persamaan menjadi :

$$[ES] \left( \frac{(k_2+k_3)}{k_1} + [S] \right) = [ET][S] \quad (2.15)$$

Maka akan didapatkan [ES],

$$[ES] = \frac{[ET][S]}{K_m + [S]} \quad (2.16)$$

Untuk mendapatkan persamaan kecepatan ( $v$ ) maka substitusi persamaan 2.2 ke dalam persamaan 2.16 didapatkan :

$$v = \frac{k_3 [ET][S]}{K_m + [S]} \quad (2.17)$$

Untuk kecepatan maksimum dimana semua enzim bereaksi dengan substrat,

$$v \text{ max} = k_3 [ET] \quad (2.18)$$

Sehingga persamaan laju reaksi menjadi :

$$v = \frac{v \text{ max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.19)$$

## 2.9. Pemetaan Penelitian

Studi mengenai penggunaan imobilisasi lipase *entrapment* untuk sintesis biodiesel belum dilakukan sampai saat ini hanya sebatas pada sintesis biodiesel dengan rute alkohol sehingga potensi pengembangan dan publikasi masih sangat

terbuka dimana mereka yang melakukan publikasi rute alkohol dipaparkan pada Tabel 2.14.

Sintesis biodiesel rute non alkohol belum menjadi perhatian bagi peneliti sintesis biodiesel dimana masih terus melakukan riset pada rute alkohol dengan jurnal terbaru yang dikeluarkan oleh J.C. Moreno dan Ko Woon Lee pada tahun 2010 sedangkan pengkajian biodiesel rute non alkohol telah dilakukan mahasiswa S1 untuk skripsi oleh Ahmad Wafa dan Ayu Diah pada 2008 di Teknik Kimia Universitas Indonesia. Penelitian ini merupakan studi lanjut sebagai pembanding hasil riset Ahmad Wafa dan Ayu Diah sesuai yang tergambar pada tabel 2.15.

**Tabel 2.14. Studi literatur mengenai metode imobilisasi lipase *entrapment***

No.	Author	Tahun	Klasifikasi enzim	Metode Imobilisasi	Material Support	Reaksi
1	J.C. Moreno-Pirajan	2010	<i>Hydrolases</i>	Physical <i>Entrapment</i>	<i>Activated carbon</i>	Transesterifikasi
2.	Sulaiman Al-Zuhair	2008	<i>Triacylglycerol lipase</i>	Sol-gel <i>Entrapment</i>	<i>ceramic beads</i>	Transesterifikasi
3.	Hossein Nouredini	2004	(52.9%) <i>Hydrolases</i> dan (47.1%) <i>Lyases</i>	Sol-gel <i>Entrapment</i>	<i>hydrophobic sol-gel</i>	Transesterifikasi
4.	Ko Woon Lee	2010	<i>Triacylglycerol lipase</i>	Sol-gel <i>entrapment</i>	<i>Amphiphilic Matrix</i>	Transesterifikasi

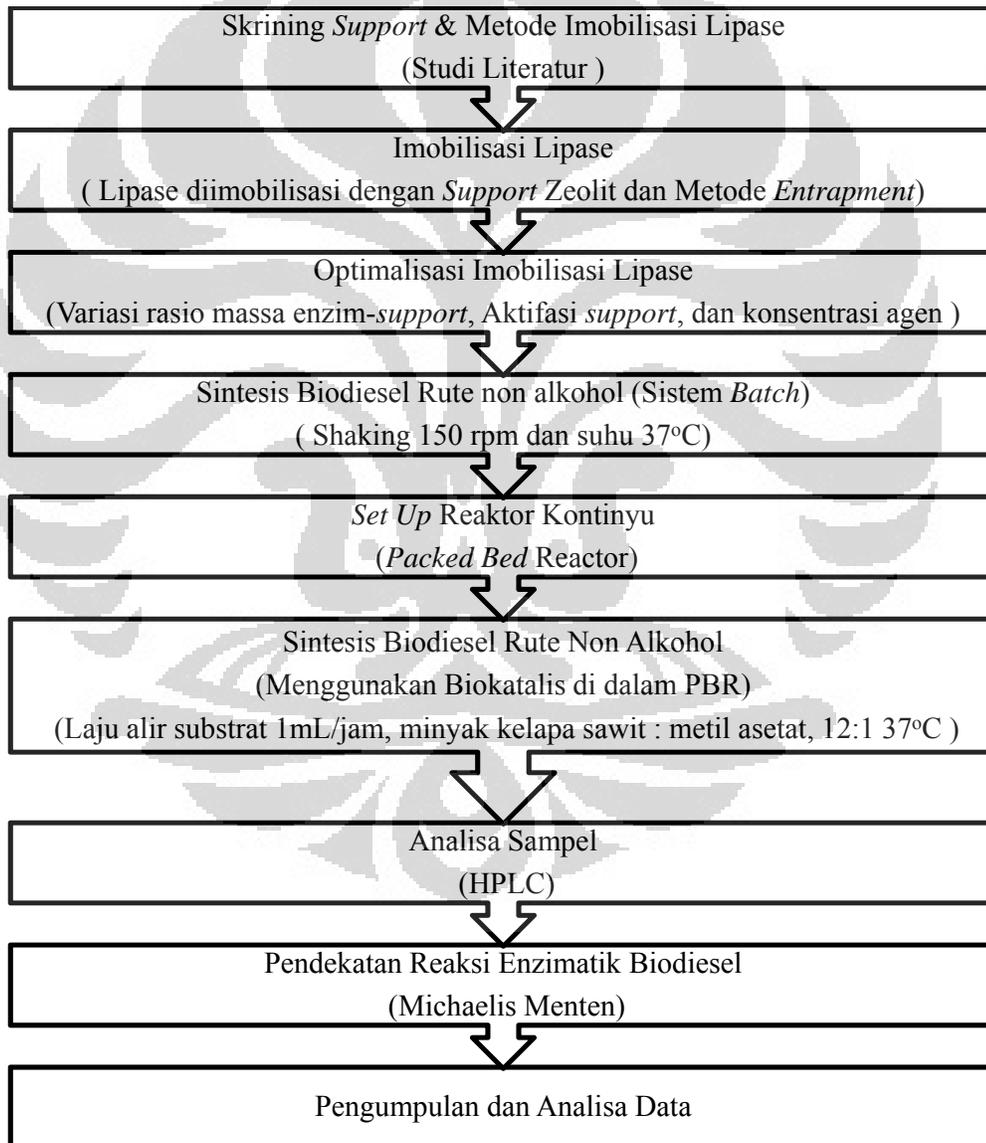
Tabel 2.15. State of the art sintesis biodiesel

	Imobilisasi Entrapment	Penelitian yang dilakukan	
	<b>Rute Non Alkohol (Interesterifikasi)</b>	Imobilisasi Adsorpsi	
<i>Free Lipase</i>		Heri H. (2008)	
		Mukesh (2007)	
		Kim (2007)	
		Du (2004)	
		Xu (2004)	
<b>Rute Alkohol (Transesterifikasi)</b>	Senyawa Alkohol	J.C. Moreno (2010)	Moreno (2010)
		Ko Woon Lee (2010)	Fatimah (2008)
		Al-Zuhair (2008)	
		Noreddini (2004)	
		Watanabe (2002)	
		Shimada (2002)	
		Iso (2001)	
		Kaieda (2001)	
<b>Jenis Katalis</b>	<b>Reaktor <i>Batch</i></b>	<b>Reaktor Kontinyu</b>	

### BAB 3 METODE PENELITIAN

#### 3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Untuk melakukan analisis sampel dengan menggunakan HPLC dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian dan Teknologi (Puspitek) di Serpong. Penelitian dilaksanakan dengan beberapa tahapan, berikut diagram alir dari penelitian yang telah dilakukan:



**Gambar 3.1. Diagram Alir Prosedur Penelitian**

### 3.2. Persiapan Alat Dan Bahan

#### 3.2.1. Persiapan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

- 1) Metilasetat dari Merck.
- 2) Minyak sayur kelapa sawit dari Kunci Mas.
- 3) Lipase *Candida Rugosa* dari Sigma.
- 4) Air Distilasi Laboratorium Dasar Kimia.
- 5) NaF dari Merck
- 6) Bahan-bahan uji lainnya seperti  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH, NaK Tartrate,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dan Follin Ciocalteu dari Merck yang diambil dari Laboratorium Rekayasa Bioproses.

#### 3.2.2. Persiapan Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 3.1.

**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"> <li>• Tempat untuk mengimobilisasi lipase</li> </ul>
2.	<i>Hot plate stirrer dan stirrer bar (magnetic stirrer)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk menghomogenkan campuran lipase dan air</li> <li>• Tempat mencampurkan minyak kelapa sawit dan metilasetat</li> </ul>
3.	Kaca arloji	Sebagai wadah saat menimbang
4.	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan percobaan
5.	Tabung reaksi	Untuk membuat larutan
6.	Spatula kaca	Sebagai alat untuk mengaduk saat pembuatan larutan

Tabel 3.1. Alat yang digunakan dalam penelitian (lanjutan)

No.	Alat	Fungsi
7.	Spatula <i>stainless steel</i>	Untuk membantu memindahkan padatan
8.	Pipet tetes	Untuk memindahkan larutan dari tabung reaksi ke masing-masing labu Erlenmeyer
9.	<i>Water bath</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengeringkan lipase terimobilisasi di dalam <i>zeolit</i></li> <li>• Untuk memanaskan campuran minyak kelapa sawit dan metil asetat sebelum masuk ke dalam PBR</li> </ul>
10.	Kertas filter	Untuk memisahkan retentat (lipase terimobilisasi) dari permeat (larutan yang digunakan selama imobilisasi)
11.	Pompa vakum	Untuk membantu filtrasi
12.	<i>Stop Watch</i>	Untuk mengukur waktu pengambilan sampel
13.	Termometer	Untuk mengukur temperature
14.	<i>Syringe Pump</i>	Untuk mengairkan substrat ke dalam reaktor hingga produk terbentuk
15.	Plastik <i>Syringe</i>	Untuk tempat substrat yang akan dialirkan menggunakan <i>syringe pump</i>
16.	Reaktor <i>Packed Bed</i> (PBR)	Untuk tempat berlangsungnya reaksi sintesis biodiesel

Tabel 3.1. Alat yang digunakan dalam penelitian (lanjutan)

No.	Alat	Fungsi
17	<i>Syringe auto transfepette</i>	Untuk mengambil sampel ukuran mikro
18	Botol Plastik	Untuk tempat sampel
19	<i>Beaker glass</i>	Untuk tempat bahan penelitian
20	Gelas Ukur dan pipet volumetrik	Untuk mengukur volume bahan yang digunakan
21	Pompa air dan selang	Untuk memompa air yang akan dialirkan ke dalam jaket PBR
22	Spektrofotometer UV-Vis	Untuk mengukur konsentrasi enzim
23	HPLC	Untuk menganalisa sampel hasil sintesis biodiesel

### 3.3. Persiapan Percobaan

Persiapan percobaan dimulai dengan mengukur kecilan zeolit, mengaktifasi zeolit, membuat phosphat buffer, dan kurva standar Lowry

#### 3.3.1. Pembuatan zeolit Dalam Bentuk Bubuk (*powder*)

- 1) Menghancurkan padatan zeolit menjadi serbuk dengan mortar dan alu.
- 2) Zeolit yang telah menjadi serbuk disaring dengan saringan berukuran 0,8 dan 0,6 mm
- 3) Keluaran akhir dari zeolit merupakan serbuk zeolit yang digunakan sebagai *supportmetode imobilisasi entrapment*.

#### 3.3.2. Pembuatan Zeolit Teraktifasi Dalam Bentuk Bubuk (Wafa, 2009)

- 1) Zeolit dalam bentuk serbuk yang telah disiapkan dipisahkan sebagian untuk diaktifasi.
- 2) Zeolit yang akan diaktifasi dicuci dengan air maka akan terbentuk lumpur zeolit.
- 3) Lumpur zeolit direndam dalam larutan NaCl 1M selama 24 jam dengan dua kali perendaman.

- 4) Lumpur zeolit dikeringkan dengan menggunakan *oven* pada suhu 190°C selama 1-3 jam sehingga membentuk padatan zeolit.
- 5) Padatan zeolit ditumbuk dengan mortar dan alu sampai menjadi serbuk berupa zeolit teraktifasi.

### 3.3.3. Pembuatan *Phosphatebuffer buffer* (Wafa, 2009)

*Phosphatebuffer* dalam percobaan ini digunakan untuk melarutkan enzim atau protein dan untuk menjaga pH reaksi. Berikut adalah cara pembuatan *phosphate buffer*:

Larutan A : 0.2 M larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  27.8 g dalam 1000 mL

Larutan B : 0.2 M larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  35.6 g dalam 1000 mL

Komposisi larutan: X mL larutan A + Y mL larutan B → larutan sampai 200 mL

**Tabel 3.2. Perbandingan volum untuk larutan buffer**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (mL)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mL)	pH
87.7	12.3	6
39	61	7
16	84	7.5
5.3	94.7	8

### 3.3.4. Pembuatan Bahan 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:
  - a. Larutan A : 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam 100 mL 0,1 N NaOH (0,4 g NaOH dalam 100 mL aquadest)
  - b. Larutan B : 0,1 g NaK Tartrate dalam 10 mL aquadest

- c. Larutan C : 0,1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 20 mL aquadest
- 2) Phenol reagent (5 mL Follin Ciocalteu phenol reagent + 5 mL aquadest)

### 3.4. Pembuatan Kurva Standar Enzim

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

- 1) Larutan Lipase *Candida rugosa* dengan konsentrasi 0,01 g/mL (1 glipase *Candida rugosa* dalam 100 mL larutan *phosphate buffer*).
- 2) Memvariasikan konsentrasi lipase *Candida rugosa* menjadi beberapa konsentrasi dengan cara mengencerkan 0,01 g/mL larutan lipase yang telah dibuat pada tahap 1. Kemudian menyiapkan tiap-tiap larutan pada tabung reaksi.

