



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PRODUKSI LIPASE DENGAN VARIASI
KONSENTRASI SUBSTRAT DAN SUHU MELALUI
FERMENTASI RENDAM *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*
(YUICC422) MENGGUNAKAN *RESPON SURFACE*
*METODOLOGY***

SKRIPSI

ADITYA RINUS PRATAMA PUTRA

080 646 0414

**TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PRODUKSI LIPASE DENGAN VARIASI
KONSENTRASI SUBSTRAT DAN SUHU MELALUI
FERMENTASI RENDAM *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*
(YUICC422) MENGGUNAKAN *RESPON SURFACE*
*METODOLOGY***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana teknik

ADITYA RINUS PRATAMA PUTRA

080 646 0414

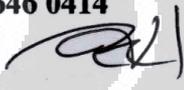
**TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Aditya Rinus Pratama Putra

NPM : 080 646 0414

Tanda Tangan : 

Tanggal : 26 - JUNI - 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Aditya Rinus Pratama Putra
NPM : 0806460414
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : Optimasi Produksi Lipase dengan Variasi
Konsentrasi Substrate dan Suhu pada Fermentasi Rendam *Rhodotorula
mucilaginosa* (YUICC422) menggunakan *Response Surface Methodology*

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

Pembimbing

Pembimbing : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech. ()

Pembimbing : Dr. Siswa Setyahadi M.Sc. ()

Penguji I : Ir. Rita Arbianti M.si ()

Penguji II : Dr. Dianursanti, S.T., M.T ()

Penguji III : Dr. Ir Achmadin Lutfi, M.eng ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 25 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, atas pertolongan dan karunia-Nya. Sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Makalah skripsi yang berjudul “*Optimasi Produksi Lipase dengan Variasi Konsentrasi Substrat dan Suhu pada Fermentasi Rendam Rhodotorula mucilaginosa (YUICC422) menggunakan Response Surface Methodology*” dibuat untuk memenuhi tugas mata kuliah Skripsi, salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

Pada penulisan ini, saya juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- (1) Dr.Ing. Ir. Misri Gozan, M.Eng. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk menuntun saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Dr. Siswa Setyahadi, selaku pembimbing ahli beserta asistennya, bang Ruby, dan bang Kukuh, yang telah menyediakan waktu untuk mengajarkan banyak hal yang tidak saya mengerti dalam topik skripsi ini.
- (3) Ir. Rita Arbianti M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah menyediakan waktu untuk membimbing, mengarahkan, dan memberikan masukan yang membangun kepada saya selama saya kuliah di kampus ini.
- (4) Para dosen Departemen Teknik Kimia FTUI yang telah memberikan ilmu dan wawasannya.
- (5) Ibu Dr. Ariyani Oetari, Dosen FMIPA UI, yang telah memperbolehkan Isolat YUICC 422 digunakan dalam lingkungan LABTIAB BPPT SERPONG Tangerang, dimana penelitian menggunakan Isolat ini, merupakan kelanjutan penelitian yang dilakukan oleh Retra Yoza.
- (6) Orang tua tercinta Ibu dan Bapak, dan Keluarga yang selalu mengalirkan semangat, tak pernah lelah mendidik dan membantu anaknya, dan untuk senyum senyum indah yang telah memberikan dorongan energi setiap harinya adik2 tercinta Kiki, dan Reza.
- (7) Saudara-Saudara satu perjuangan, keluarga PPSDMS Nurul Fikri Angkatan V Jakarta, SPV Tino Gauss, Ilvan, Irfan, Acay, Agung,, dwik dan lain lain,

yang tak pernah berhenti memberikan dukungan setiap waktu selama dua tahun terakhir. Tak akan pernah lupa juga, untuk inspirator yang tak pernah padam semangatnya untuk membangun negeri Ustadz Musholli dan Bang Bakhtiar.

- (8) Untuk murid murid di sekolah informal Master yang selalu mengajarkan, hambatan apapun tidak akan pernah menghalanginya untuk belajar dan berkembang.
- (9) Rekan satu bimbingan: Agung Marssada (teman paralel penelitian), Nadia Chrisayu Natasha, Florensia Inden Stephani, dan Dini Asyifa yang sudah membantu dalam berbagi informasi dan pengetahuan serta pengalaman yang berkaitan dengan penulisan ini, dan
- (10) Sahabat-sahabat dan teman-teman semua yang telah memberikan dukungan sehingga saya bersemangat dan bisa menyelesaikan tugas akhir ini.

Saya menyadari bahwa dalam makalah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, saya mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan skripsi ini dan melaksanakan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan bagi dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan.

Depok, 4 Juni 2012



Aditya Rinus Pratama Putra

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

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

Nama : Aditya Rinus Pratama Putra
NPM : 0806460414
Program Studi : Teknologi Bioproses
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

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

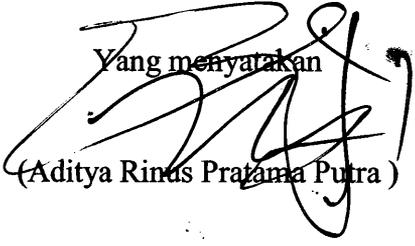
**OPTIMASI PRODUKSI LIPASE DENGAN VARIASI KONSENTRASI
SUBSTRAT DAN SUHU MELALUI FERMENTASI RENDAM
RHODOTORULA MUCILAGINOSA (YUICC422) MENGGUNAKAN
RESPON SURFACE METHODOLOGY**

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

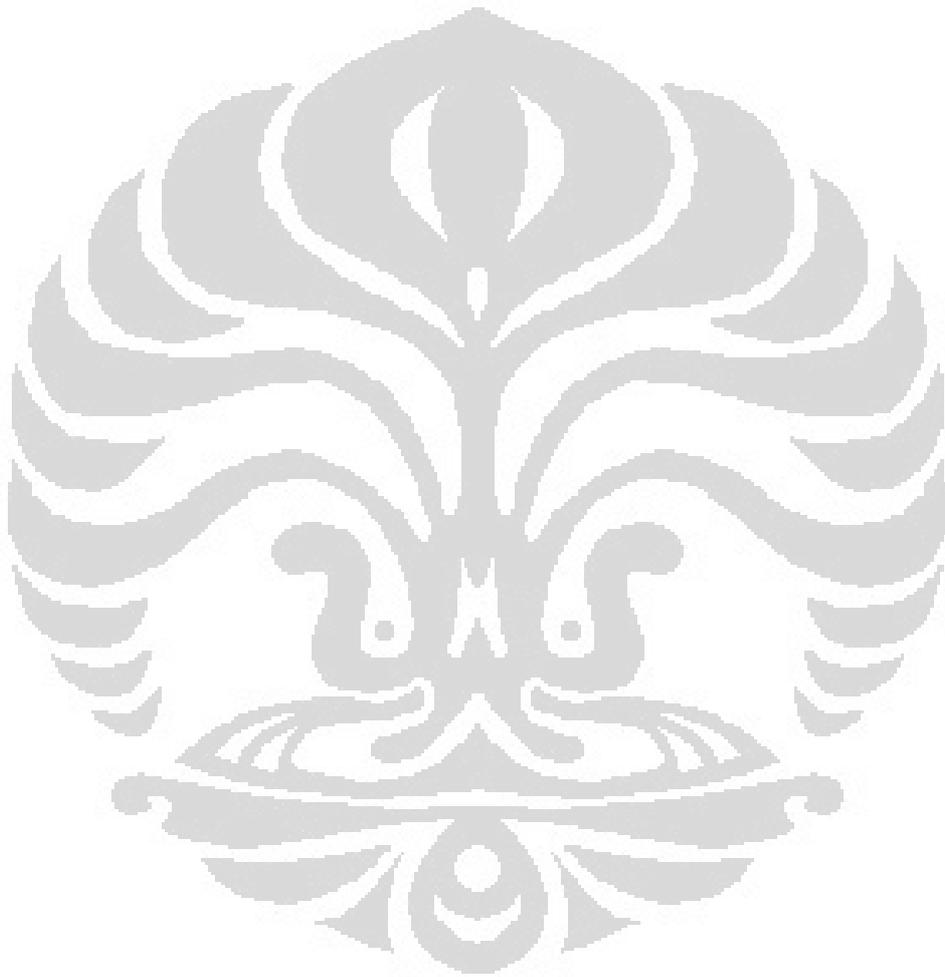
Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 4 Juni 2012

Yang menyatakan

(Aditya Rinus Pratama Putra)

(Aditya Rinus Pratama Putra)



ABSTRAK

Nama : Aditya Rinus Pratama Putra
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Optimasi Produksi Lipase dengan Variasi Konsentrasi Substrat dan Suhu pada Fermentasi Rendam *Rhodotorula mucilaginosa* (YUICC422) menggunakan *Response Surface Methodology*

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum produksi lipase dengan variasi konsentrasi substrat sebagai inducer dan suhu produksi enzim lipase oleh fermentasi rendam *Rhodotorula mucilaginosa* (YUICC422) dengan *Response Surface Methodology*. Selain itu, penelitian ini juga ingin mengetahui potensi minyak jelantah yang banyak didapatkan di daerah laboratorium sebagai pengganti inducer potensial. Sebagai pembanding minyak jelantah digunakan minyak dari palm oil dan minyak zaitun. Diagram penelitian ini terdiri dari 3 langkah besar, yaitu melakukan fermentasi untuk uji konsentrasi substrat dan suhu terbaik menggunakan metode *One Factor at the Time* (OFAT) sebagai acuan untuk pertimbangan desain RSM, kedua fermentasi model RSM, ketiga validasi model RSM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai aktifitas enzim lipase dengan substrat minyak jelantah sebesar 0.051 U/ml. Sedangkan, nilai aktifitas enzim lipase dengan substrat minyak zaitun dan minyak goreng dari palm oil sebesar 0.054 U/ml dan 0.057 U/ml. Konsentrasi substrat terbaik adalah 1.67% dengan suhu produksi enzim 32.92 °C.

Kata kunci :
Lipase, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Response Surface Methodology*, konsentrasi substrat, Suhu.

ABSTRACT

Name : Aditya Putra Pratama Rinus
Study Program: Bioprocess Technology
Title : Optimization of Lipase Production by varying the Substrat
Concentration and Temperature in submerged fermentation
Rhodotorula mucilaginosa (YUICC422) using *Response Surface
Methodology*

This research aims to obtain the optimum conditions for lipase productions by varying the temperature and the concentrations of substrat by submerged fermentations of *Rhodotorula mucilaginosa* (YUICC422) using *Response Surface Methodology*. In addition, this study also wanted to know the potential of “jelantah” oil (reuse palm oil) that we can be found near laboratorium easily. As a benchmark of jelantah oil is used palm oil and olive oil. Flow process of this study consists of three major steps. Firstly, testing the concentrations of substrat and the temperature to look for the optimum number for production lipase with *One Factor at the Time* methods (OFAT) as a consideration fo RSM design. Secondly, Fermentations of RSM models. Thirdly, validations RSM model. The result shows that the activity of lipase enzim with “jelantah” oil is 0.051 U/ml. Although, the activity of lipase enzim with zaitun and palm oil as substrat are 0.054 U/ml and 0.057 U/ml. The optimum condition of this study are substrat concentration 1.67%, Temperature 32.92°C.

Key words:

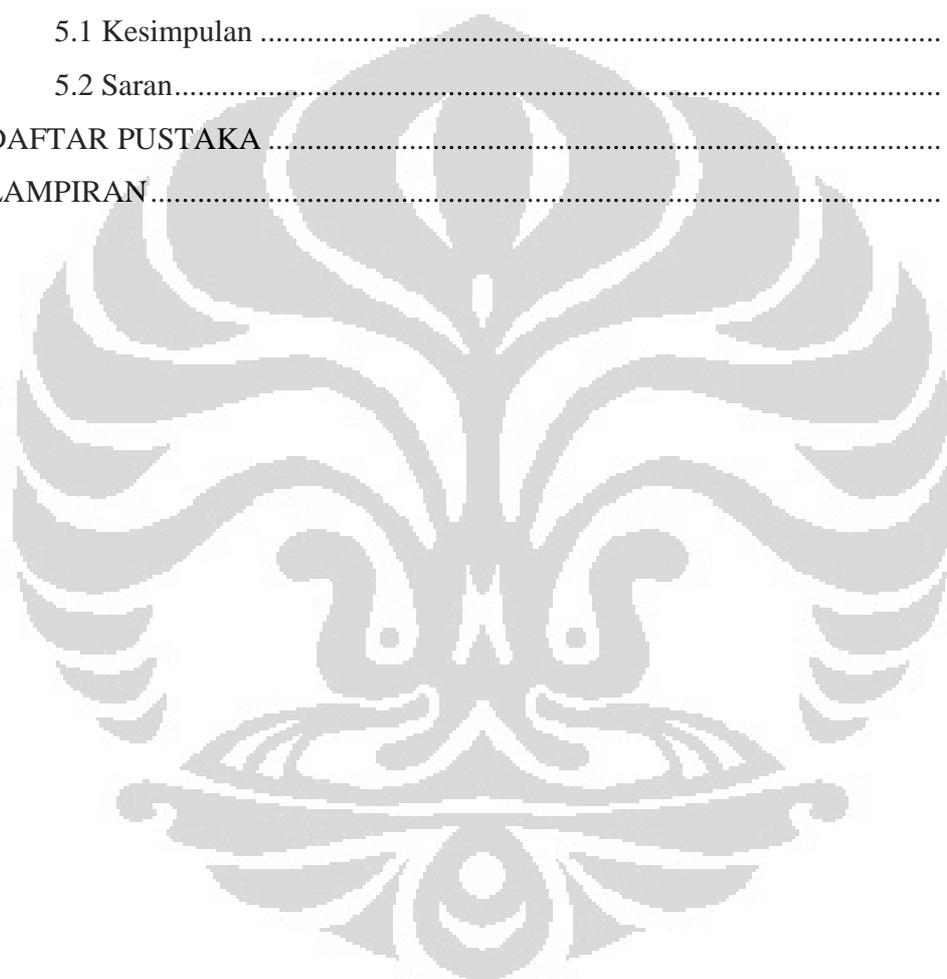
Llipase, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Response Surface Methodology* , substrat concentration, temperature.

DAFTAR ISI

COVER	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PENYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRAC	Viii
DAFTAR ISI.....	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Sistematika Penulisan	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Lipid	6
2.2 Enzim Lipase.....	7
2.3 Yeast.....	9
2.4 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	11
2.5 Fermentasi Lipase dari yeast.....	12
2.6 Pengaruh Konsentrasi substrat dan suhu dalam pertumbuhan yeast	13
2.6.1 Pengaruh suhu	13
2.6.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat (Induser) dalam Fermentasi atau Produksi enzim.....	15
2.7 <i>Respons Surface Methodology</i>	15
2.8 Central Composite Design	17
2.9 <i>One Factor at The Time</i> (OFAT) Design.....	19

2.10 State of The Art.....	20
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Diagram Alir Penelitian	23
3.2 Variable Penelitian.....	27
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.4 Alat dan Bahan.....	27
3.4.1 Alat.....	27
3.4.2 Bahan	29
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	29
3.5.1 Pembuatan Media dan Produksi Enzim	29
3.5.1.1 Peremajaan Isolat	29
3.5.1.2 Pembuatan Isolat	30
3.5.1.3 Pembuatan Starter	30
3.5.1.4 Fermentasi untuk Produksi Lipase	30
3.5.1.5 Panen dan Penyiapan Ekstrak Kasar lipase.....	31
3.5.2 Uji Pendahuluan dengan metode OFAT	31
3.5.2.1 Penentuan Konsentrasi Substrat (Induser)	31
3.5.2.2 Uji Pendahuluan Optimasi Suhu	31
3.5.2.3 Uji Pendahuluan Konsentrasi Substrat (Induser)	32
3.5.2.4 Optimasi dengan <i>Response Surface Method</i> (RSM).....	32
3.5.2.5 Melakukan Uji Optimasi Desain RSM	33
3.5.3 Pengujian Aktifitas Enzim Lipas dan Kadar Protein	32
3.5.3.1 Metode Uji Lipase.....	32
3.5.3.2 Pengaruh Kadar Protein	34
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Penentuan Substat Terbaik.....	36
4.2 Penentuan Suhu Optimasi	38
4.3 Uji Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum	42
4.4 Penentuan Desain <i>Response Surface Methodology</i>	43
4.4.1 Uji Pemilihan Model Berdasarkan <i>Sequential Model Sum of</i>	

<i>square</i>	46
4.4.2 Uji Pemilihan Model Berdasarkan <i>Lack of Fit</i>	46
4.4.3 Uji Pemilihan Model Berdasarkan <i>R Squared</i>	47
4.4.4 Uji ANOVA	48
4.5 Validasi Model.....	51
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Reaksi hidrolisi trigliserida oleh lipase	8
Gambar 2 Overview aplikasi <i>yeast</i>	9
Gambar 3 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> a) koloni tunggal b) perbesaran 100x. 12	
Gambar 4 Pengaruh temperature pada laju pertumbuhan mikroba.....	14
Gambar 5 Pengaruh produksi hydrogen kehadiran konsentrasi glukosa	15
Gambar 6 Rancang CCD.....	18
Gambar 7 Contoh permukaan RSM berbentuk 3 D.....	19
Gambar 8 Contoh respok permukaan RSM berbentuk counter	19
Gambar 9 Diagram alir penelitian.....	23
Gambar 10 Pengaruh suhu pada aktifitas lipase substrat minyak goreng.....	39
Gambar 11(a)Aktifitas lipase varisiasi suhu dengan variasi minyak..... dan (b) aktifitas spesifik variasi suhu dan minyak.....	40
Gambar 12 Pengaruh suhu terhadap konsentrasi protein.....	41
Gambar 13 Pengaruh konsenstrasi substrat terhadap aktifitas lipase.....	42
Gambar 14 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kadar protein	43
Gambar 15 Interaksi konsentrasi substrat dengan suhu untuk mendapatkan aktiftas maksimum pada produksi lipase bentuk counter	50
Gambar 16. Interaksi konsentrasi substrat dengan suhu untuk mendapatkan aktiftas maksimum pada produksi lipase bentuk 3D	51

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Aplikasi pasar lipase	7
Tabel 2 yeast penghasil lipase.....	10
Tabel 3 State of the Art	22
Tabel 4 Penentuan desain Eksperimen CCD	26
Tabel 5 Matriks eksperimen RSM	27
Tabel 6 Rancangan kurva kalibrasi aktifitas	34
Tabel 7 Rancangan kurva standar BSA	35
Tabel 8 Perbandingan pada uji aktifitas dengan variasi substrat	37
Tabel 9 Rancangan batas bawah dan batas atas desain.....	45
Tabel 10 Desain running fermentasi RSM dan hasilnya	45
Tabel 11 Analisis <i>Sequential Model sum of Square</i>	46
Tabel 12 <i>Lack of fit</i>	47
Tabel 13 Model Summary Statistic.....	47
Tabel 14 ANNOVA Model produksi lipase.....	48
Tabel 15 Nilai Kekarutan Desain.....	49
Tabel 16 Optimasi yang dilakukan oleh RSM.....	51
Tabel 17 Validasi Model RSM	52

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan poli makromolekul protein yang mampu mengkatalis suatu reaksi biologis dengan cara menurunkan energi aktivasi suatu reaksi. Enzim bekerja spesifik dalam mengkatalis suatu reaksi. Perkembangan teknologi enzim sangat pesat dalam kurun waktu dua abad terakhir. Pada tahun 1814, Kirchoff menemukan protein yang mampu membantu mengonversi *starch* menjadi gula. Pada tahun 1833, Payen dan Perzoz menemukan adanya senyawa dalam ekstrak gandum yang dapat menghidrolisis karbohidrat. Pada rentang tahun awal 1900-an hingga 1970-an mulai banyak teori-teori tentang kinetika enzim. Perkembangan yang sangat pesat ini membuktikan bahwa peran enzim sangat penting bagi kehidupan manusia. Hal ini juga dapat dilihat pada abad ke-20 ini, telah banyak industri yang memproduksi dan memanfaatkan enzim dari mikroorganisme yang disolasi.