Tabel 3.3. Variasi konsentrasi enzim

Konsentrasi Awal (g/mL)	Konsentrasi Akhir (g/mL)	Volume Akhir (mL)	Volume Awal (mL)	<i>Phosphate Buffer</i> yang ditambahkan (mL)
0,01	0,0002	5	0,1	4,9
0,01	0,0005	5	0,25	4,75
0,01	0,001	5	0,50	4,5
0,01	0,005	5	2,5	2,5

- 3) Menambahkan 2 mL Lowry Reagent ke setiap sampel konsentrasi lipase.
- 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 *phosphate buffer*)
- 10) Memplot absorbansi vs g/mL lipase *Candida rugosa* untuk memperoleh kurva kalibrasi standar.

### 3.5. Pengukuran Enzim Loading

Pengukuran enzim *loading* merupakan pengukuran persentase konsentrasi lipase yang berhasil terimobilisasi dengan metode *entrapment* menggunakan *support* zeolit. Konsentrasi lipase *Candida rugosa* yang digunakan untuk diimobilisasi sebesar 0,01 g/mL diukur kembali nilai absorbansinya untuk memastikan konsentrasi enzim awal dengan menggunakan kurva kalibrasi standar. Larutan sisa hasil imobilisasi diukur nilai absorbansi untuk menghitung konsentrasi akhir setelah imobilisasi. Dari konsentrasi awal dan akhir maka enzim loading dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$X_L = \frac{C_E}{C_0} \times 100\% \quad (3.1)$$

Dengan

$$C_E = C_0 - C_t \quad (3.2)$$

Dimana :

$C_E$	= konsentrasi enzim ter-immobilisasi	(g/mL)
$C_0$	= konsentrasi enzim sebelum immobilisasi, $t = 0$	(g/mL)
$C_t$	= konsentrasi enzim pada waktu $t$	(g/mL)
$X_L$	= Enzim loading	(%)

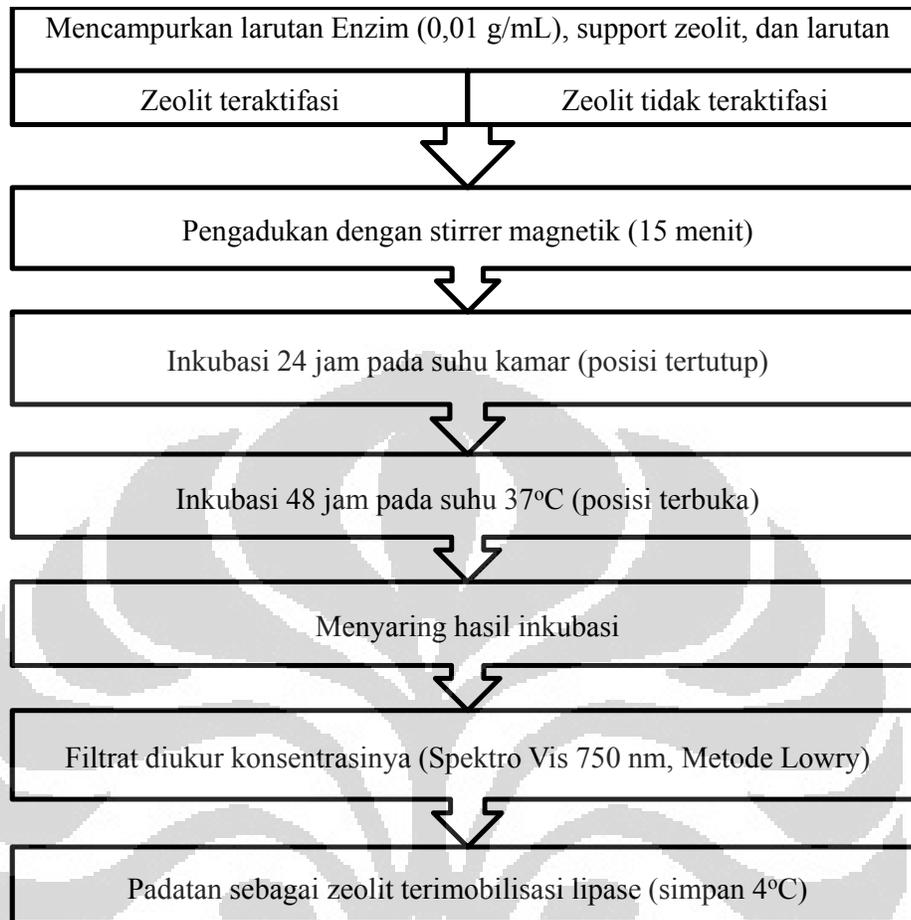
### 3.6. Optimalisasi Imobilisasi Lipase Metode *Entrapment*

#### 3.6.1. Perbandingan *support* zeolit dan zeolit teraktifasi

Zeolit sebagai *support* merupakan mineral kristal yang memiliki pori-pori. Zeolit biasanya didapatkan berupa batuan keras yang mengandung pengotor sehingga biasanya zeolit akan dibersihkan sebelum digunakan disebut aktivasi zeolit. Pada percobaan ini zeolit yang digunakan dalam bentuk serbuk dan kualitas dari zeolit tidak diketahui terutama mengenai pori-pori yang tersedia di dalam

zeolit dan jumlah pengotor yang terdapat dalam zeolit. Percobaan ini mencoba menggunakan zeolit dalam bentuk serbuk yang telah diaktifasi dan zeolit yang tidak diaktifasi untuk melihat pengaruh aktifasi zeolit terhadap hasil imobilisasi enzim dengan metode *entrapment*. Berikut langkah-langkah percobaan dan bagan alir percobaan pada Gambar 3.2.

- 1) Membuat larutan NaF 0,5 M dengan melarutkan 0,21 g NaF dalam 10mL air.
- 2) Membuat larutan enzim lipase *Candida rugosa* 0,01 g/mL dengan melarutkan 1 g lipase kedalam 100 mL buffer fosfat pH 7.
- 3) Membuat variasi imobilisasi dengan perbedaan *support* zeolit.
  - 15 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 4,85 g serbuk zeolit perbandingan 3% sebanyak tiga sampel.
  - 15 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 4,85 g serbuk zeolit teraktifasi perbandingan 3% sebanyak tiga sampel.
- 4) Menambahkan 0,5 mL larutan NaF 0,5M untuk setiap 10 mL larutan atau 1,5 mL larutan NaF.
- 5) Campuran di-*stirrer* pada dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit
- 6) Menghentikan *stirring* dan menyegel labu Erlenmeyer pada temperatur ruang selama 24 jam.
- 7) Membuka segel labu Erlenmeyer.
- 8) Menginkubasi campuran pada labu Erlenmeyer dalam *water bath* pada 37<sup>0</sup>C selama 48 jam.
- 9) Memfiltrasi lipase terimobilisasi dari larutan menggunakan kertas filter dan corong.
- 10) Filtrat diambil untuk diukur konsentrasi enzim *loading*. Konsentrasi enzim diukur dengan metode lowry dan enzim *loading* ditentukan berdasarkan kurva standar.
- 11) Endapan dikeringkan sebagai lipase terimobilisasi pada temperature 37<sup>0</sup>C selama 48 jam didalam *shaker water bath*.
- 12) Menyimpan lipase terimobilisasi di dalam *refrigerator* pada temperature 4<sup>0</sup>C hingga digunakan.



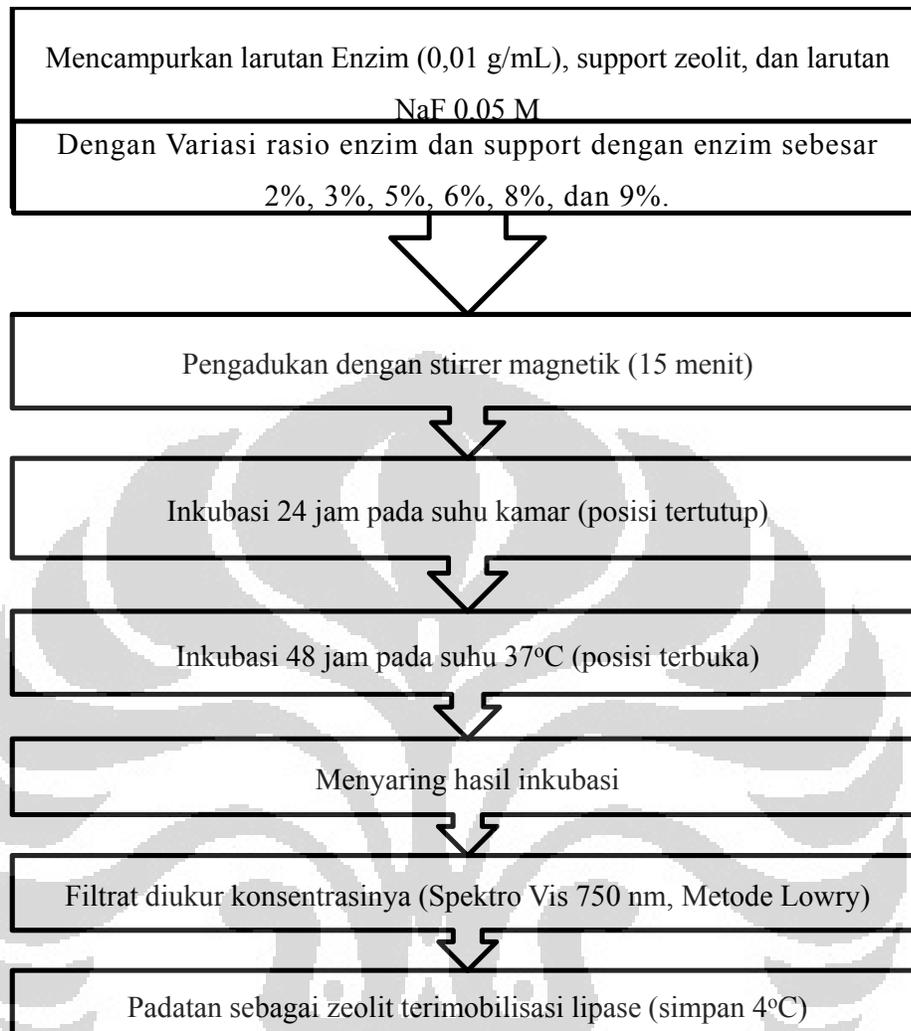
**Gambar 3.2. Diagram imobilisasi variasi zeolit**

### 3.6.2. Imobilisasi Lipase Dengan Variasi Perbandingan Enzim dan Zeolit

Imobilisasi enzim dalam *support* merupakan metode untuk memaksimalkan penggunaan enzim. Enzim diharapkan dapat digunakan secara efektif. Pada percobaan ini variasi dilakukan dengan variasi persen rasio jumlah massa enzim dan massa *support* zeolit untuk imobilisasi. Studi yang didapatkan bahwa rasio enzim dalam *support* yang optimal tidak melebihi 10 % dari *support* yang digunakan oleh karena variasi rasio dilakukan dari 2-9 % massa enzim dengan *support* zeolit yang tidak diaktifasi (Moreno-Piraja & Giraldo, 2011). Berikut ini tahap percobaan yang dilakukan dan bagan terdapat pada Gambar 3.3.

- 1) Membuat variasi imobilisasi dengan perbandingan enzim sebesar 2%, 3%, 5%, 6%, 8%, dan 9% terhadap *support* zeolit.

- 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 15 g serbuk zeolit perbandingan 2%.
  - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 10 g serbuk zeolit perbandingan 3%
  - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 6 g serbuk zeolit perbandingan 5%.
  - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 5 g serbuk zeolit perbandingan 6%.
  - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 3,75 g serbuk zeolit perbandingan 8%.
  - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 3,3 g serbuk zeolit perbandingan 9%.
- 2) Menambahkan 0,5 mL larutan NaF 0,5M untuk setiap 10 mL larutan atau 3 mL larutan NaF.
  - 3) Campuran di-*stirrer* pada dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit
  - 4) Menghentikan *stirring* dan menyegel labu Erlenmeyer pada temperatur ruang selama 24 jam.
  - 5) Membuka segel labu Erlenmeyer.
  - 6) Menginkubasi campuran pada labu Erlenmeyer dalam *water bath* pada 37<sup>0</sup>C selama 48 jam.
  - 7) Memfiltrasi lipase terimobilisasi dari larutan menggunakan kertas filter dan corong.
  - 8) Filtrat diambil untuk diukur konsentrasi enzim *loading*. Konsentrasi enzim diukur dengan metode lowry dan enzim *loading* ditentukan berdasarkan kurva standar.
  - 9) Mengeringkan lipase terimobilisasi pada temperature 37<sup>0</sup>C selama 48 jam didalam *shaker water bath*.
  - 10) Menyimpan lipase terimobilisasi di dalam *refrigerator* pada temperature 4<sup>0</sup>C hingga digunakan.