Salah satu enzim yang sering digunakan di dunia industri adalah enzim Lipase (EC.3.1.1.3). Enzim ini berperan penting dalam mengkatalis reaksi hidrolisis minyak dan lemak untuk membentuk rantai panjang FFA dan gliserol. Enzim lipase pada umumnya memiliki sebuah titik tegan berupa ikatan β Sheat dan gugus aktif yang terdiri dari serine, histidine dan grup karboksil (Gromada et all, 2005) . Oleh karena itu, lipase sering disebut juga serine hidrolase.

Penggunaan enzim lipase telah berkembang pesat di Industri. Hal ini dikarenakan lipase tidak hanya mampu mengkatalis reaksi hidrolisis rantai ester melalui reaksi esterifikasi, melainkan juga dapat mengkatalis sintesis ikatan ester pada reaksi transesterifikasi di media *non aqeous* (Hamond,1987). Penggunaan lipase sebagai biokatalis sejak 1980 telah dilakukan (Srivinas et all, 2002). Lipase juga telah diteliti di industri pengolahan limbah (Jeager et all, 1999). Lipase juga digunakan pada industri detergent (Vakhlu, 2006). Berdasarkan kekhasanya *region* dan stereospesifiknya, lipase dapat diaplikasikan pada reaksi sintesis obat-obatan pada industri farmasi, membantu memodifikasi lemak dan minyak serta perubahan

rasa makanan dari senyawa ester pada industri makanan. (Akoh,2006; Franken, 2009).

Lipase dihasilkan hampir disuluruh tubuh makhluk hidup. Lipase dari hewan didapatkan dari pankreas. Lipase dari tanaman biasa didapatkan dari pepaya, biji gandum ataupun biji *castor*. Lipase yang berasal dari hewan memiliki kelemahan, tidak dapat mengkatalis senyawa yang berasal dari tanaman. Hal ini dikarenakan ekstrak lipase dari hewan, pada umumnya mengandung tripsin yang beraksi dengan protein. Di industri, lipase lebih banyak digunakan berasal dari mikroorganisme. Diantara banyak golongan mikroorganisme yang mampu menghasilkan lipase, yang paling baik menghasilkan lipase adalah mikroorganisme dari golongan *yeast*. Hal ini dikarenakan murah substratnya dan menghasilkan *yield* yang besar, serta mudah ditingkatkan hasil produksinya melalui berbagai macam rekayasa (Retra,2009).

Produksi enzim lipase dari mikroorganisme terutama *yeast* telah banyak diteliti. *Yeast* yang paling terkenal untuk memproduksi lipase adalah dari keluarga *Saccharomycetaceae* (Paskevicius, 2001). Selain itu, masih banyak lagi *yeast* yang dapat menghasilkan lipase antara lain, *Rhodotorula rubra* atau nama lainnya *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta*, *candida lipolytica*, *candida prapsilosi*, *candida valida*, *Debarymyces vanriji*, *geotrichum fermentans* (Paskevicius, 2001), *Candidia Rugosa* (Bales et all, 1998 ; Jyoti, 2006), *Candida silvicola NRRL YB -2846* (Hou, 1997), *Penicillium chrysogenum* (Ferrer, 2000), *Basidiomycete Bjerkandera adusta R59* (Bancarz,2007).

Seiring perkembangan penelitian enzim lipase, penelitian tentang optimasi enzim lipase juga telah banyak diteliti dengan berbagai metode. Metode yang paling sering dilakukan untuk penelitian optimasi enzim, pada umumnya menggunakan metode *One Factor at the time (OFAT)*. Metode ini mengasumsikan semua parameter penting yang mempengaruhi produksi enzim dibuat tetap pada satu nilai, ketika salah satu parameter divariasikan. Selain itu, salah satu metode lain untuk optimasi produksi enzim lipase yang juga pernah dilakukan adalah metode *Respons Surface Methodology (RSM)*. Salah satu ciri khas metode RSM, yaitu mampu melihat interaksi antar parameter, sehingga RSM dapat bervariasikan semua parameter

bersamaan. Kemampuan RSM dalam mengoptimasi berbagai macam variable secara bersamaan dan meninjau interaksi antar variable yang divariasikan, membuat optimasi menggunakan RSM menjadi lebih baik, lebih cepat dan lebih komperhensif dibandingkan menggunakan OFAT. Penelitian optimasi produksi lipase menggunakan RSM ini pernah dilakukan menggunakan berbagai jenis mikroorganisme antara lain, *Bacillus sp* (Hameed, 2001), *Rhizopus homothallicus* (Rogriguez et all,2006), *Geoacillus sp* (Ebrahimpour, 2008), *Colletotrichum gleosporiodes* (balaji,2008), *Arthrobacter sp* (Sharma, 2009), *Staphylococcus* (Pogaku, 2010), *Aspergilus Carneus* (Kushik, 2010), *Gunederma Lucidium* (Amin, 2011).

Salah satu spesies *yeast* yang potensial menghasilkan enzim lipase adalah *yeast* dari kultur koleksi Universitas Indonesia (YUICC) nomer 422. *Yeast* ini merupakan spesies *Rhodotorula mucilaginosa* (Retra, 2009). Untuk menghasilkan lipase dari spesies ini menggunakan fermentasi rendam (Potumarthi et al. ,2008) . Ciri khas dari fermentasi ini adalah mikroba berada di bawah air dan dapat bergerak bebas di medium pertumbuhan. Retra pada tahun 2009 telah telah mengoptimasi faktor-faktor produksi lipase dan membuktikan waktu inkubasi produksi, suhu dan pH optimumnya adalah 72 jam, 30⁰C dan 6 serta indusernya terbaiknya adalah 2% tributirin dan sumber nitrogennya 1% ammonium sulfat. Retra juga telah mengkarakterisasi pH, suhu, termostabil ,dan waktu inkubasi optimum,serta pengaruh ion logam, untuk mendapatkan enzim lipase dengan aktiftias terbaik yang dihasilkan *Rhodotorula mucilaginosa*. Retra juga telah memurnikan lipase dari *yeast* ini serta menerapkanya pada sintesis metal ester.

Penelitian ini pada dasarnya melanjutkan penelitan Retra. Pada 2009, Retra telah melakukan optimasi menggunakan cara *One factor at the time (OFAT)*, dimana semua faktor dibuat tetap ketika satu faktor divariasikan. Sementara penulis lakukan adalah optimasi tentang kondisi interaksi terbaik dari parameter suhu dan konsenstrasi induser untuk menghasilkan aktifitas lipase yang paling tinggi dengan metode *Respon Surface Methodology*. Kelebihan metode ini dibandingkan metode lain, karena metode ini mempertimbangkan interaksi dari berbagai variabel penting

yang mempengaruhi proses. *Respon surface methodology* sendiri memiliki dua rancangan desain yaitu *Central composite design* dan *box bhenken design* yang dapat digunakan bergantung kondisi data. *Retra* telah mengoptimasi suhu produksi dengan metode OFAT dan belum mengoptimasi konsentrasi optimum dari induser. Pada penelitian ini, penulis melakukan dua hal, yaitu mengoptimasi produksi lipase dengan variasi konsentrasi substrat atau induser dan suhu dengan *desain central composite* dan mengidentifikasi potensi minyak jelantah yang merupakan limbah sebagai induser pengganti berdasarkan aktifitas enzim dan kadar proteinnya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah dari penelitian ini adalah

1. Bagaimana potensi minyak jelantah dibandingkan minyak kelapa sawit, minyak zaitun sebagai induser produksi lipase?
2. Bagaimana interaksi antara konsentrasi induser atau substrat dengan suhu untuk mendapatkan aktifitas lipase tertinggi, pada produksi lipase, dengan fermentasi rendam *Rhodotorula mucilaginosa*?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas, tujuan dari penelitian ini adalah

1. Menentukan nilai aktifitas dan kadar protein dari interaksi konsentrasi induser dan suhu terbaik agar produksi lipase dari fermentasi rendam *Rhodotorula mucilaginosa* optimum, menggunakan *Respon Surface Methodology (RSM)*.
2. Menentukan potensi minyak jelantah sebagai induser dibandingkan minyak kelapa sawit dan zaitun, berdasarkan aktifitas enzim lipase yang diproduksi oleh *Rhodotorula mucilaginosa* dengan substrat atau induser dari minyak jelantah, minyak zaitun dan minyak kelapa sawit.

1.4 Batasan Masalah

Pada pemilihan induser terbaik, penelitian ini hanya menggunakan kandidiat induser, minyak jelantah, minyak kelapa sawit, dan minyak zaitun. *Rhodotorula mucilaginosa* didapatkan dari koleksi *culture* BPPT serpong yang merupakan *yeast UI culture collections* yang diisolasi dari limbah yang mengandung minyak. Produksi enzim lipase ini dilakukan pada skala laboratorium dengan volum produksi 50 mL. Penelitian dilakukan di Puspiptek Serpong, Provinsi Banten.

1.5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan adalah sebagai berikut:

Bab I Pendahuluan

Pada bab pendahuluan ini terdiri atas latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

Bab II Tinjauan Pustaka

Tinjauan pustaka berisikan ulasan mengenai Lipid, Lipase, *Yeast, Rhodotorula mucilaginosa* (*YUICC422*), *Response Surface Methodology*.

Bab III Metode Penelitian

Pada bab ini berisi tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan yang digunakan, prosedur penelitian, lokasi penelitian.

Bab IV Hasil dan Pembahasan

Pada bab ini berisi penjelasan hasil eksperimen dan analisis hasil eksperimen

Bab V Kesimpulan dan Saran

Berisi Kesimpulan akhir penelitian dan saran untuk penelitian lanjutan yang dilakukan terkait hasil penelitian sekarang

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lipid

Lipid merupakan senyawa non polar atau hidrofobik, sehingga tidak larut dalam pelarut polar. Lipid merupakan salah satu sumber energi di dalam tubuh makhluk hidup, dan juga berperan penting dalam pembentukan sel. Lipid pada umumnya di dominasi oleh dua jenis gugus yaitu, gugus ketoasil dan gugus isoprena (Brown, et all, 2005). Lipid yang diturunkan dari kondensasi subsatuan ketoasil dibagi menjadi enam kelompok antara lain, *fatty acid*, gliserollipid, gliserofosfolipid, sfingolipid, sakarolipid, dan poliketida. Sedangkan lipid yang diturunkan dari kondensasi subsatuan isoprena dibagi menjadi dua kelompok kelompok sterol, dan kelompok lipid prenol .

Perkembangan industri lipid di eropa dimulai sekitar dua abad lalu. Penggunaan lipid di industri sabun dimulai sejak penemuan proses pembuatan soda oleh French N blank pada tahun 1791. Kemudian pada tahun 1902, Normann menemukan lipid jenis asam stearat (*fat hardening*) oleh proses augmentasi katalik hydrogen dengan katalis nikel (Birgit,2006). Sejak saat itu industri lipid di Eropa mulai memasuki babak baru. Pada tahun 1991, produksi asam lemak mencapai 2,5 juta ton di Eropa, dimana 40% berasal dari bahan alam. Seiring semakin besarnya penggunaan lipid dari alam, maka penggunaan enzim lipase sebagai enzim yang mampu mengkatalis reaksi-reaksi lipid pun berkembang pesat. Pada tahun 1996, penggunaan lipase dari *candida rugosa* mulai ramai diperbincangkan. Hal ini dikarenakan lipase yang dihasilkan *candida rugosa* pada umumnya menghasilkan aktifitas enzim lipase yang cukup tinggi dibandingkan dengan mikroba lainnya. (Redondo et al.1 995). Pada perkembangannya asam lemak dari tanaman, biasa digunakan untuk pembuatan sabun, pelumas, senyawa ester, ethoxylat, surfaktan, kosmetik, resin alkil, polyamine, plastic, kertas, ataupun dunia farmasi. (Ahmed and Morris 1994). Berikut beberapa potensi perkembangan produk turunan lipid.

Tabel 1. Aplikasi Pasar lipase (sumber : Handbook of Enzyme)

Jenis pasar	Konsumsi Total (1998) (k ton)	Konsumsi pasar dari bahan alam	Potensi Pasar dari Bahan Alam	Potensi Pasar 2010 (%)
Polymer	33000	25	500	1.5
lubricant	42400	100	200	5
Solvent	4000	60	235	12.5
surfactan	2260	1180	1450	52

2.2 Enzim Lipase

Enzim merupakan suatu poliprotein kompleks berukuran sekitar 1000-2000000 gram/mole, yang mampu mengkatalis suatu reaksi biologis secara spesifik dengan cara menurunkan energi aktifasinya. Enzim memiliki sisi aktif yang hanya dapat menerima substrat tertentu secara spesifik. Setiap enzim mengkatalis satu reaksi kimia pada substrat kimia tertentu dengan enantioselektivitas sangat tinggi dan enantiospecificity dengan harga yang mendekati kesempurnaan katalitik (Bugg, 2004). Dengan demikian, enzim berfungsi efektif menurunkan energi aktifitas dari suatu biosintesis. Berdasarkan jenis reaksinya, enzim dibagi menjadi enam golongan yaitu, enzim oxidoreduktase (EC1), enzim transferase (EC2), enzim hidrolase (EC3), enzim liase (EC4), isomerase (EC5), enzim ligase (EC6).

Lipase sendiri merupakan salah satu enzim dari golongan enzim hidrolisis (E.C.3.1.1.3). Sesuai dengan penamaanya, lipase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis lipid menjadi asam lemak dan gliserol dengan adanya air. Lipase juga dapat didefinisikan sebagai enzim karboksil esterase yang mengkatalis reaksi hidrolisis dari rantai panjang asil gliserol menjadi gliserol, asam lemak, mono dan digliserida. Selain mampu mengkatalis reaksi hidrolisis, lipase juga dapat mengkatalis reaksi esterifikasi dan transesterifikasi (Palmeros B., 1994). Dilaporkan juga lipase dapat mengkatalis reaksi inter-esterifikasi, alkoholisis, acidolisis, aminolisis. Lipase merupakan enzim yang larut dalam air dan dapat berkerja dalam emulsi minyak dan air. Berikut reaksi hidrolisis trigliserida



Gambar 1. Reaksi hidrolisis trigliserida oleh lipase (Berg et al, 2006)

Seperti halnya enzim pada umumnya, lipase memiliki sisi aktif spesifik pada struktur tersiernya, dimana sisi polar berinteraksi dengan larutan dan sisi non polar yang masuk ke dalam. Secara reaksi biokimia, lipase ini diklasifikasikan menjadi enzim serine hydrolase karena gugus serine menjadi bagian penting dari sisi aktif enzim (Antonian, 1988). Berbeda dengan enzim pada umumnya, reaksi lipase lebih kompleks karena substratnya (lipid) tidak larut di dalam air. Oleh karena itu perlu dilakukan beberapa teknik untuk menciptakan permukaan interaksi antara lipase dengan reaksi yang dikatalisnya. Salah satu hal yang biasa dilakukan dengan adsorpsi enzim ke suatu permukaan tertentu.

Lipase dapat ditemukan secara luas di dalam seluruh organisme hidup baik secara intraseluler maupun ekstraseluler (Ibrahim, et all 1987). Lipase dapat ditemukan di beberapa mikroba antara lain, *Aspergillus niger*, *bacillus thermoleovorans*, *candida cylindracea*, *candida rugosa*, *chromobacterium viscosum*, *geotrichum candidum*, *fusarium heterosporum*, *fusarium oxysporum*, *humicola lanuginose*, *mucor miehei*, *oospora lactis*, *penicillium cyclopium*, *penicillium roqueforti*, *pseudomonas aeruginosa*, *pseudomonas cepacia*, *pseudomonas fluorescens*, *pseudomona putida*, *rhizopus putida*, *rhizopus arrhizus*, *rhizopus boreas*, *rhizopus thermosus*, *rhizopus usarii*, *rhisopus stolonifer*, *rhizopus fusiformis*, *rhizopus circinans*, *rhizopus delemar*, *rhizopus chinensis*, *rhizopus japonicus* NR 400. Selain itu, Lipase juga dapat dihasilkan oleh hewan, biasanya berasal dari lipase pankreas. Lipase dari tanaman biasa didapatkan dari papaya biji gandum ataupun biji

castor. Kelemahan lipase dari hewan adalah lipasenya tidak dapat digunakan untuk memproses senyawa dari tanaman, karena ekstrak lipase dari hewan mengandung tripsin yang beraksi dengan protein. Lipase dari *yeast* dan mikroba serta dari hewan ini sangat luas digunakan untuk industri, berbeda dengan penggunaan lipase yang dari tanaman yang sangat sedikit dieksplorasi.

2.3 *Yeast*

Yeast telah digunakan sejak ribuan tahun yang lalu. Pada tahun 400-1000 SM ditemukan proses fermentasi beer (Demainin and Solomon 1981). Pada tahun 3000 SM di Mesopotamia juga ditemukan beer dari *yeast* (Corran 1975). Saat ini, sekitar 100 golongan *yeast* dan lebih dari 700 spesies *yeast* telah diteliti (Kurtzman and Fell 1998). *Yeast* merupakan mikroorganisme uniseluler yang secara khas bereproduksi secara vegetatif dengan cara fisi dan *budding*, ataupun kombinasi dari keduanya. *Yeast* digolongkan ke dalam grup *fungi*. Dalam dua puluh tahun terakhir eksploitasi *yeast* untuk industri berkembang sangat pesat (Van Djiken, 2001). Ilmu terbaru tentang *yeast* membahas tentang psikologi *yeast* (Walker, 2008). Ilmu ini membahas kemampuan *yeast* di dalam dunia aplikasi untuk dapat beradaptasi dengan lingkungan seperti tingkah laku *yeast* selama masa pertumbuhan dalam skala industri di dalam fermentor.

Yeast lebih mudah diamati dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya. *Yeast* memiliki ukuran yang lebih besar dan morfologi yang berbeda dibandingkan bakteri. *Yeast* juga memiliki dinding yang lebih kuat dibandingkan dengan protozoa. *Yeast* tidak melakukan fotosintesis seperti halnya mikroalga. *Yeast* memiliki kemampuan memecah bahan kimia jauh lebih baik dibandingkan dengan kapang. *Yeast* berbentuk sferikal hingga mendekati *ovoid*.