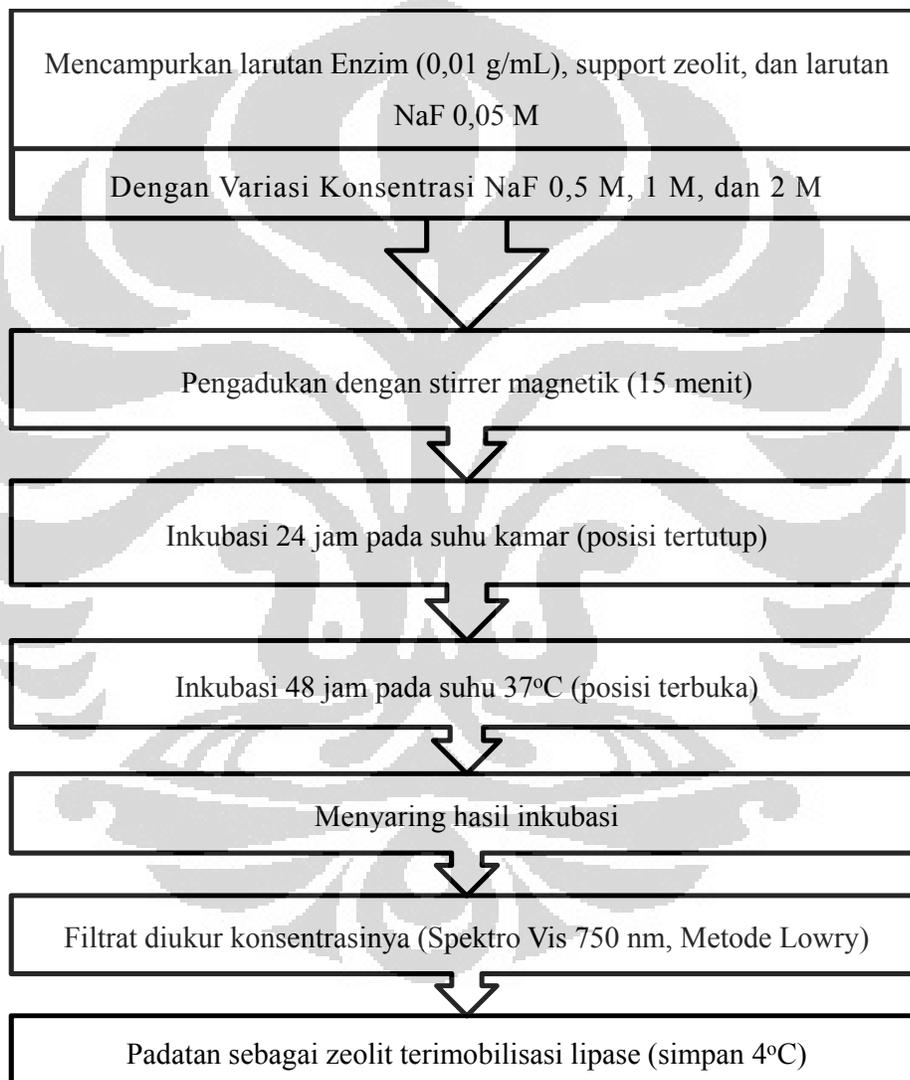
**Gambar 3.3. Diagram imobilisasi variasi rasio enzim dan support**

### 3.6.3. Imobilisasi Lipase Dengan Variasi NaF

Keberhasilan imobilisasi enzim dengan metode *entrapment* bergantung pada agen pengemulsi yang menahan dan mengunci enzim dalam sistem gel. Pada percobaan ini agen pengemulsi gel yang digunakan adalah NaF berdasarkan tingkat kemudahan percobaan dan perlakuan. Berdasarkan studi literatur bahwa agen pengemulsi yang baik akan menentukan kestabilan hasil imobilisasi, oleh karena itu variasi banyaknya agen pengemulsi NaF yang digunakan dilakukan dalam percobaan ini. Konsentrasi yang digunakan dimulai dari 0,5 M sampai 2 M untuk menguji kebutuhan NaF yang optimal dimana umumnya penggunaan NaF pada *support* lainnya seperti karbon aktif menggunakan 0,5 M (Moreno-Piraja & Giraldo, 2011; Nouredini, Wagner, & Gutsman, 2002). Berikut ini langkah percobaan dan bagan terdapat pada Gambar 3.4.

- 1) Membuat variasi imobilisasi dengan perbandingan enzim sebesar 2% terhadap *support* zeolit sebanyak 3 larutan.
  - a. 10 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 5 g serbuk zeolit perbandingan 2%.
- 2) Menambahkan 0,5 mL larutan untuk setiap 10 mL larutan dengan konsentrasi
  - a. 0,5 M NaF (0,21 g NaF dalam 10 mL air) sebanyak 0,5 mL
  - b. 1 M NaF ( 0,42 g NaF dalam 10 mL air) sebanyak 0,5 mL
  - c. 2 M NaF (0,84 g NaF dalm 10 air) sebanyak 0,5 mL
- 3) Campuran di-*stirrer* pada dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit
- 4) Menghentikan *stirring* dan menyegel labu Erlenmeyer pada temperatur ruang selama 24 jam.
- 5) Membuka segel labu Erlenmeyer.
- 6) Menginkubasi campuran pada labu Erlenmeyer dalam *water bath* pada 37<sup>0</sup>C selama 48 jam.
- 7) Memfiltrasi lipase terimobilisasi dari larutan menggunakan kertas filter dan corong.

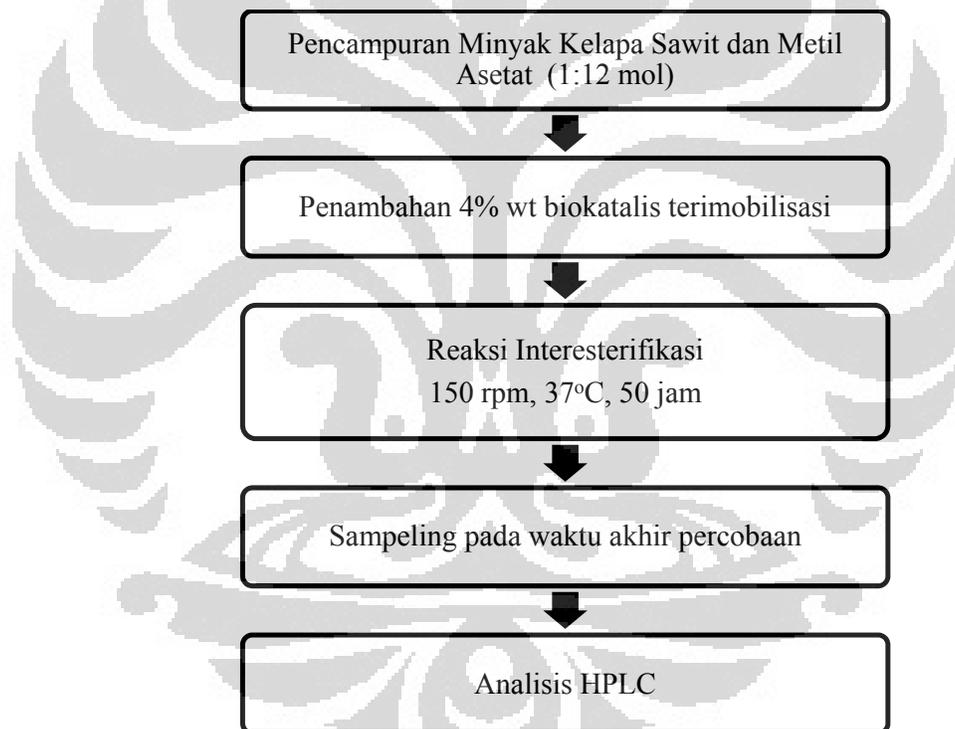
- 8) Filtrat diambil untuk diukur konsentrasi enzim *loading*. Konsentrasi enzim diukur dengan metode lowry dan enzim *loading* ditentukan berdasarkan kurva standar.
- 9) Mengeringkan lipase terimobilisasi pada temperature 37°C selama 48 jam didalam *shaker water bath*.
- 10) Menyimpan lipase terimobilisasi di dalam *refrigerator* pada temperature 4°C hingga digunakan.



**Gambar 3.4. Diagram Imobilisasi variasi konsentrasi NaF**

### 3.7. Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol Pada Reaktor *Batch*

Reaksi akan dilangsungkan dalam reaktor *batch* merupakan lanjutan peneliti sebelumnya dimana labu erlenmeyer 250 mL yang berisi campuran minyak kelapa sawit dan metil asetat dengan perbandingan mol 1:12 dimana perbandingan konversi maksimal yang dapat dicapai hasil dari penelitian sebelumnya oleh Septhian Marno. Percobaan uji aktivitas direaksikan pada suhu 37°C dengan berat biokatalis sebesar 4% wt dari substrat campuran minyak sawit dan metil asetat (Marno, 2008). Reaksi dilakukan di atas *shaker water bath* dengan pegadukan 150 rpm dan waktu reaksi selama 50 jam (Rizkiyadi, 2008). Prosedur pembuatannya pada Gambar 3.5 dan sketsa peralatannya pada lampiran G.



Gambar 3.5. Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem *batch*

### 3.8. Set Up Reaktor Kontinyu

Pada reaksi kontinyu, sistem reaktor *packed bed* yang digunakan diadopsi dari pembuatan sistem reaktor oleh penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ahmmad Wafa dan Ayu Diah (Ayu, 2009; Wafa, 2009) dimana reaktor *packed bed* yang memiliki ketinggian 15 cm dan diameter 1,1 cm sebagai reaktor *packed bed* skala lab. Reaktor dibuat jaket dengan aliran air sebesar 37°C berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Risan (Surendro, 2008).

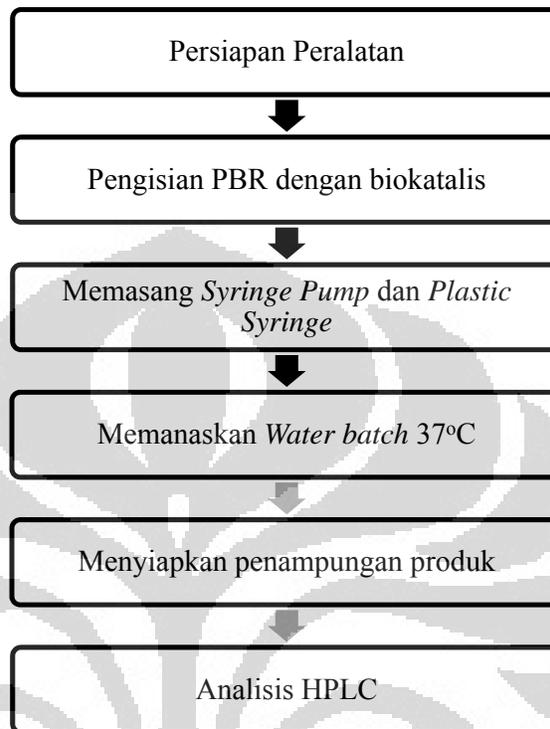
- 1) Menyiapkan peralatan dan bahan yang dibutuhkan, yaitu

Alat :

- *Packed Bed Reactor* (PBR)
- *Water bath*
- Termometer
- Pompa air dan Selang
- *Syringe Pump*
- *Beaker glass*
- *Plastic Syringe*

Bahan :

- Lipase Terimobilisasi
- 2) Mengisi *Packed Bed Reactor* (PBR) dengan enzim lipase terimobilisasi pada karbon aktif
  - 3) Memanaskan air pada *water bath* sampai suhu mencapai 37°C
  - 4) Memompakan air yang telah mencapai 37°C dari *water bath* untuk melalui jaket PBR.
  - 5) Menyiapkan *Syringe Pump* dan *Plastic Syringe* sebagai tempat substrat
  - 6) Menyiapkan air bersuhu mencapai 37°C *water bath* untuk memanaskan substrat sebelum dialirkan ke PBR.
  - 7) Menyiapkan *beaker glass* sebagai tempat produk.



Gambar 3.6. *Set up* reaktor kontinyu

### 3.9. Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol Pada Reaktor *Packed Bed*

Sintesis biodiesel reaksi kontinyu dilakukan pada reaktor *packed bed* dimana kondisi yang reaksi dilakukan sesuai penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ayu dan Wafa (Ayu, 2009; Wafa, 2009) dimana kondisi optimal kembali digunakan untuk mensintesis biodiesel rute non alkohol. Kondisi utama adalah laju alir umpan 1 mL/jam untuk 50 jam reaksi dengan jacket 37°C. Berikut ini langkah-langkah percobaan. Bagan alir percobaan pada Gambar 3.7 dan sistem peralatan terdapat pada lampiran H.

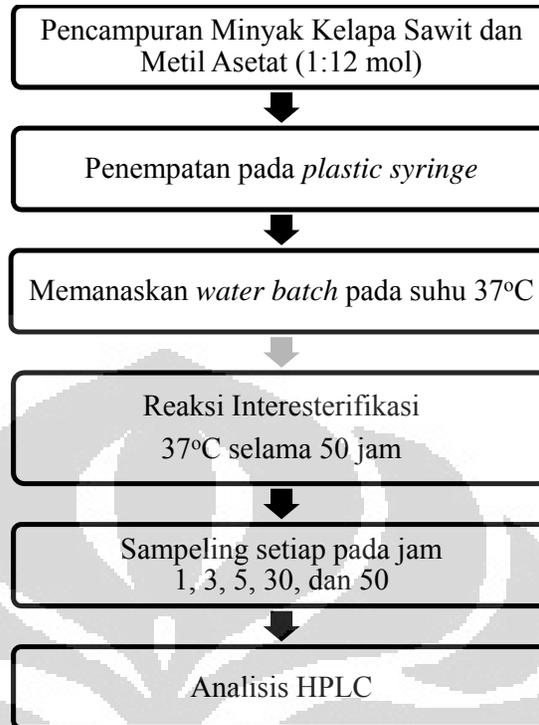
1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan, yaitu

Alat :

- Sistem *Packed Bed Reactor*
- Termometer
- *Syringe Pump*
- Botol Plastik
- *Beaker glass*
- Gelas Ukur dan pipet volumetrik
- Timbangan digital
- *Plastic Syringe*

Bahan :

- Minyak Kelapa Sawit
  - Metilasetat
  - Lipase terimobilisasi
- 2) Menyiapkan campuran substrat minyak kelapa sawit dan metil asetat dengan perbandingan mol 1:12.
  - 3) Mencampurkan minyak kelapa sawit dan metilasetat kemudian dimasukkan kedalam *plastic syringe*.
  - 4) Memanaskan larutan yang terbentuk dalam *water bath* yang suhunya 37°C
  - 5) Menguji Stabilitas biokatalis dengan menggunakan biokatalis dalam waktu 50 jam dengan aliran konstan 1 mL/jam. Sampel diambil pada waktu (jam) : 1, 3, 5, 30, dan 50
  - 6) Setelah selesai, sampel dianalisis dengan HPLC untuk mengetahui konsentrasi dari biodiesel.