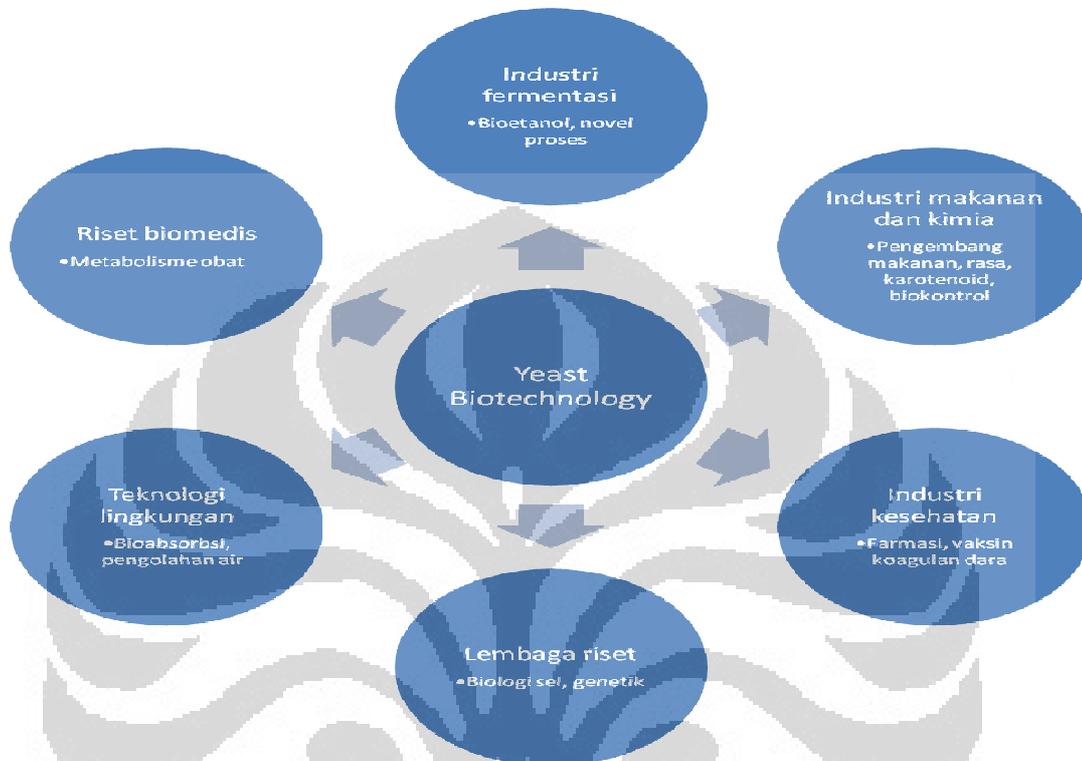
Yeast lebih tahan dibandingkan bakteri dalam larutan gula ataupun larutan garam yang lebih pekat. *Yeast* juga lebih menyukai adanya asam dan oksigen dibandingkan dengan bakteri. *Yeast* resisten dengan penambahan antibiotik dan antibakteri. *Yeast* dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan kapang.

Hampir 50% lebih mikroba penghasil lipase berasal dari *yeast* (Afnet Kour, 2006). Sebagian besar lipase dari *yeast* merupakan ekstraseluler, monomerik glikoproteins dengan Mr sekitar 33-64 kD. *Yeast* yang paling sering digunakan untuk memproduksi lipase secara komersial adalah *yeast candida rugosa* (Jyoti, 2006). Hal ini dikarenakan *candida rugosa* memiliki tingkat aktifitas yang tinggi baik untuk reaksi hidrolisis ataupun sintesis. Berikut beberapa *yeast* penghasil lipase.

Tabel 2 *Yeast* penghasil lipase, (sumber : Jyoti 2006)

Sumber	Lokasi Cellular	Reference
Arxulaadeninivorans	Ekstraseluler	Boer et all 2005
Candida Antarctica	Ekstraseluler	heeg et al 1995 oignede et all 2001
Candida parapasilosis CBS 604	cell bound	neugnot et al 2002
Candida rugosa	Ekstraseluler	broca et al 1995 pandev 2001 gibbbs 1989
Candida deformans	Ekstraseluler	bigey et al 2003
Geotrichum asteroid	Ekstraseluler	kazanina et al 1981
Kurtzmanonyces sp	Ekstraseluler	kakugawa et al 2002
Saccharomyces cerevicaie	Ekstraseluler	oishi et al 199
Yerrowia lipolytoa	cell bond	ota et al 1982 destain et al 1997
Trichosporona steroide	Ekstraseluler	dhashiti, amaranond

Saat ini *yeast* telah sangat berkembang dengan pesat. Berikut aplikasi penggunaan *yeast*,



Gambar 2. Overview aplikasi *yeast*

Sumber : (walker, 1998)

2.4 *Rhodoturula mucilaginosa*

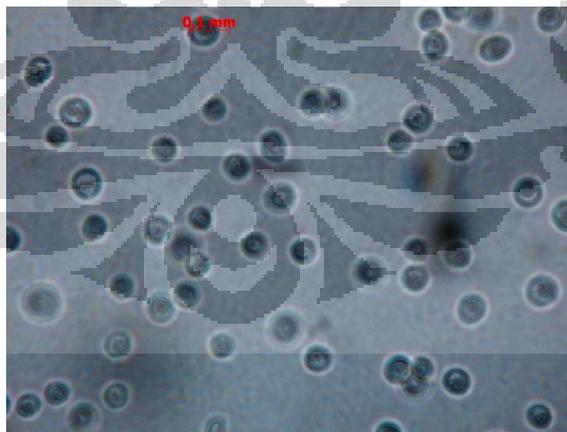
Rhodoturula merupakan *yeast* berpigmen. *Yeast* ini biasanya berwarna orange hingga kemerah-merahan di dalam koloni. Media pertumbuhan biasanya agar dextrosa. Pigmen ini membantu sel lebih tahan rusak oleh panjang gelombang tertentu, karena dibelokkan oleh panjang gelombang warna tersebut. *Rhodoturula* sangat mudah ditemukan di lingkungan sekitar, seperti tanah, air dan udara. Karena *yeast* ini mampu hidup di lingkungan sekitar, maka termasuk dalam golongan misofil, yaitu mikroorganisme yang dapat tumbuh di suhu sekitar 27 °C -37 °C.

Salah satu spesies dari genus *Rhodoturula* ini adalah *Rhodoturula mucilaginosa*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Retra pada tahun 2009,

fermentasi *Rhodotorula mucilaginosa* didalam media agar dextrosa, mampu menghasilkan enzim lipase, dengan waktu produksi lipase optimum 72 jam, dengan aktifitas 3.44 U/ml, dengan pH produksi optimum produksi 6, dan suhu produksi optimum sekitar 30 °C. Pada tepung jagung setelah 72 jam inkubasi pada 25 ° C, ukuran yeast ini sekitar 2,5-10 m (Kurtzman,2000)

Retra pada tahun 2009 juga mengkarakteristikan enzim lipase tersebut,dan membuktikan bahwa *Rhodotorula mucilaginosa* tidak tahan terhadap kondisi yang terlalu asam dan basa. Hal ini terlihat dari aktifitasnya meningkat pada penambahan buffer phospat dengan pH 8. Retra juga membuktikan aktifitas enzim lipase dari *R. mucilaginosa* meningkat dengan penambahan logam MgCl₂, CaCl₂, Cu, KCl, dan MnCl₂, dan terhambat aktifitasnya dengan penambahan logam BaCl₂ dan ZnCl₂.

Kingdom	:Fungi
Phylum	:Basidiomycota
Class	:Urediniomycetes
Order	:Sporidiales
Family	:Sporidiobolaceae
Genus	:Rhodotorula
Spesies	:R. Mucilagalosa



Gambar 3 *Rhodotorula mucilaginosa* perbesaran 100x
(sumber : Penulis)