**Gambar 3.7.** Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada PBR

### 3.10. Tahap Analisis biodiesel

Biodieselyang dihasilkan dari reaksi interesterifikasi antara minyak kelapa sawit dan metil ester dengan biokatalis terimobilisasi lipase akan dianalisis dengan menggunakan HPLC ( *High performance Liquid Chromatogaph*) untuk mengetahui besarnya *yield* biodiesel yang dihasilkan dari reaksi interesterifikasi. Penggunaan HPLC didasari oleh sifat sampel yang berupa liquid. Banyaknya *yield* yang dihasilkan dihitung berdasarkan kandungan metil oleat dan metil palmitat yang merupakan komponen terbesar trigliserida didalam minyak kelapa sawit. Analisa sample dengan menggunakan HPLC dilakukan di PUSPITEK (Pusat Peneliihan dan Teknologi), Serpong-Tangerang. Spesfikasi HPLC yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

**Tabel 3.4. Spesifikasi HPLC(Ayu, 2009)**

Merek	Hitachi
Detektor	L-4000 UV Detektor dengan panjang gelombang 205 nm
Kolom	C - 18 <i>Reverse Fase</i>
Merek Kolom	Wakopak
Jenis Kolom	Wakosil -GP-N6
Diameter kolom	4.6 mm
Panjang kolom	150 mm
Pompa	L-6200A
<i>Differential Refractor</i>	RI-71
<i>Coloumn Thermostat</i>	L-5025
<i>Eluen</i>	a. Metanol b. Isopropanol dan Hexane
<i>Flow</i>	0.8 mL/menit

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil Imobilisasi Lipase Berdasarkan Enzim *Loading*

Pada percobaan ini, enzim loading digunakan untuk menentukan perbandingan enzim lipase *candida rugosa* dan *support* zeolit yang digunakan untuk reaksi interesterifikasi sintesis biodiesel pada reaktor *batch* dan kontinyu.

#### 4.1.1. Perbandingan *Support* Zeolit dan Zeolit teraktifasi

Keberhasilan imobilisasi ditentukan dengan besarnya enzim *loading* yang terukur. Perbandingan penggunaan *support* zeolit didasarkan pada sifat *support* zeolit yang umumnya perlu diberi perlakuan khusus sebelum digunakan sebagai *support* dalam katalis.

Perlakuan disamakan dalam perbandingan rasio massa enzim dan massa zeolit yang digunakan dalam imobilisasi adalah sama. Perbandingan rasio yang dipilih adalah 3% massa enzim dengan zeolit 97%. Perlakuan yang berbeda adalah sebanyak 3 sampel menggunakan zeolit yang telah diaktifasi dengan NaCl sedangkan 3 sampel selanjutnya menggunakan zeolit tanpa diaktifasi.

Hasil yang didapatkan dalam percobaan ini terdapat dalam Tabel 4.2 dimana konsentrasi larutan yang digunakan adalah sebesar 0,01 gr/mL yang dibuat dengan melarutkan tepat 0,5 g enzim lipase kedalam 50 mL buffer fosphat. Larutan enzim digunakan untuk setiap sampel dengan 15 mL larutan enzim atau 0,15 g enzim lipase ditambahkan 4,85 g zeolit.

Tabel 4.2. Enzim *loading* hasil imobilisasi

Enzim Lipase (3%)	Konsentrasi sebelum imobilisasi (g/mL)	Konsentrasi setelah imobilisasi (g/mL)	Enzim Loading (%)
I Aktif	0,01	0,000863	91,37
II Aktif	0,01	0,000426	95,74
III Aktif	0,01	0,000692	93,08
I	0,01	0,00092	90,80
II	0,01	0,000578	94,22
III	0,01	0,000768	92,32

Tabel 4.2 merupakan hasil akhir perhitungan enzim loading menggunakan konsentrasi dari larutan enzim. Perhitungan enzim *loading* dapat juga dilakukan berdasarkan massa enzim sebelum dan sesudah diimobilisasi dimana massa enzim didapatkan dengan mengalikan konsentrasi enzim dengan volume larutan enzim. Enzim loading yang didapatkan baik untuk zeolit teraktifasi dan tidak teraktifasi sekitar 90 – 95 % dimana tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan Gambar 4.2 menunjukkan hasil percobaan ini zeolit teraktifasi tidak memberikan pengaruh terhadap enzim *loading* padahal zeolit yang telah diaktifasi akan menghilangkan pengotor didalam zeolit sehingga membuka pori-pori zeolit menjadi lebih besar dibandingkan dengan zeolit yang tidak diaktifasi. Secara teori luas permukaan pori-pori *support* dalam imobilisasi *entrapment* sangat mempengaruhi keberhasilan imobilisasi dikarenakan pori-pori *support* sebagai tempat melekatnya enzim sebelum diemulsi oleh agen pengemulsi NaF (Banu, 2001).



Gambar 4.2. Perbandingan enzim *loading* zeolit aktif dan tanpa aktifasi

Gambar 4.2 menunjukkan diagram yang hampir sama antara penggunaan *support* zeolit teraktifasi dan zeolit tidak teraktifasi. Peninjauan berdasarkan ukuran dari zeolit yang digunakan adalah zeolit dalam bentuk serbuk yang berukuran sekitar 5-400  $\mu\text{m}$  merupakan ukuran yang sesuai dalam penggunaan *support* dalam metode imobilisasi *entrapment* dengan permukaan pori sebesar 2-

50 nm (Zarcu, Croitoru, Corici, Csunderlik, & Peter, 2009). Ukuran zeolit yang telah berbentuk serbuk akan memiliki luas permukaan yang maksimal sebagai *support* untuk mengimobilisasi enzim, diperkirakan zeolit yang diaktifkan tidak meningkatkan pori-pori secara signifikan karena ukuran zeolit yang telah serbuk memiliki pori-pori yang hampir maksimal dengan sedikit pengotor. Oleh karena itu, enzim *loading* tidak mengalami peningkatan saat menggunakan *support* zeolit teraktifasi.

Percobaan ini menunjukkan dalam penggunaan *support* zeolit berbentuk serbuk sebagai *support* imobilisasi *entrapment* lebih diarahkan pada zeolit tanpa diaktifasi dikarenakan dengan tingkat enzim *loading* yang hampir sama, pengaktifan zeolit akan menambah perlakuan dan waktu pengerjaan. Oleh karena itu, percobaan sintesis biodiesel yang akan dilakukan selanjutnya akan menggunakan biokatalis dari imobilisasi *entrapment* menggunakan *support* serbuk zeolit yang tidak diaktifasi.

#### **4.1.2. Variasi Perbandingan Enzim dan Zeolit**

Imobilisasi enzim lipase ditunjukkan untuk memaksimalkan penggunaan enzim lipase dalam reaksi yang akan dilangsungkan, dalam percobaan ini sintesis biodiesel rute non-alkohol. Imobilisasi enzim dapat memaksimalkan enzim dengan cara menjaga keutuhan enzim sebagai biokatalis dalam sebuah reaksi yang berlangsung, enzim sebagai biokatalis tidak ikut bereaksi tetapi enzim sebagai biokatalis dapat dengan mudah rusak dan terbawa dalam aliran produk sehingga enzim tidak bekerja maksimal sebagai biokatalis.

Pada percobaan ini, metode imobilisasi yang digunakan adalah metode *entrapment* dimana enzim lipase akan diemulsi dalam pori-pori zeolit sebagai *support* dan NaF sebagai agen pengemulsi gel. Pada bagian percobaan ini diarahkan pada perbandingan rasio massa enzim dan massa *support* yang digunakan untuk imobilisasi *entrapment*, perbandingan rasio yang optimal antara enzim lipase dan zeolit diperlukan sebelum biokatalis *entrapment* digunakan sebagai biokatalis dalam reaksi. Rasio enzim optimal yang dapat digunakan adalah 10 % massa enzim dan 90 % massa *support* (Moreno-Piraja & Giraldo, 2011).

Percobaan ini dilakukan dengan beberapa variasi rasio antara massa enzim dan *support* dengan rasio enzim dibawah 10 %. Rasio enzim dan *support* yang diujikan dalam percobaan ini dipilih secara acak ditandai dengan rasio enzim, dimulai dari 2% , 3%, 5%, 6%, 8%, dan 9% dari massa enzim, sedangkan massa *support* merupakan sisanya.

Enzim yang digunakan dilarutkan terlebih dahulu dengan menggunakan *phosphat buffer* pH 7 dengan konsentrasi tepat 0,01 g/mL yang dibuat dengan melarutkan 1 g enzim lipase *Candida rugosa* dalam 100 mL *phosphat buffer*. Massa enzim didapatkan berdasarkan volume larutan enzim yang digunakan dikali dengan konsentrasi enzim. *Support* dan agen pengemulsi gel NaF ditambahkan sesuai imobilisasi *entrapment*. Hasil larutan sisa imobilisasi *entrapment* diukur konsentrasinya dengan menggunakan metode Lowry. Berikut ini pada Tabel 4.3 merupakan rincian percobaan dan hasil enzim *loading* yang didapatkan dengan variasi rasio.

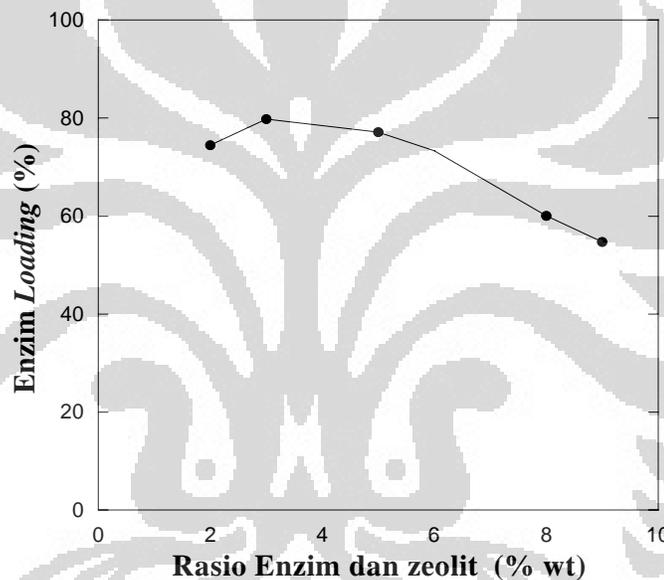
**Tabel 4.3. Perbandingan rasio enzim *Candida rugosa* terhadap enzim *loading***

Enzim Lipase (%)	Zeolit (g)	Enzim sebelum terimobilisasi (g)	Enzim setelah imobilisasi (g)	Enzim Loading (%)
2	14,7	0,3	0,076	74,46
3	9,7	0,3	0,060	79,78
5	5,7	0,3	0,068	77,12
6	4,7	0,3	0,080	73,32
8	3,45	0,3	0,119	60,02
9	3	0,3	0,135	54,70

Tabel 4.3 menunjukkan hasil percobaan variasi rasio antara enzim lipase dan *support* zeolit dalam imobilisasi *entrapment* dimana dalam percobaan ini massa enzim awal yang digunakan adalah sama untuk setiap variasi tetapi massa zeolit yang ditambahkan berbeda untuk setiap variasi. Variasi terlihat pada semakin kecilnya rasio enzim lipase maka semakin besar jumlah zeolit yang ditambahkan. Sedangkan massa enzim setelah imobilisasi didapatkan dari

mengalikan konsentrasi terukur metode Lowry volume awal larutan dengan asumsi bahwa volume larutan awal dan akhir adalah sama.

Enzim loading yang terdapat pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa enzim loading terbesar dicapai oleh rasio enzim 3% dan *support* zeolit 97% dengan enzim loading sebesar 79,78%. Rasio ini terbesar pada bagian percobaan ini dibandingkan dengan rasio enzim yang lebih kecil 2% atau dibandingkan dengan peningkatan rasio yang semakin menurunnya enzim loading. Perbandingan enzim loading dengan rasio enzim dapat digambarkan dalam sebuah kurva pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3. Kurva perbandingan rasio enzim dan enzimloading**

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa enzim loading maksimal yang dicapai hanya oleh rasio enzim 3% dimana pengurangan atau peningkatan rasio enzim akan menurunkan enzim loading. Hal ini menunjukkan kejenuhan pori-pori zeolit dibandingkan dengan massa enzim berada pada massa enzim 3% dan massa zeolit 97%.

Hasil perbandingan rasio enzim dan enzim loading dalam kurva Gambar 4.3 memperlihatkan bahwa semakin besar rasio enzim yang digunakan maka

konsentrasi enzim *loading* akan terus berkurang atau dapat dikatakan metode imobilisasi gagal jika rasio enzim dalam *support* zeolit melebihi kemampuan *support* zeolit untuk mengunci enzim dalam porinya. Rasio optimal yang diperlihatkan pada rasio enzim sebesar 3% tidak pada rasio 2% dengan perkiraan pada rasio ini pori-pori zeolit tidak jenuh secara optimal.

Pengamatan hasil enzim *loading* pada 3% berbeda sekitar 10-14% dibandingkan dengan percobaan variasi zeolit teraktifasi, hal ini diduga karena terdapat perlakuan berbeda pada percobaan ini. Pada proses penyaringan akhir diperlukantambahan perlakuan berupa pengadukan untuk mengeluarkan seluruh endapan zeolit agar zeolit seluruhnya perlu dikeluarkan untuk selanjutnya proses pengeringan. Proses pengadukan ini dapat mengakibatkan enzim lipase yang tidak terkunci sempurna pada pori-pori zeolit terlepas kembali sehingga menurunkan enzim *loading* dari proses imobilisasi *entrapment*.

Pengurangan persentase enzim *loading* dikarenakan pengadukan dikhawatirkan akan mempengaruhi enzim penurunan enzim *loading*. Enzim *loading* memiliki kemungkinan akan mengalami penurunan secara tidak stabil. Hal ini akan menjadi permasalahan untuk percobaan berikutnya, oleh karena itu dilakukan pengulangan imobilisasi untuk konsentrasi 3% untuk menguji kestabilan enzim *loading*. Hasil yang didapatkan terlihat pada Tabel 4.4.

**Tabel 4.4. Pengukuran enzim *loading* pada rasio 3%**

Enzim lipase (3%)	Zeolit (g)	Enzim sebelum terimobilisasi (g)	Enzim setelah imobilisasi (g)	Enzim Loading (%)
I	9,7	0,3	0,057	80,92
II	9,7	0,3	0,061	79,40
III	9,7	0,3	0,056	81,30

Pengulangan kembali imobilisasi *entrapment* bertujuan untuk menguji kestabilan enzim *loading* pada rasio 3% dan juga sebagai persiapan biokatalis untuk reaksi sintesis biodiesel rute non alkohol. Pada Tabel 4.4, imobilisasi diujikan pada tiga sampel atau triplo dimana enzim *loading* yang didapatkan rata-

rata 80,54% dengan hasil ini menunjukkan bahwa enzim *loading* yang didapatkan pada rasio enzim 3% stabil pada imobilisasi *entrapment*. Dari hasil ini menunjukkan bahwa rasio 3% enzim lipase dan *support* zeolit merupakan rasio optimal dalam imobilisasi lipase dengan metode *entrapment*. Percobaan selanjutnya, untuk reaksi sintesis biodiesel rute non alkohol akan menggunakan rasio 3% sebagai sumber biokatalis.

#### 4.1.3. Imobilisasi Lipase dengan Variasi NaF

Imobilisasi *entrapment* sangat bergantung pada agen pengemulsi gel, dimana pada percobaan ini agen pengemulsi yang digunakan adalah NaF. Agen pengemulsi gel berperan untuk membentuk lapisan gel pada permukaan pori-pori zeolit untuk menahan enzim lipase yang telah masuk dalam pori-pori zeolit sebagai *support*. Umumnya agen pengemulsi yang digunakan berupa NaF dengan konsentrasi 0,5 M sebanyak 0,5 mL untuk setiap 10 mL larutan yang ada (Moreno-Piraja & Giraldo, 2011; Nouredini, Wagner, & Gutsman, 2002).

Pada percobaan ini, variasi dilakukan pada konsentrasi NaF dimulai dari konsentrasi 0,5 M, 1 M, dan 2 M. Pemilihan variasi konsentrasi ditentukan dengan pertimbangan semakin banyak agen pengemulsi maka enzim yang terjebak dalam pori-pori zeolit semakin banyak. Pada percobaan ini menggunakan rasio enzim 2% dengan *support* tidak teraktifasi, kondisi ini dipilih secara acak untuk tingkat kemudahan dalam percobaan.

Larutan enzim yang digunakan dalam percobaan ini adalah larutan 0,01 g/mL dengan larutan sebanyak 30 mL sehingga massa enzim 0,3 g dan penambahan zeolit sebesar 14,7 g untuk setiap variasi konsentrasi. Hasil yang didapatkan terdapat pada Tabel 4.5.

**Tabel 4.5. Perbandingan konsentrasi NaF terhadap enzim loading**

Variasi NaF (M)	Zeolit (g)	Enzim sebelum terimobilisasi (g)	Enzim setelah imobilisasi (g)	Enzim Loading (%)
0,5	14,7	0,3	0,076	74,46
1	14,7	0,3	0,071	76,36
2	14,7	0,3	0,071	76,36

Pada Tabel 4.5 terlihat bahwa peningkatan konsentrasi NaF tidak memberikan perubahan yang signifikan terhadap enzim loading. Enzim loading hanya meningkat sebesar 1,9 % dimana konsentrasi maksimum NaF sebesar 1 M. Berdasarkan hasil percobaan ini terlihat bahwa NaF sebagai agen pengemulsi tidak memiliki pengaruh yang besar terhadap besarnya enzim loading.

Penambahan agen pengemulsi gel diharapkan mampu meningkatkan pengikatan enzim pada saat imobilisasi dengan cara mengikat enzim lebih kuat terutama pada saat proses pengadukan dan penyaringan akhir (Banu, 2001). NaF sebagai agen pengemulsi gel dalam imobilisasi *entrapment*nya berperan menutup permukaan pori-pori zeolit sebagai *support*.

Berdasarkan hasil percobaan ini, tingginya konsentrasi NaF tidak memberikan pengaruh yang berarti sehingga pada percobaan selanjutnya konsentrasi NaF yang digunakan adalah tetap sebesar 0,5 M. Selain itu, faktor tingginya biaya bahan kimia NaF maka konsentrasi NaF tetap dipertahankan 0,5 M.

#### **4.2. Sintesis Biodiesel Rute NonAlkohol Sistem Reaktor Batch**

Pada percobaan ini, sintesis biodiesel dengan rute nonalkohol dengan biokatalis berupa enzim lipase candida rugosa yang telah terimobilisasi pada zeolit. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Septian Marno (Marno, 2008) bahwa persentase biokatalis sebesar 4% berat umpan dengan umpan terdiri dari minyak sayur dan metilasetat dengan perbandingan mol 1 :12 digunakan pada percobaan ini. Kondisi umpan pada suhu 37°C dengan pengadukan 150 rpm direaksikan selama 50 jam menggunakan kondisi optimal dari percobaan sebelumnya (Surendro, 2008).

Pada percobaan ini menggunakan variasi biokatalis yang dibuat dari rasio enzim 3%, 6%, dan 9% dengan alasan bahwa diperlukannya pengujian pengaruh enzim loading terhadap aktifitas biokatalis yang dihasilkan. Selain itu, massa enzim yang terkandung pada biokatalis dengan rasio enzim lebih besar maka akan semakin banyak enzim yang tersimpan dalam *support* walaupun enzim *loading* yang dimiliki rendah. Berikut ini pada Tabel 4.6 perhitungan mengenai massa enzim didalam 1 g zeolit untuk rasio 3%, 6%, dan 9%.

**Tabel 4.6. Perhitungan massa enzim dalam 1 g zeolit**

Enzim Lipase (%)	Zeolit (g)	Enzim awal (g)	Enzim Loading (%)	Enzim Terimobilisasi (g)	Enzim dalam 1 g zeolit (g)	Enzim dalam 4 g zeolit (g)
3	9,7	0,3	79,78	0,24	0,025	0,10
6	4,7	0,3	73,32	0,22	0,047	0,19
9	3	0,3	54,7	0,16	0,055	0,22

Berdasarkan perhitungan pada Tabel 4.6 maka reaksi interesterifikasi untuk sintesis biodiesel rute non alkohol dilakukan pada biokatalis yang bersumber dari rasio 3%, 6%, dan 9%. Pada masing-masing rasio enzim memiliki masing-masing besarnya enzim *loading* dan memiliki massa enzim dalam 1 g zeolit. Pada rasio enzim 3% memiliki enzim *loading* terbesar tetapi hanya terdapat 0,025 g enzim dalam 1 g zolit.

Reaksi yang berlangsung 50 jam dan sampel yang akan dijadikan pembandingan ditentukan berdasarkan sampel yang memiliki hasil analisis HPLC dengan neraca massa tetap berdasarkan massa umpan awal. Dikarenakan adanya kerusakan sampel hasil analisis HPLC dimana hasilnya tidak sesuai neraca massa awal maka dipilih sampel yang seimbang, yaitu waktu jam ke-40 untuk rasio 3%, sampel pada waktu jam ke-45 untuk rasio 6% dan 9%.

Hasil yang diperoleh dianalisis dengan HPLC untuk menentukan besarnya biodiesel atau metiloleat terlampir pada bagian lampiran I. Hasil yang terbentuk dan persentase terdapat pada Tabel 4.7 dimana *yield* metil oleat masing-masing variasi biokatalis rasio 3% enzim memiliki *yield* sebesar 64,51% metil oleat, rasio

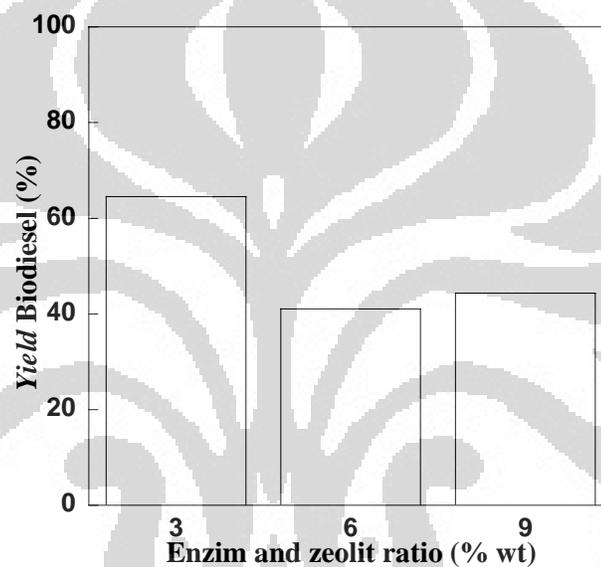
6% enzim memiliki *yield* sebesar 41,05%, dan rasio 9% enzim memiliki *yield* sebesar 44,32%.

**Tabel 4.7. Persentase sintesis biodiesel rute non alkohol pada sistem *batch***

4% katalis	Perbandingan mol = 1:12			
	Variasi konsentrasi katalis			
Komponen	Standar	3%	6%	9%
Trioleat (mol)	0,039	0,018	0,020	0,016
Diroleat (mol)	0,014	0,007	0,014	0,022
Monooleat (mol)	0,004	0,004	0,010	0,002
Metiloleat (Biodiesel) (mol)	0	0,076	0,048	0,052
Konversi trigliserida (%)		55,44	48,39	58,99
<i>Yield</i> digliserida (%)		12,12	23,30	37,10
<i>Yield</i> monogliserida (%)		3,22	8,45	1,98
<i>Yield</i> biodiesel (%)		<b>64,52</b>	<b>41,05</b>	<b>44,33</b>
siswa trigliserida(%)		44,56	51,61	41,00

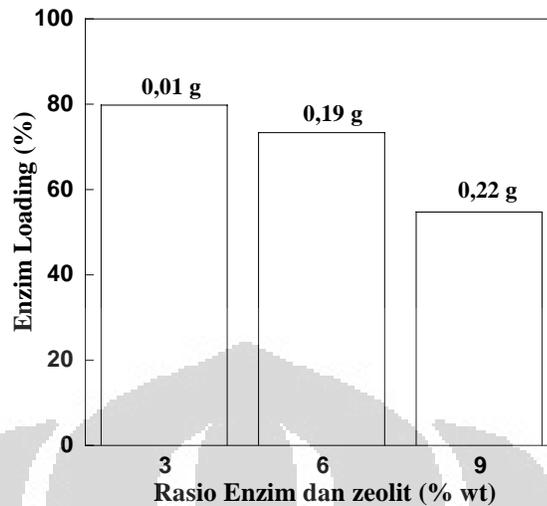
Pada Tabel 4.7 menggambarkan hasil reaksi interesterifikasi pada sistem *batch* dengan catatan bahwa sampel yang diambil merupakan sampel yang berada dibagian atas sistem reaksi *batch* hal ini dilakukan untuk mendapatkan keberadaan metiloleat yang terbentuk dikarenakan metiloleat memiliki densitas 0,85 g/mL dan minyak sayur sebesar 0,9 g/mL. Pengambilan sampel yang stabil diperlukan untuk mendapatkan hasil konversi reaksi yang tepat menggambarkan keadaan dalam sistem *batch* jika pengambilan sampel dalam keadaan teraduk maka kemungkinan hasil analisis yang didapatkan berupa umpan masuk yang belum bereaksi. Hal ini yang menyebabkan pemilihan sampel yang berbeda pada percobaan ini sebagai analisis dimana hasil yang didapatkan dapat digunakan sebagai analisis hasil percobaan ini.

Hasil reaksi sistem menjadi acuan untuk melanjutkan reaksi sistem kontinyu. Oleh karena itu, perbandingan % *yield* metiloleat menjadi pertimbangan utama pemilihan rasio konsentrasi lipase dan *support* menjadi biokatalis sebagai isian reaktor kontinyu yang berupa reaktor *packed bed*. Pada diagram dalam Gambar 4.4 terlihat perbandingan % *yield* biodiesel dengan konsentrasi lipase dalam *support* zeolit yang telah diimobilisasi dan terlihat bahwa rasio 3% enzim lipase lebih menghasilkan % *yield* biodiesel yang lebih tinggi dibandingkan dengan rasio 6% dan 9%.



**Gambar 4.4. Perbandingan *yield* dan rasio biokatalis**

Hasil pada Gambar 4.4 yang diperoleh ini berbanding terbalik dengan jumlah enzim lipase yang digunakan dalam mengimobilisasi *support* zeolit dimana semakin besar persentase enzim maka semakin besar enzim yang digunakan untuk mengimobilisasi *support* zeolit. Tetapi jika hasil ini dilihat berdasarkan dengan keberhasilan imobilisasi enzim dalam *support* zeolit menggunakan enzim *loading* setiap rasio yang diujikan sebelumnya terlihat bahwa enzim *loading* terbesar yang dimiliki rasio 3% memiliki konversi biodiesel atau metil oleat yang tinggi. Diagram pada Gambar 4.5 menggambarkan perbandingan besarnya enzim *loading* masing-masing rasio dan jumlah enzim dalam biokatalis yang digunakan dalam biokatalis sedangkan perhitungan jumlah enzim dalam 4% biokatalis bersama *support* dapat dilihat dalam Tabel 4.5.