2.5 Fermentasi Lipase dari *Yeast*

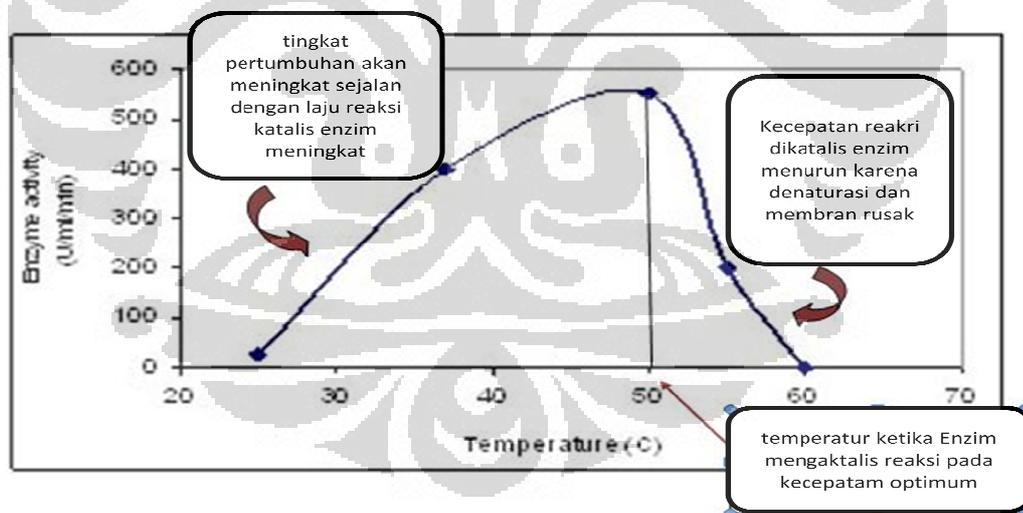
Produksi lipase dengan *yeast* dilakukan dengan cara fermentasi. Fermentasi sendiri berasal dari kata Yunani yaitu *fervere* yang berarti mendidih. Fermentasi merupakan proses menghasilkan energi dari berbagai senyawa organik oleh mikroorganisme dengan bantuan enzim. Dalam fermentasi lipase dari *yeast* sangat bergantung pada siklus pertumbuhan dan keadaan optimum aktifitas *yeast* itu sendiri. Agar fermentasi dalam keadaan optimum perlu dilakukan pengontrolan kondisi suhu, pH dan lama dari fermentasi. Pada umumnya fermentasi *yeast* membutuhkan waktu sekitar 2-5 hari, pH sekitar 4-8 dan dengan rentang suhu bergantung jenis spesies *yeast*-nya. Fermentasi *Rhodototula mucilaginosa* membutuhkan waktu optimum fermentasi 72 jam atau 3 hari, pada suhu 30 °C dan pH 6 (Retra, 2009). Pada *Bacillus sp* kondisi optimum fermentasi untuk menghasilkan lipase dengan fermentasi selama 64 jam, pH 6 dan suhu 30 °C (Ertugrul, et al 2007). *Penicillium caryogenum* 9 dari tanah di kawasan artik tundra membutuhkan waktu fermentasi optimum 5 hari pada suhu 20 °C dan pH 6 (Bacerz et al, 2005). *Yeast* jenis *Arxulaa deninivorans*, memiliki pH optimum 7.5 dan suhu optimum 30 °C (Booer et al, 2005). Genus *Rhodotorula* dengan spesies *R. Glutinis* memiliki suhu optimum 35 °C, pH 7.5 dan waktu fermentasi 5 hari (Papapareskevas, 1992).

Dalam fermentasi *yeast*, selain kondisi optimum seperti dijelaskan di atas juga perlu mempertimbangkan komposisi medium pertumbuhan *yeast* itu sendiri. Medium pertumbuhan biasanya mengandung unsur, karbon, nitrogen, dan berbagai nutrisi untuk *yeast* tumbuh dengan baik. Nitrogen dapat didapatkan dari urea, ekstrak *yeast*, tryptone, peptone, *corn steep liquor*, kasein, ammonium sulfat, ammonium fosfat, ammonium nitrat ataupun ammonium klorida (Papapareskevas, 1992). Karbohidrat merupakan salah satu sumber karbon terbaik dalam produksi lipase (Hahas, 1988). Namun, sumber karbon ini bisa juga digunakan dari kelompok minyak, seperti minyak zaitun, sawit, kedelai, kelapa (Sharma et al, 2001).

2.6 Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Suhu dalam Pertumbuhan *Yeast*.

2.6.1 Pengaruh Suhu

Pertumbuhan mikroba sangat bergantung dengan suhu. Hal ini berkaitan dengan kemampuan mikroorganisme untuk bertahan dan beraktifitas maksimum pada kondisi tertentu. Untuk mikroorganisme yang dapat hidup dalam rentang 15°C - 25°C dikelompokkan pada kelompok *psychophiles*. Mikroorganisme dari kelompok *mesophiles* dapat tumbuh optimum pada suhu 20°C - 45°C . Kelompok *mesophiles* inilah yang paling memiliki banyak anggota, karena pada umumnya mikroorganisme hidup pada suhu ini. Namun, ada juga mikroorganisme kelompok *thermophiles* yang dapat tumbuh hingga suhu 45°C - 80°C dan optimum pada suhu 50°C - 65°C . Selain kedua kelompok tersebut, ternyata mikroba ada juga yang dapat hidup dalam kondisi-kondisi ekstrim contohnya kelompok ekstrim *thermophiles* memiliki tolerasnsi suhu hingga 100°C dan kelompok *obligate psychophiles* yang mampu hidup pada rentang suhu 0°C - 15°C . Berikut gambar profil pertumbuhan mikroba dengan perubahan suhu.



Gambar 4. Pengaruh temperatur pada laju pertumbuhan mikroba.

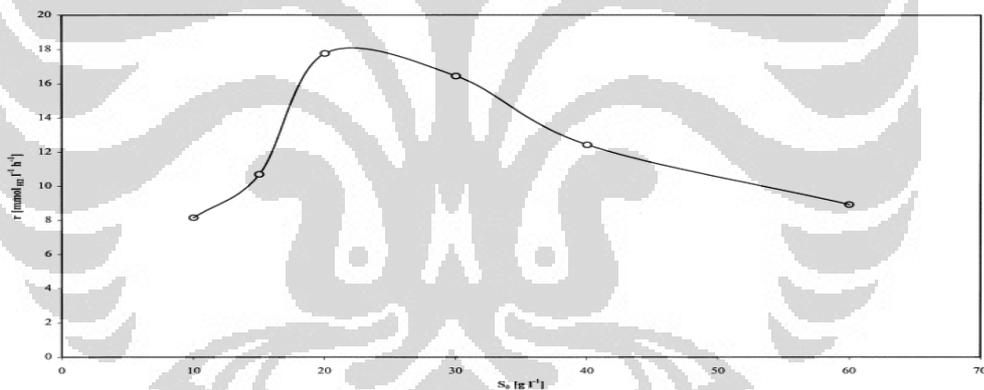
(Sumber : <http://www.microbiologylabs.info/wp-content/uploads/2011/10/Enzyme-activity-and-Temperature-grapg.jpg>)

Pertumbuhan mikroba pada suhu rendah, dikarenakan enzim tidak bekerja secara optimum. Lipid pada kondisi ini, cenderung mengeras dengan demikian

kehilangan fluiditas membrane. Laju pertumbuhan mikroba akan terus meningkat hingga suhu optimum dicapai. Bioreaksi akan semakin cepat dengan meningkatnya suhu. Namun, setelah melewati suhu optimum pertumbuhan bakteri semakin menurun, dikarenakan enzim dan protein di dalam tubuh mikroba mulai mengalami denaturasi dan mengakibatkan laju bioreaksi semakin lambat.

2.6.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat (Induser) dalam fermentasi atau Produksi Enzim

Konsentrasi substrat atau inducer mempengaruhi proses fermentasi. Karena konsentrasi substrat dapat mempengaruhi terlepasnya membran plasma dari dinding sel ke lingkungannya serta sifat substrat yang inhibitor terhadap sel yang menyebabkan nilai fermentasi turun (Goksungur & Zorlu, 2001)



Gambar 5 Pengaruh produksi hydrogen dengan kehadiran konsentrasi glukosa

Sumber : Fabiano, 2001

Nilai fermentasi awalnya meningkat dengan penambahan substrat. Ketika konsentrasi sudah mencapai konsentrasi optimum, dimana medium jenuh dengan substrat, produk yang dihasilkan cenderung menurun.

2.7 Respon Surface Methodology

Desain eksperimen merupakan suatu proses memprediksi atau merancang yang dilakukan sebelum penelitian, dengan cara memanipulasi variabel bebas untuk

mendapatkan data yang akurat dan objektif tentang hubungan sebab akibat antar variabel bebas tersebut. Optimasi sendiri didefinisikan sebagai suatu pendekatan terukur, untuk mengidentifikasi keputusan terbaik dengan mempertimbangkan berbagai variabel pembangun sistem, baik variabel variabel terikat ataupun variabel variabel terikatnya. Optimasi dapat dilakukan dengan mengendalikan variabel bebas yang paling menentukan hasil yang diharapkan dari suatu proses.

Dalam penelitian terdapat beberapa bentuk desain bergantung dari tujuannya yaitu, (1) Desain komparatif yang dipakai bertujuan mencari faktor utama apa yang paling penting dan berpengaruh signifikan pada suatu sistem ketika kondisi sistem terdiri dari berbagai macam faktor. (2) Desain screening, bertujuan untuk memilih dan menggambarkan beberapa efek penting dari banyak efek yang tidak penting, oleh karena itu, desain screening sering disebut juga *main effect design*. (3) *Response surface* bertujuan untuk melihat, mengukur keterkaitan antar interaksi variabel dalam suatu sistem dengan efek kuadrat yang mampu memberikan kita gambaran permukaan yang akurat. *Response surface* ini biasa digunakan untuk mengoptimasi suatu proses, mencari kelemahan proses, dan membuat proses menjadi lebih tidak sensitif terhadap gangguan eksternal.

Untuk percobaan yang mencoba mencari nilai optimum dari interaksi beberapa variabel dalam suatu sistem proses dari penjelasan diatas, paling tepat menggunakan metode *Respon surface methodology (RSM)*. RSM akan membantu menyarankan komposisi terbaik dari interaksi variabel variabel tersebut agar mendapatkan suatu proses yang optimal. RSM merupakan salah satu metode paling penting dalam statistik desain percobaan. RSM terdiri dari kumpulan dari teknik matematika dan statistik yang bertujuan untuk menjelaskan interaksi antara berbagai jenis variabel respon dengan cara mengurutkan percobaan yang dirancang untuk mendapatkan respon yang optimum. Metode ini pertama kali diperkenalkan pada tahun 1951 oleh PMP box dan KB Wilson. Model ini menggunakan pendekatan polinomial tingkat 2. Kelebihan pendekatan ini, dapat memberikan penjelasan suatu interaksi berbagai variabel, meskipun kita tidak mengetahui karakteristik dari suatu proses. Alur berfikir dari RSM sebagai berikut

$$y=f(x_1,x_2,x_n,\dots,x_{n+1})+ e$$

misalnya untuk proses berorde dua, dimana x_1 dan x_2 merupakan variabel bebas yang berpengaruh dan y adalah respon dari fungsi yang bergantung pada x_1 dan x_2 . Sedangkan nilai e merupakan error dari respon. RSM membantu mencari kondisi nilai y optimum dimana interaksi antar variabel dapat menghasilkan suatu model yang maksimum.