**Gambar 4.5. Perbandingan rasio enzim dan enzim loading**

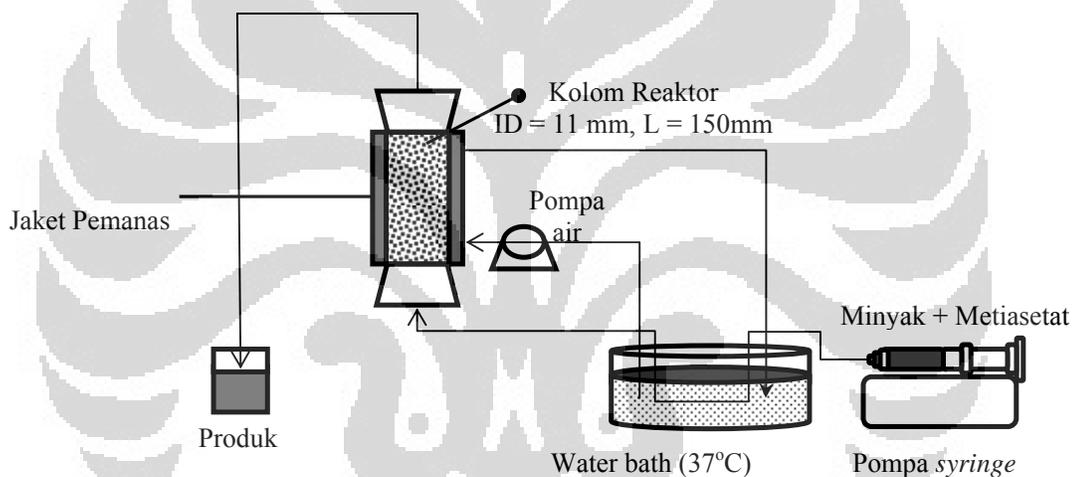
Dari hasil reaksi interesterifikasi pada sistem *batch* dapat terlihat hasil terbaik untuk pemilihan rasio 3% enzim dengan jumlah enzim sedikit hanya 0,095 g dalam biokatalis, enzim loading terbaik sekitar 80% mendapatkan % *yield* biodiesel terbesar yaitu, 64,2 %. Hasil pada kurva dalam Gambar 4.5 memperlihatkan bahwa enzim yang sedikit dapat menghasilkan % *yield* biodiesel yang lebih tinggi. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim yang terimobilisasi pada *support* dapat bekerja lebih efektif menjadi biokatalis dalam reaksi interesterifikasi.

Pada rasio 3% enzim lipase, enzim dapat bekerja efektif saat terjadi proses pengadukan dimana sisi aktif enzim akan bekerja lebih kuat pada saat enzim terikat pada *support* zeolit. Enzim dapat bergerak bebas bersama zeolit untuk bereaksi dengan substrat dimana pertemuan substrat dan enzim akan terjadi didalam permukaan pori-pori zeolit dimana tempat enzim lipase terperangkap (Banu, 2001). Hal yang sama terjadi pada biokatalis dengan rasio enzim 6% dan 9% tetapi diperkirakan bahwa keberadaan enzim lipase didalam permukaan pori-pori zeolit terlalu lemah sehingga enzim akan mudah terlepas yang membuat tingkat keefektifan enzim berkurang dalam reaksi ini.

Rasio enzim 3% dipilih untuk digunakan pada reaksi sistem kontinyu, pada reaktor *packed bed* dimana biokatalis terimobilisasi dengan 3% enzim akan menjadi isian reaktor *packed bed*.

#### 4.3. Set Up Reaktor Kontinyu

Pada reaksi kontinyu, sistem reaktor *packed bed* yang digunakan diadopsi dari pembuatan sistem reaktor oleh penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ahmad Wafa dan Ayu Diah (Ayu, 2009; Wafa, 2009) dimana reaktor *packed bed* yang memiliki ketinggian 15 cm dan diameter 1,1 cm sebagai reaktor *packed bed* skala lab. Reaktor dibuat jaket dengan aliran air sebesar 37°C berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Risan (Surendro, 2008).



**Gambar 4.6.** Set up reaktor *packed bed* (Wafa, 2009)

Set up pada Gambar 4.6 dan foto asli dalam lampiran H dimana terdapat kolom isian reaktor *packed bed* yang akan diisi dengan biokatalis enzim lipase *Candida rugosa* yang telah terimobilisasi dengan metode *entrapment*. Berdasarkan optimalisasi imobilisasi dengan metode *entrapment* maka dipilih biokatalis dengan rasio enzim 3% dengan agen NaF 0,5 M, dan *support* serbuk zeolit yang tidak diaktifasi. Selain itu, jika menggunakan zeolit teraktifasi maka ukuran zeolit akan lebih halus sehingga kolom reaktor akan tersumbat ketika aliran umpan mengalir kedalam reaktor. Enzim *loading* biokatalis yang digunakan sebagai isian reaktor *packed bed* terdapat pada Tabel 4.4.

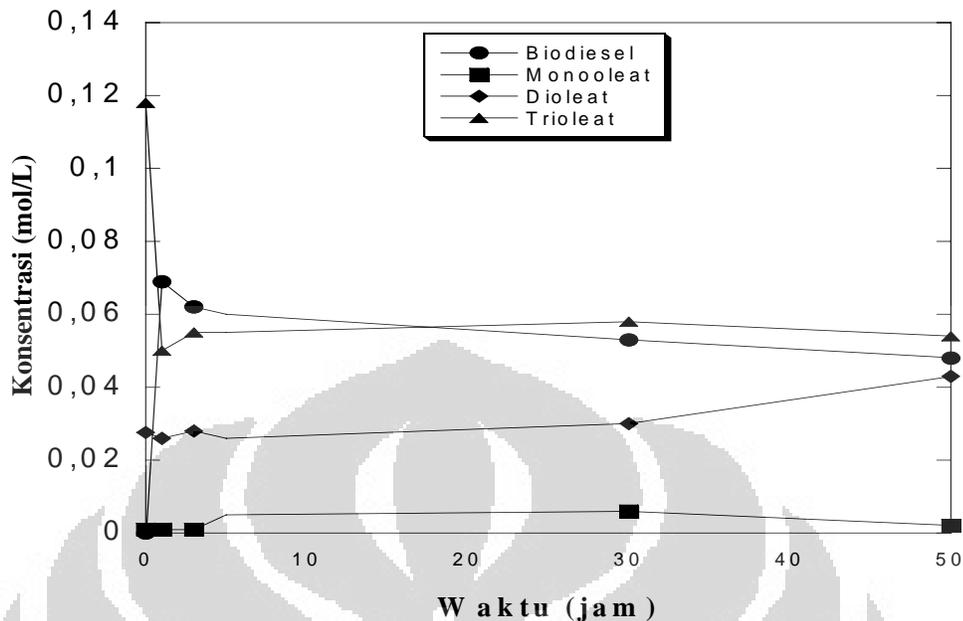
Biokatalis dimasukkan kedalam reaktor *packed bed* dalam keadaan kering dan dimasukkan secara perlahan tanpa dimampatkan. Kapasitas maksimum reaktor *packed bed* untuk isian sebesar 12 g zeolit hasil imobilisasi tetapi isian yang tepat hanya sebanyak 8 g zeolit dengan pengisian perlahan dikarenakan jika lebih dari 75% kolom isian dimampatkan maka akan terjadi *pressure drop* yang terlalu tinggi sehingga pompa *syringe* dengan laju 1 mL/jam tidak mampu memompakan umpan ke dalam reaktor (Ayu, 2009; Wafa, 2009).

*Resident time* merupakan waktu tinggal umpan berada didalam reaktor *packed bed* dengan isian biokatalis. Waktu ini merupakan lamanya waktu terjadi reaksi didalam reaktor. Reaktor dengan dimensi ID 11 mm dan panjang 150 mm maka isian kosong reaktor adalah 14,25 cm<sup>3</sup> atau 14,25 mL air.

Pengisian 75% kolom dengan biokatalis mengakibatkan sisa volume kolom sebesar 3,56 mL tetapi dikarenakan bentuk biokatalis yang berupa zeolit sehingga untuk pengisian sisa kolom reaktor dari hasil percobaan diperlukan 5 mL umpan. Berdasarkan percobaan sebelumnya laju maksimal adalah 1 mL/jam sehingga waktu tinggal selama 5 jam (Wafa, 2009).

#### **4.4. Sintesis Biodiesel Rute Non Alkohol Pada Sistem Kontinyu**

Pada reaksi kontinyu ini digunakan laju alir sebesar 1 mL/jam berdasarkan hasil optimal dari penelitian sebelumnya. Biokatalis yang digunakan merupakan zeolit terimobilisasi dengan 3% enzim lipase *Candida rugosa* hasil dari studi enzim *loading*. Reaksi berlangsung selama 50 jam dengan sample diambil bertahap untuk dianalisis HPLC. Sampel yang dianalisis dipilih mulai dari jam ke-1, ke-3, ke-5, ke-30, dan ke-50. Pemilihan sampel ini berdasarkan waktu reaksi yang berlangsung secara bertahap untuk melihat kecenderungan hasil reaksi dalam reaktor. Hasil analisis dapat terlihat pada Gambar 4.7.



**Gambar 4.7.** Kurva hasil reaksi interesterifikasi pada reaktor *packed bed*

Berdasarkan grafik 4.7, reaksi interesterifikasi pada reaktor *packed bed* dengan sistem kontinu menghasilkan biodiesel dengan waktu tinggal 5 jam. Trioleat mengalami penurunan konsentrasi dari jam pertama sampai dengan jam ke-50 dengan rata-rata trioleat terdekomposisi setengah dari umpan masuk. Tetapi penurunan trioleat tidak terus setara dengan pembentukan biodiesel atau metil oleat, biodiesel yang terbentuk awalnya mengikuti konversi biodiesel tetapi sekitar waktu jam ke-18 (antara jam ke-15 dan jam ke-20) konversi biodiesel menjadi lebih rendah dari pada konversi trioleat.

Penurunan ini dikarenakan berkurangnya kemampuan biokatalisis dalam reaksi interesterifikasi. Proses penurunan ini ditandai dengan meningkatnya senyawa intermediet dioleat dan monooleat pada waktu yang bersamaan dengan berkurangnya konsentrasi biodiesel. Untuk lebih jelasnya %*yield* yang dihasilkan diperlihatkan dalam Tabel 4.8 konversi reaksi kontinu.

**Tabel 4.8. Perbandingan % yield setiap komponen hasil reaksi dalam sistem kontinyu**

4% katalis	Perbandingan mol = 1:12					
	<i>Sampling</i>					
Komponen	Standar	1	3	5	30	50
Trioleat (mol)	0,039	0,017	0,018	0,018	0,019	0,018
Diroleat (mol)	0,014	0,013	0,014	0,013	0,015	0,021
Monooleat (mol)	0,001	0,001	0,001	0,005	0,006	0,002
Metiloleat (Biodiesel) (mol)	0	0,069	0,062	0,060	0,053	0,048
Konversi trigliserida (%)		57,37	53,20	53,42	50,80	54,06
Yield digliserida (%)		22,38	24,14	22,05	25,31	36,18
Yield monogliserida (%)		0,73	0,90	4,60	4,70	1,68
Yield biodiesel (%)		<b>58,68</b>	<b>52,59</b>	<b>51,19</b>	<b>45,22</b>	<b>40,62</b>
sisa trigliserida(%)		42,63	46,80	46,58	49,20	45,94

Dari Tabel 4.8 terlihat bahwa %yield biodiesel mencapai 58,68 % pada jam pertama dan terus mengalami penurunan secara perlahan sampai pada jam ke 50 % yield biodiesel menjadi 40,62 %. Penurunan ini dapat dikaitkan dengan berkurangnya aktifitas biokatalis dalam reaktor PBR tetapi jika dikaitkan dengan besarnya trioleat yang terkonversi maka biokatalis masih stabil. Hal ini menunjukkan bahwa biokatalis masih memiliki aktifitas didalam reaktor PBR selama reaksi 50 jam yang berarti enzim lipase yang terjebak dalam pori-pori zeolit sebagai *support* masih bertahan didalam zeolit yang menjadi isian reaktor PBR.

#### 4.5. Fitting Persamaan Michaelis Menten

Hasil percobaan pada sistem kontinyu memiliki lima sampel sehingga dapat digunakan sebagai data perbandingan dalam jalannya reaksi yang berlangsung dengan katalis enzim lipase. Model yang dicobakan adalah

persamaan Michaelis Menten, persamaan inidigunakan untuk menghitung penurunan kecepatan reaksi pada reaksi interesterifikasi yang berlangsung kontinyu. Dikarenakan terjadinya penurunan konsentrasi maka digunakan persamaan Michaels Menten dalam bentuk linearisasi Eadie-Hofstee(Bisswanger, 1999) yang memiliki besarnya :

$$\frac{1}{r_s} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (4.1)$$

Dikalikan dengan  $r_s \cdot V_{max}$  dan disesuaikan menjadi

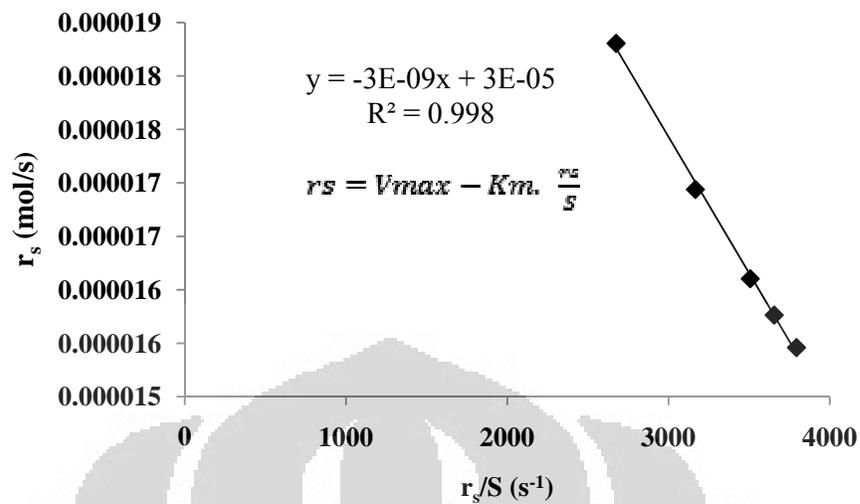
$$r_s = V_{max} - K_m \cdot \frac{r_s}{S} \quad (4.2)$$

Jika diplot secara linear mnjadi,  $y = mx + c$  , maka dapat diplot menjadi kurva linear. Data perhitungan terdapat pada Tabel 4.9

**Tabel 4.9. Tabel perhitungan Michaelis Menten Eadie-Hofstee**

Time (Jam)	Trioleat, S (mol)	Trioleat terdegradasi (mol)	$r_s$ (mol/s)	$1/r_s$ (s/mol)	$r_s/S$ ( $s^{-1}$ )
1	0,060	0,0575	$1,59 \cdot 10^{-5}$	62654,7	3793,55
3	0,050	0,067	$1,88 \cdot 10^{-5}$	53177,9	2675,24
15	0,059	0,058	$1,62 \cdot 10^{-5}$	61485	3655,52
30	0,055	0,062	$1,74 \cdot 10^{-5}$	57344,7	3166,95
50	0,058	0,060	$1,66 \cdot 10^{-5}$	60227,5	3507,12

Tabel 4.9 memperlihatkan perhitungan untuk mendapatkan nilai  $r_s$  dan  $r_s/S$  dimana nilai  $r_s$  adalah trioleat yang habis dibagi dengan waktu pengumpulan sampel dimana setiap sampel berasal dari setiap jam akumulasi hasil reaktor PBR sedangkan S adalah substrat dari sisa trioleat. Hasil ini diplot pada kurva dalam Gambar 4.9.



**Gambar 4.9. Fitting Michaelis Menten untuk Eadie-Hofstee**

Dari Gambar 4.9 terlihat kurva memiliki kemiringan ke arah kiri atau dengan arti gradien kurva linear adalah negatif. Dari perhitungan ini maka terbentuk grafik berikut ini, dengan persamaan 4.3:

$$r_s = -3.10^{-9}x + 3.10^{-5} \quad (4.3)$$

didapatkan besarnya  $V_{max}$  sebesar  $3 \times 10^{-5}$  mol/s sedangkan  $K_m$  sebesar  $-3 \times 10^{-9}$  g mol/L. Dari persamaan ini menunjukkan bahwa akan terjadi penurunan konsentrasi biodiesel secara bertahap dan percobaan sintesis biodiesel reaksi kontinyu mengikuti model Michaelis Menten Eadie-Hofstee.

## BAB 5

### KESIMPULAN

#### 5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah

1. Imobilisasi lipase *Candida rugosa* dengan metode *entrapment* dengan *support* zeolit serbuk dan agen NaF akan optimal pada rasio 3% enzim dari *support*.
2. Aktifasi zeolit sebagai *support* metode imobilisasi *entrapment* tidak memberikan pengaruh besar terhadap besarnya enzim *loading*.
3. Peningkatan konsentrasi NaF diatas 0,5 M tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap besarnya enzim *loading*.
4. Enzim *loading* optimal yang dapat dicapai pada imobilisasi lipase dengan metode *entrapment* adalah 80% dengan rasio enzim 3%.
5. Sintesis biodiesel rute non-alkohol pada sistem *batch* dengan kondisi suhu 37°C dan *shaker* 150 rpm menghasilkan %*yield* biodiesel pada rasio biokatalis sebesar 64,52%.
6. Sintesis biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu reaktor *packed bed* dengan kondisi suhu jaket 37°C, laju alir 1 mL/jam, dan waktu tinggal 5 jam mampu menghasilkan biodiesel dengan %*yield* jam ke-1 sebesar 58,68% dan jam ke-50 sebesar 40,62%.
7. Berdasarkan percobaan sintesis biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu pendekatan pada persamaan Michaels Menten dalam bentuk linearisasi Eadie-Hofstee didapatkan  $V_{max}$  sebesar  $3 \times 10^{-5}$  mol/s sedangkan  $K_m$  sebesar  $-3 \times 10^{-9}$  g mol/L.

#### 5.2. Saran

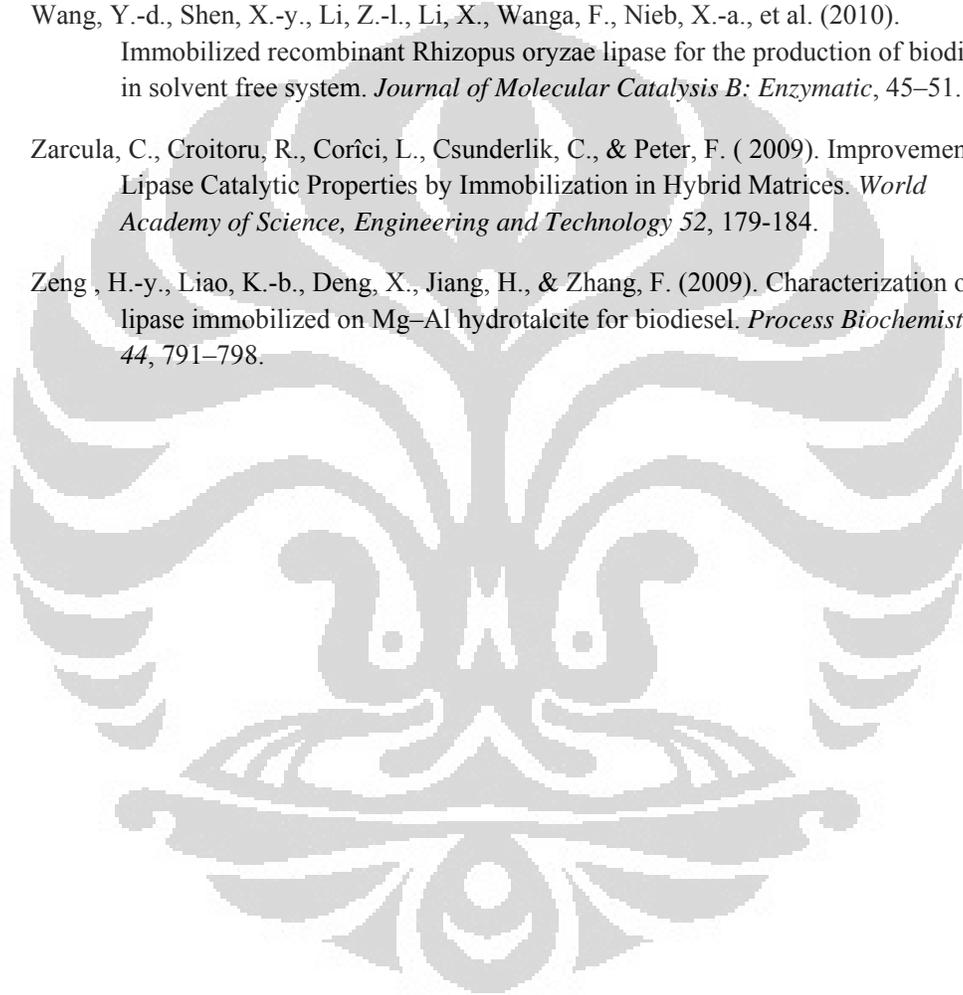
Saran untuk peneliti selanjutnya pada penelitian ini adalah mengoptimalkan kembali konsentrasi agen NaF pada metode imobilisasi tidak berdasarkan besarnya enzim *loading* tetapi mengoptimalkannya berdasarkan kestabilan %*yield* biodiesel yang terbentuk dalam sintesis biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Tumturk, H., Karaca, N., Demirel, G., & Sahin, F. (2007). Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *Biological Macromolecules* 40, 281–285.
- Uyanik, A., Sen, N., & Yilmaz, M. (2011). Improvement of catalytic activity of lipase from *Candida rugosa* via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza) crown. *Bioresource Technology*, 4313–4318.
- Standar Nasional Biodiesel, SNI 04-7182-2006 (Badan Standardisasi Nasional 2006).
- Archibald, R. (1946). Determination of Lipase Activity. *JBC*.
- Ayu, D. (2009). *Sintesis Biodiesel Dari Minyak Goreng Bekas Melalui Rute Non Alkohol Menggunakan Biokatalis Terimmobilisasi Pada Reaktor Packed Bed*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Banu, O. (2001). Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Turkey: Dissertation Master of Science İzmir Institute of Technology.
- Bisswanger, H. (1999). *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Chen, H. C., Ju, H.-Y., TaWu, T., Liu, Y.-C., Lee, C.-C., & Chang, C. (2010). Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1155.
- Fogler, H. (1999). *Elements of Chemical Reaction Engineering*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. A Simon & Schuster Company Upper Saddle River.
- Halim, S., Kamaruddin, A., & Fernando, W. (2009). Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, 710–716.
- Kharrata, N., Ali, Y., Marzoukb, S., Gargouria, Y.-T., & Châabounia, M. (2011). Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, 1083–1089.
- Kitakawa, N., Honda, H., Kuribayashi, H., Toda, T., Fukumura, T., & Yonemoto, T. (2007). Biodiesel production using anionic ion-exchange resin as heterogeneous catalyst. *Bioresource Tecnology* 98, 416–421.
- Kneževi, Z. D., S, S., Marinkovia, Š., & Mojovi, L. V. (2004). Immobilized Lipases As Practical Catalysts. *Review APTEFF*, 35, 151-164.

- Marchetti, J. (2007). Possible methods for biodiesel production . *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1300–1311.
- Marno , S. (2008). *Intersterifikasi minyak kelapa sawit dengan metila asetat menggunakan biokatalis utuk memproduksi biodiesel*. Depok: Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas.
- Moreno-Piraja, J., & Giraldo, L. (2011). Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry*, 55–62.
- Nanda, S. (2008). *Reactors and Fundamentals of Reactors Design for Chemical Reaction*. Delhi: Dept. of Pharmaceutical Sciences M.D. University Rohtak.
- Noureddini, H., Wagner, P., & Gutsman, M. (2002). Immobilization of Pseudomonas cepacia Lipase by Sol-Gel entrapment and its application in the hydrolysis of Soybean Oil. *Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications*.
- Rahmatullah, N. (2009). *Model Kinetika Berbasis Mekanisme Ping Pong Bi Bi untuk Interesterifikasi Trigliserida Menjadi Biodiesel Secara Enzimatis*. Depok: Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Rizkiyadi, M. (2008). *Reaksi Interesterifikasi Minyak Jelantah Dengan Metil Asetat Menggunakan Biokatalis Candida Rugosa Lipase Untuk Memproduksi Biodiesel*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik universitas Indonesia.
- Shapero, K. (2005, November 11). (Princeton University) Dipetik March 3, 2011, dari Princeton University Blog Service: [http://blogs.princeton.edu/chm333/f2005/group3/archives/02\\_novalipid/interesterification/](http://blogs.princeton.edu/chm333/f2005/group3/archives/02_novalipid/interesterification/)
- Statistik Republik Indonesia, B. P. (2009, Januari). *Produksi Perkebunan Besar menurut Jenis Tanaman, Indonesia (Ton), 1995 - 2010*. Dipetik November 3, 2011, dari [www.bps.go.id](http://www.bps.go.id).
- Surendro, R. (2008). *Reaksi Interesterifikasi Minyak Jelantah Dengan Metil Asetat Menggunakan Biokatalis Porcine Pancreatic Lipase Untuk Memproduksi Biodiesel*. Depok: Departemen Teknik Kimia Fakutas Teknik Universitas Indonesia.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., & Deng, L. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances* 28, 628–634.
- Thessen, B. (2007, April 26). *Biodiesel Production and Quality*.
- Togar, Y. M. (2011). *Optimasi Reaksi Perekahan Dan Isomerisasi Katalis Praseodimium (III)/ Zeolit Klipnotilolit Untuk Meningkatkan Bilangan Oktan Pada Gasoline*. Depok: Dapartemen Teknik Kimia Universitas Indonesia.

- Urk, H. T., Karaca, N., Demirel, G., & ahin, F. (2007). Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/!-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 281–285.
- Wafa, A. (2009). *Sintesis Biodiesel Dari Berbagai Minyak Goreng Melalui Rute Non Alkohol Menggunakan Biokatalis Terimobilisasi Pada Reaktor Packed Bed*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Wang, Y.-d., Shen, X.-y., Li, Z.-l., Li, X., Wanga, F., Nieb, X.-a., et al. (2010). Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45–51.
- Zarcula, C., Croitoru, R., Corci, L., Csunderlik, C., & Peter, F. (2009). Improvement of Lipase Catalytic Properties by Immobilization in Hybrid Matrices. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 52, 179-184.
- Zeng, H.-y., Liao, K.-b., Deng, X., Jiang, H., & Zhang, F. (2009). Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. *Process Biochemistry* 44, 791–798.



## LAMPIRAN A

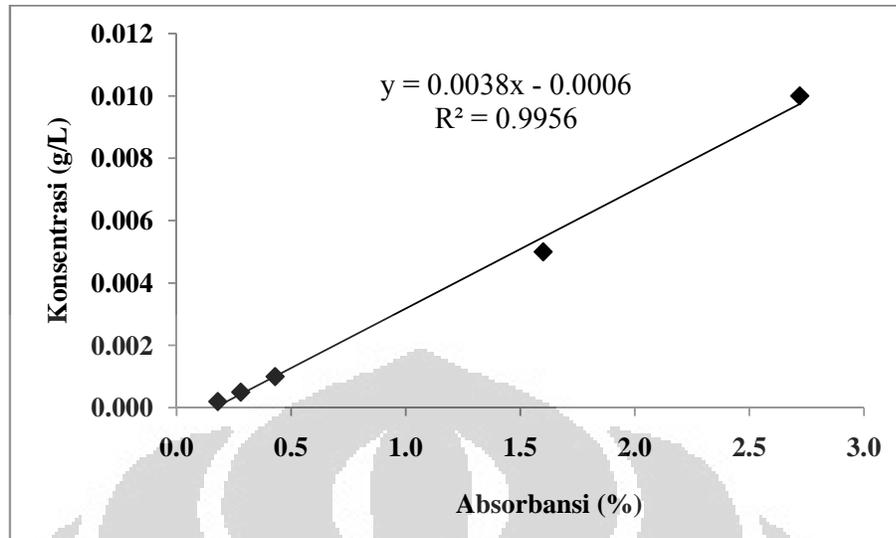
### A. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar merupakan kurva standar yang menghubungkan konsentrasi protein dalam larutan dan absorbansi spektrofotometri dimana absorbansi ditentukan dengan metode lowry menggunakan spektrofotometri. Kurva kalibrasi standar dibuat untuk mengukur keberhasilan immobilisasi lipase *candida rugosa* pada *support zeolit* dengan metode *entrapment* dengan pengukuran sample awal sebelum dilakukan immobilisasi lipase dan sample akhir setelah diimmobilisasi. Nilai absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menentukan konsentrasi lipase *candida rugosa* dalam larutan dengan memasukan nilai absorbansi pada kurva standar.