Langkah langkah umum penentuan rancangan optimum dari suatu metode respon permukaan antara lain, (1) *Screening*: dalam tahap ini, berbagai faktor yang diduga berpengaruh, diseleksi faktor-faktor yang memberikan dampak besar terhadap sistem, sedangkan faktor yang tidak signifikan diabaikan, (2) *Improviasi*: dalam tahap ini dilakukan perubahan nilai faktor-faktor secara berulang-ulang sehingga mendapatkan sekumpulan variasi data yang dapat diolah secara statistik untuk kemudian dicari nilai optimumnya. Proses ini dapat dilakukan dengan metode Box atau Central Composite Design, bergantung pada jenis dan sifat rancangan sistem,(3) *Penentuan titik optimum*: Merupakan proses pencarian titik optimum menggunakan metode regresi orde dua.

2.8 Central Compotsite Design (CCD)

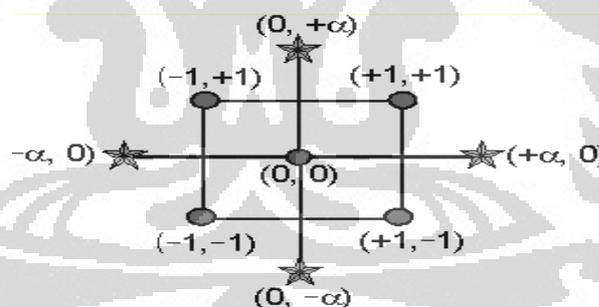
Dalam metode RSM terdiri dari dua macam jenis rancangan percobaan yaitu *Central Composite Design* (CCD) dan *Box Bhenken Model*(BBM). Jika jenis percobaanya adalah *sequential* maka digunakan model rancangan CCD. Akan tetapi, jika jenis percobaanya *non sequential* rancangan percobaanya digunakan BBM. CCD merupakan rancangan percobaan menggunakan desain faktorial pangkat 2, dengan menambahkan titik pusat dan titik aksial. Desain pusat komposit umum memiliki 5 tingkat, meskipun biasanya dapat dimodifikasi dengan memilih nilai $\alpha=1$ (menghadap CCD). CCD juga membentuk estimasi kuadratik dan kurang sensitive terhadap kehilangan data. Desain pusat komposit memiliki tiga kelompok eksperimen yaitu

- a. Sebuah desain faktorial (biasanya sangat mungkin pecahan nilainya) yang memiliki dua tingkat. Desain faktorial ini terdiri dari semua kemungkinan dari +1

dan -1. Untuk variabel varian dua faktor, ada 4 desain yaitu, $(-1,-1)$, $(+1,-1)$, $(1,+1)$, $(+1,+1)$.

- b. Sebuah nilai tengah, yang merupakan nilai tengah dari desain percobaan. Nilai ini diulang lebih sering dan dalam jumlah lebih banyak dibandingkan kelompok lain, untuk meningkatkan ketepatan percobaan. Nilai tengah atau titik pusat ini, merupakan nilai poin dimana semua tingkat diarahkan ke tingkat kode 0, yang merupakan titik tengah dari setiap rentang dari varian. Nilai titik tengah ini biasanya diulang 4-6 kali untuk mendapatkan perkiraan yang terbaik dan meminimalisir kesalahan percobaan.
- c. Sebuah nilai aksial, nilai yang sangat jauh dari nilai titik pusat, baik menjadi batas bawah ataupun atas dari sebuah desain pangkat dua. Nilai aksial ini biasa juga disebut nilai *star* dimana mempunyai faktor yang mengarah pada sumbu 0, titik tengah, kecuali satu faktor yang memiliki nilai \pm alpha. Untuk varian dua variabel nilai aksialnya adalah, $(-\alpha,0)$, $(+\alpha,0)$, $(0,-\alpha)$, $(0,+\alpha)$.

Nilai alpha ini dihitung pada setiap desain agar memiliki kemampuan blok berotasi dan ortogonal.

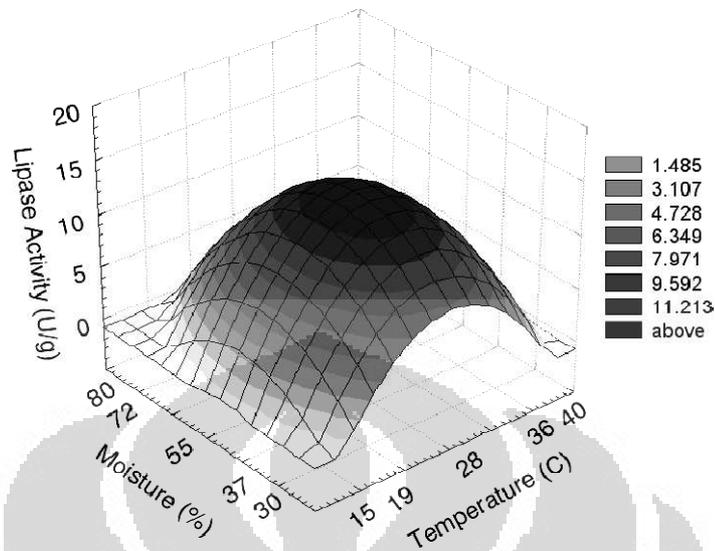


Gambar 6 Rancang CCD
Sumber : Design Expert Software

Berikut salah satu contoh regresi orde dua dengan Respin surface dengan 2 faktor, pada penelitian vargas et all yang membahas otpimasi temperature dan moisture pada produksi lipase oleh *pennicilium simplissium* pada *soya bean*

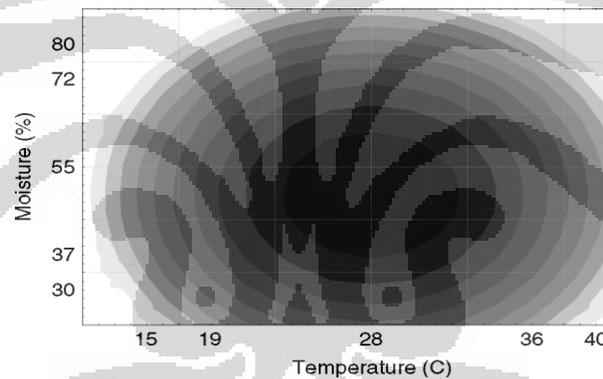
$$GL = 1.085 \cdot T - 3.107 \cdot T.2 + 1.618 \cdot W \\ - 1.736 \cdot W2 + 1.600 \cdot T \cdot W$$

Dengan grafik respon permukaannya adalah sebagai berikut,



Gambar 7. Contoh respon permukaan RSM

Sumber : Gean D. L.P vargas et all, 2008



Gambar 8. Contoh respon permukaan RSM berbentuk kountur

Sumber Gean D. L. P vargas, 2008

2.9 One Factor at The Time (OFAT) Design

Desain optimasi ini merupakan desain optimasi konvensional dimana variabel-variabel yang berpengaruh diasumsikan tetap ketika mencari nilai terbaik dari variabel lain yang di variasikan. Sebagai contoh ada dua variabel input (X1 dan X2) dan satu variabel output (Y). Agar output didapatkan dengan optimum, Hal pertama yang harus dilakukan adalah mengasumsikan komposisi X2 adalah tetap pada nilai tertentu, lalu kita variasikan X1 sehingga kita mendapatkan nilai optimum

dari output yaitu Y. Setelah didapatkan X1 optimum, maka nilai tersebut dibuat tetap untuk mencari varian X2 terbaik yang dimodifikasi. Kelamahan dari metode ini adalah tidak adanya pertimbangan terhadap suatu proses dimana sangat dimungkinkan X1 dan X2 merupakan variabel terikat.

2.10 State of The Art

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui interaksi optimum antara konsentrasi induser yang dipilih dan suhu fermentasi agar mendapatkan nilai aktifitas enzim lipase dari fermentasi yeast *Rhodotorula mucilaginosa* (YUICC422) yang didapatkan dari koleksi BPPT Serpong dari UI cultur collection 422. Penelitian tentang optimasi lipase dari mikroorganisme baik menggunakan jenis bakteri ataupun fungi telah banyak dilakukan. Pada umumnya optimasi enzim lipase dibagi menjadi dua kelompok, pertama kelompok yang mengoptimasi pada proses produksi lipase dan kelompok yang mengoptimasi karakterisasi lipase. Pada tahun 2011 lalu, Amin dkk telah mengoptimasi parameter pertumbuhan produksi lipase dari *Genoderma Lucidum* menggunakan *Respon surface Methodology*. Amin dkk menemukan fermentasi rendam dari *Genoderma lucidum* akan optimum pada level *moisture* 80%, , pH 4.5, olive oil sebagai induser sebesar 2% dan waktu inkubasi 96 jam pada suhu 30 C. Penelitian produksi lain menggunakan mikro organisme lain dengan *Respon surface Methodology* antara lain, *Arthrobacter* (Sharma 2009), *Fusarium Oxyfarum* (Rifaat, 2010), *Bacillus sp* (Hasan, 2001), *colletorichum gloesporildes* (Balaji, 2008) dan *Staphylococcus sp lp 12* (pogaku, 2009). Optimasi dengan cara lain misalnya OFAT juga telah dilakukan antara lain, *Penicillium verrucosum* (Pinheiro dkk, 2008), *Rhizopus oryzae* (Cos dkk, 2005), *Pseudomonas* (carvalho dkk ,2008) dan masih banyak lagi.