Kurva standar dibuat dengan metode lowry pada pelarut fosfat buffer dimana protein dalam larutan digumpalkan dengan *reagent* lowry dan diinkubasi dengan Folin-Ciocalteu sehingga mengubah warna larutan dan mengendapkan protein. Sample yang telah diinkubasi diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometri pada 750 nm. Kurva dibuat untuk rentang konsentrasi protein *candida rugosa* 0,01 g/mL sampai 0 g/mL sesuai dengan sample awal yang digunakan dalam percobaan ini (Archibald, 1946).

Sample dibuat duplo (dua) pengukuran dengan beberapa konsentrasi pada fosfat buffer dan dimulai dari 0,01 g/mL ; 0,005 g/mL ; 0,001 g/mL ; 0,0005 g/mL ; dan 0,0002 g/mL. Berikut pada Gambar 4.1 merupakan kurva standar yang terbentuk kurva linear sesuai dengan metode lowry dimana  $R^2 = 0,99$  dan data pengukuran terdapat dalam lampiran.

Persamaan yang terbentuk adalah  $y = 0,0038x - 0,0006$  dimana  $y$  adalah konsentrasi larutan enzim (g/mL) dan  $x$  adalah absorbansi hasil pengukuran spektro. Dengan persamaan ini maka konsentrasi lipase dapat ditentukan dengan dasar analisis absorbansi.



Gambar A. Kurva standar untuk larutan candida rugosa dengan metode Lowry.

Tabel A. Data kurva standar

Konsentrasi (g/mL)	Absorbansi (%)
0.01	2.72
	2.72
0.005	1.6
	1.57
0.001	0.43
	0.42
0.0005	0.28
	0.28
0.0002	0.17
	0.18

## LAMPIRAN B

### B.Perhitungan Hasil HPLC

Data-data yang diperoleh dengan menggunakan HPLC berupa luas area oleh karena itu dalam pengolahan data diperlukan konsentrasi standar untuk setiap senyawa, standar HPLC percobaan ini terdapat pada Tabel A (Rizkiyadi, 2008):

**Tabel B. Data standar HPLC untuk sintesis biodiesel melalui rute non alkohol**

Standar	Rute non Alkohol		
Zat	Luas Area	Konsentrasi mg/mL	Konsentrasi mol/l
T	282910	10	0,010
D	180245	10	0,014
M	2299722	10	0,025
F	361909	100	0,293

Keterangan :

T (Trioleat) , D (Diolate) , M (Mono-oleat), F (*Fatty Acid Metyl Ester*)

$$\text{Konsentrasi (Trioleat)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Trioleat)}}{\text{Mr Trioleat}} \quad (\text{B.1})$$

$$\text{Konsentrasi (Diolate)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Diolate)}}{\text{Mr Diolate}} \quad (\text{B.2})$$

$$\text{Konsentrasi (Mono-oleat)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Mono-oleat)}}{\text{Mr Mono-oleat}} \quad (\text{B.3})$$

$$\text{Konsentrasi (Fatty Acid Metyl Ester)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Fatty Acid Metyl Ester)}}{\text{Mr Trioleat (Fatty Acid Metyl Ester)}} \quad (\text{B.4})$$

Berikutnya adalah melakukan interpolasi terhadap luas area yang diperoleh dari percobaan terhadap luas area standar. Konsentrasi sampel didapatkan dengan cara:

$$\text{Konsentrasi sampel (mol/L)} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \text{konsentrasi standar (mol/L)}$$

Setelah mendapatkan konsentrasi sampel menggunakan interpolasi terhadap data standar yang digunakan, maka konsentrasi biodiesel yang terbentuk saat  $t$  tertentu dihitung menggunakan % mol balance.

$$\% \text{mol balance} = \frac{3 \times C_{T,t=t} + 2 \times C_{D,t=t} + C_{M,t=t} + C_{B,t=t}}{3 \times C_{T,t=0} + 2 \times C_{D,t=0} + C_{M,t=0} + C_{B,t=0}} \times 100\% \quad (\text{B.5})$$

Dari persamaan tersebut diperoleh konsentrasi biodiesel saat  $t = t$ . Untuk mendapatkan % *yield* biodiesel yang terbentuk maka konsentrasi biodiesel yang terbentuk dibandingkan dengan konsentrasi awal substrat. Pengertian % *yield* konsentrasi disini merupakan perbandingan konsentrasi produk terhadap konsentrasi awal substrat trioleat.

Untuk mengetahui % konversi trioleat dan % *yield* untuk masing-masing komponen dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$\% \text{ konversi trioleat} = \frac{C_{T,t=0} - C_{T,t=t}}{C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (\text{B.6})$$

$$\% \text{ yield dioleat} = \frac{2 \times C_{D,t=t}}{3 \times C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (\text{B.7})$$

$$\% \text{ yield mono oleat} = \frac{C_{M,t=t}}{C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (\text{B.8})$$

$$\% \text{ yield biodiesel} = \frac{C_{B,t=t}}{C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (\text{B.9})$$

### LAMPIRAN C

Tabel C. Data HPLC minyak goreng murni

zat	Minyak Goreng murni	
	Luas Area	Konsentrasi mol/l
T	1135503	0,0393
D	176496	0,0138
M	114992	0,0012
F	0	0,0000

### LAMPIRAN D

Tabel D. Perhitungan % *yield* setiap komponen pada sistem batch

4% katalis	Perbandingan mol = 1:12		
	variasi Konsentrasi katalis		
Komponen	3%	6%	9%
3*CT, t=0	0,118	0,118	0,118
2*CD, t=0	0,027	0,027	0,027
CM, t=0	0,001	0,001	0,001
CB, t=0	0,000	0,000	0,000
3*CT, t=t	0,052	0,061	0,048
2*CD, t=t	0,014	0,028	0,044
CM, t=t	0,004	0,010	0,002
CB, t=t	0,076	0,048	0,052
% konversi trigliserida	55,44	48,39	58,99
% <i>Yield</i> digliserida	12,12	23,30	37,10
% <i>Yield</i> monogliserida	3,22	8,46	1,98
% <i>Yield</i> biodiesel	<b>64,52</b>	<b>41,05</b>	<b>44,33</b>
% sisa trigliserida	44,56	51,61	41,01

## LAMPIRAN G

Tabel G. Perhitungan mol balance reaksi batch

3% Lipase Candida Rugosa	t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentra si (mol/l)	%
			T		D		M		F	Balance
	<b>0</b>	<b>1135503</b>	<b>0,0393</b>	<b>176496</b>	<b>0,0138</b>	<b>114992</b>	<b>0,0012</b>	<b>0</b>	<b>0,0000</b>	<b>100,00</b>
	<b>40,00</b>	<b>536547</b>	<b>0,0186</b>	<b>97067</b>	<b>0,0076</b>	<b>372204</b>	<b>0,0040</b>	<b>99762</b>	<b>0,0807</b>	<b>106,03</b>
	40	506013,478	<b>0,0175</b>	91543,16448	<b>0,0072</b>	351022,8192	<b>0,0038</b>	94084,798 9	<b>0,0761</b>	<b>100,00</b>
6% Lipase Candida Rugosa	t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentra si (mol/l)	%
			T		D		M		F	Balance
	<b>45,00</b>	<b>1131494</b>	<b>0,0392</b>	<b>339836</b>	<b>0,0265</b>	<b>1778906</b>	<b>0,0193</b>	<b>115578</b>	<b>0,0935</b>	<b>193,07</b>
	45	586049,82	<b>0,0203</b>	176015,8045	<b>0,0137</b>	921372,5757	<b>0,0100</b>	59862,859 28	<b>0,0484</b>	<b>100,00</b>
9% Lipase Candida Rugosa	t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentra si (mol/l)	%
			T		D		M		F	Balance
	<b>45,00</b>	<b>830695</b>	<b>0,0288</b>	<b>499923</b>	<b>0,0391</b>	<b>385816</b>	<b>0,0042</b>	<b>115318</b>	<b>0,0933</b>	<b>178,40</b>
	45	465649,1537	<b>0,0161</b>	280233,6861	<b>0,0219</b>	216270,5853	<b>0,0023</b>	64641,931 29	<b>0,0523</b>	<b>100,00</b>

## LAMPIRAN E

**Tabel E. Perhitungan mol balance sistem kontinyu**

t (Jam)	Luas Area	Konsentras i (mol/l)	Luas Area	Konsentras i (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentras i (mol/l)	% mol Balance
		Tri Oleat		Di Oleat		Mono Oleat		FAME	
0	1135503	0,03933490	176496	0,01378728	114992	0,00124552	0	0,00000000	100,00
0	1135503	0,03933490	176496	0,01378728	114992	0,00124552	0	0,00000000	100,00
1	582614	0,02018230	203442	0,01589222	95783	0,00103746	102990	0,08334045	120,35
1	484084,328 1	0,01676914	169036,590 1	0,01320458	79584,5091 2	0,00086201	85572,6861 2	0,06924620	100,00
3	572096	0,01981795	196269	0,01533189	105041	0,00113774	82560	0,06680831	107,65
3	531418,005 9	0,01840882	182313,598 8	0,01424174	97572,2234 7	0,00105684	76689,6999 2	0,06205801	100,00
15	560332	0,01941043	176475	0,01378564	530945	0,00575085	79096	0,06400521	105,95
15	528872,121 6	0,01832063	166566,799 1	0,01301165	501135,056 7	0,00542797	74655,1496 7	0,06041163	100,00
30	559420	0,01937884	191398	0,01495138	513205	0,00555870	66028	0,05343046	100,14
30	558645,141 9	0,01935200	191132,892 7	0,01493067	512494,154 7	0,00555100	65936,5439 7	0,05335645	100,00
50	551606	0,01910815	288904	0,02256823	193955	0,00210079	62635	0,05068481	105,74
50	521682,747 8	0,01807158	273231,677 3	0,02134396	183433,424 1	0,00198683	59237,2071 8	0,04793529	100,00

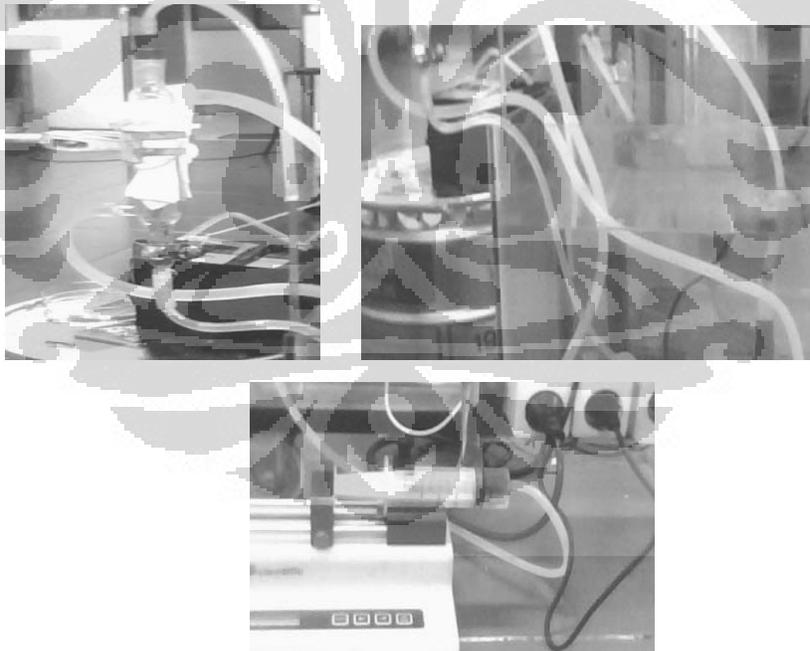
## LAMPIRAN F

Tabel F. Perhitungan % *yield* setiap komponen sistem kontinyu

Konsentrasi enzim = 4% wt	Perbandingan mol =1:12					
	Waktu					
Komponen	0	1	3	5	30	50
3*CT, t=0	0,1180					
2*CD, t=0	0,0276					
CM, t=0	0,0012					
CB, t=0	0,0000					
3*CT, t=t		0,0503	0,0552	0,0550	0,0581	0,0542
2*CD, t=t		0,0264	0,0285	0,0260	0,0299	0,0427
CM, t=t		0,0009	0,0011	0,0054	0,0056	0,0020
CB, t=t		0,0692	0,0621	0,0604	0,0534	0,0479
% konversi trigliserida		57,3683	53,1998	53,4240	50,8020	54,0571
% <i>Yield</i> digliserida		22,3798	24,1376	22,0528	25,3052	36,1748
% <i>Yield</i> monogliserida		0,7305	0,8956	4,5998	4,7041	1,6837
<b>% <i>Yield</i> biodiesel</b>		<b>58,68</b>	<b>52,59</b>	<b>51,19</b>	<b>45,22</b>	<b>40,62</b>
% Sisa Trigliserida		42,63	46,80	46,58	49,20	45,94

**LAMPIRAN G**

**Gambar G.**Reaksi interesterifikasi sistem *batch* pada *shaker batch*.

**LAMPIRAN H**

**Gambar H.**Reaksi interesterifikasi sistem *batch* pada *shaker batch*.

**LAMPIRAN I**  
**Hasil Analisa HPLC**