Penelitian ini sendiri merupakan kelanjutan dan inovasi pada point interaksi konsentrasi induser dan suhu optimum fermentasi menggunakan RSM, dari penelitian yang telah dilakukan oleh Retra Roza yang telah terlebih dahulu pada tahun 2009, memproduksi, mengkarakterisasi dan memurnikan secara parsial enzim lipase yang didapatkan dari Yeast UI CC 422. Yeast ini oleh retra dibuktikan merupakan spesies

Rhodotorula mucilaginosa. Retra juga menemukan bahwa kondisi optimum pH media 6, suhu produksi optimum 30 °C dan masa inkubasi 72 jam, dan hasil karakterisasinya aktivitas optimum pada pH 8, menggunakan tris Cl dengan waktu inkubasi 60 menit. Retra juga menemukan bahwa ada empat macam jenis lipase yaitu, lipase 1 (38,46 kDa), Lipase 2 (32,89 kDa), lipase 3 (28,18) dan lipase 4 (16.29 kDa) serta membuktikan lipase ini dapat digunakan untuk membuat biodiesel.

Penelitian yang dilakukan ingin mengetahui mengoptimumkan interaksi konsentrasi substrat atau induser dan suhu inkubasi produksi lipase yang retra lakukan pada kondisi konsentrasi induser 2 % dan suhu inkubasi 30⁰ C. Untuk itu dilakukan uji pendahuluan dengan metode OFAT yaitu *One Factor at the Time*.



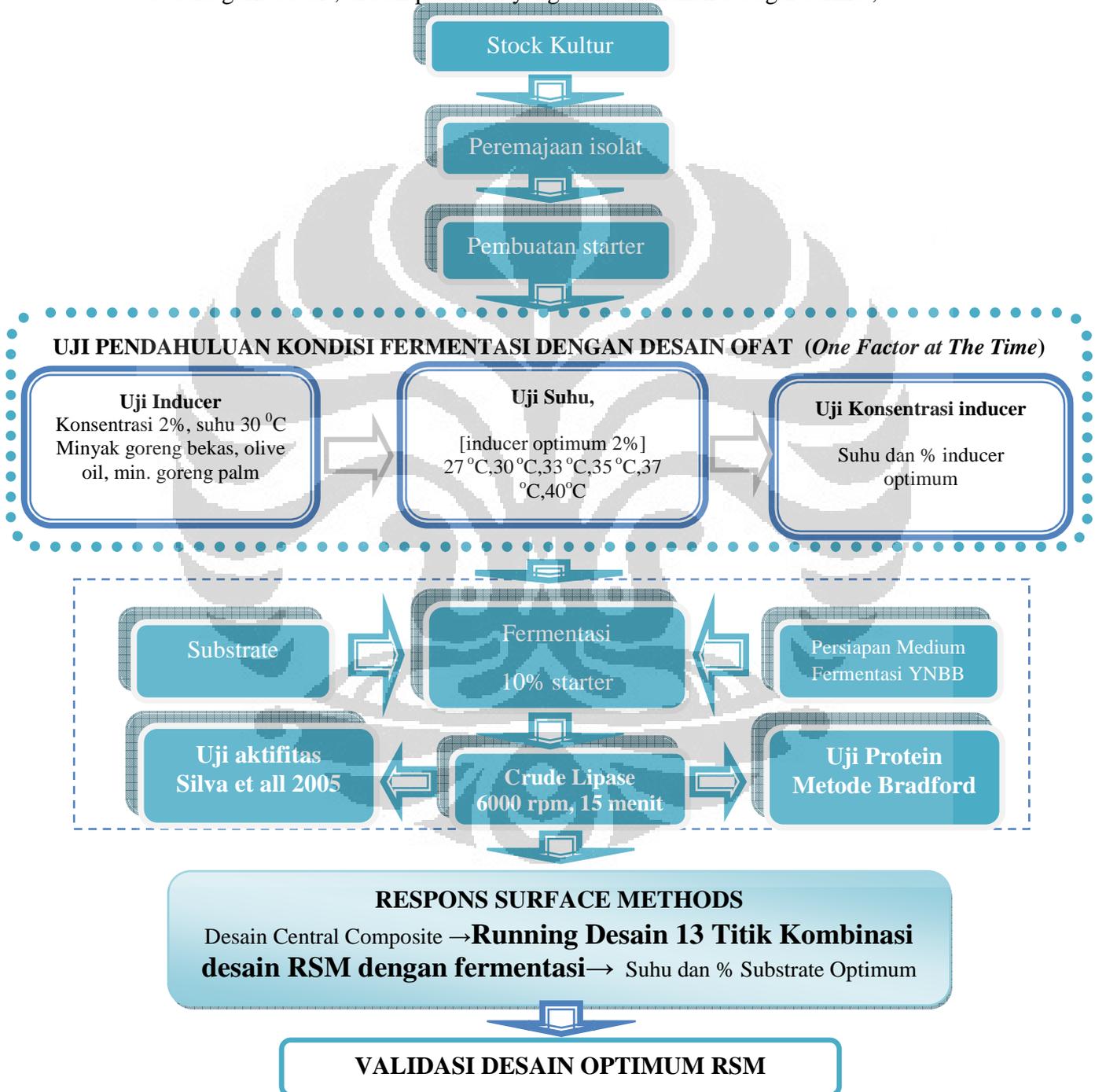
Tabel 3 State of the Art

State of the art			Produksi yeast Lipase			
			Metode Optimasi			
			Non RSM		RSM	
			Submarged Fermentasi	Solid State fermentasi	Submarged Fermentasi	Solid state fermentasi
Organisme	non yeast	no consideration	liu et al 2005, kiran et al 2008, carvalho et al (2008), ertugrul et al 2008), abada (2008), rifaat (2010), hasan 2001, pogaku, (2009), Lee, (1999), chen 2003	sun and xu (2008), diaz et al (2006), palma et al (200), azeredoo et all (2007), vargas et al (2005), dutra et al (2008), ballaji (2008)	Sharma, 2009, shirsha 2010, korbekandi, 2008,	
	Yeast Lain	Growth parameter	papaparaskevas, (1992), Mladenoska, (2001), Shukla, (2007), Silva, (2008), bancerz (2005), sahnchez, (1999)	Rodríguez, 2006	Kaushik et al., (2006), amin et all, (2011), Fafilolgli, (2001), Vargas (2008)	
		Karakterisasi	Banzerz, (2007), haas, (1992), Muderhwa (1986), Hoe (1997), abbas, (2002)		ibrhaimpour, 2011	
	<i>Rhodotorula muciliginosa</i>	Karakterisasi C: N				
	Growth parameter					
	Substrate V s Suhu		Retra, (2009)		Penelitian yang dilakukan	

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Diagram Alir Penelitian

Secara garis besar , urutan penelitian yang akan dilakukan sebagai berikut,



Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi interaksi terbaik dari konsentrasi substrat dan suhu dalam produksi lipase dengan fermentasi *Rhodotorula mucilaginosa* menggunakan *response surface methodology* dan melihat kemungkinan minyak goreng bekas sebagai substrat untuk produksi lipase.

Penelitian ini diawali dengan peremajaan mikroba *Rhodotorula mucilaginosa* yang merupakan koleksi dari Universitas Indonesia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, yang diisolasi oleh Dian Oetari. Mikroba ini didapatkan dari koleksi mikroba BPPT Serpong. Mikroba yang telah disimpan pada suhu 80 °C ini perlu diremajakan dengan cara ditumbuhkan pada medium cair *Potato Dextra Broth* selama 5 hari. Selanjutnya mikroba golongan *yeast* ini ditumbuhkan di medium agar selama 5 hari. Selanjutnya, mikroba yang didapatkan pada medium agar ini, dipindahkan ke medium agar miring dengan tujuan untuk memudahkan pembuatan starter dan memastikan hanya ada koloni tunggal yang berada di medium agar miring tersebut. Pembuatan starter yang digunakan untuk fermentasi sebanyak 10%, selalu dibuat menggunakan biakan koloni tunggal yang sudah ada di agar miring, dengan menumbuhkan 2-5 ose *yeast* di agar miring ditambahkan PDB selama 14 jam (retra, 2009).Prose selanjutnya adalah proses fermentasi. Proses fermentasi ini dilakukan menjadi 3 kelompok yaitu

1. Tahap Uji Pendahuluan

Pada tahap ini, metode yang digunakan adalah *metode* OFAT merupakan metode optimasi konvensional, dimana metode ini tidak memperhatikan interaksi antara variabel. Bisa jadi dengan input konsentrasi substrat (X1) tertentu atau bahkan konsentrasi sangat rendah dapat menghasilkan output besar, pada X2 yang diasumsikan disuatu nilai. Nilai X1 yang didapatkan akan diasumsikan tetap, untuk mencari nilai X2 optimum. Cara ini tidak cukup akurat bila X1 dan X2 saling berhubungan. Namun, cara ini sangat membantu untuk uji pendahuluan sebagai bahan pertimbangan faktor faktor penting untuk input desain RSM. Dengan uji ini, setidaknya memberikan sedikit gambaran dimana nilai X1 dan X2 optimum terletak pada rentang tertentu. Pada tahap ini, penggunaan metode OFAT bertujuan untuk

mendapatkan desain awal dan memprediksi nilai maksimum dari konsentrasi substrat dan suhu. Nilai prediksi yang didapatkan akan dijadikan acuan dan pertimbangan untuk menjadi data input data pada *Respon Surface Methods*. Pada uji pendahuluan ini terdiri dari 1 tahap uji substrat dan 2 tahap uji pendahuluan konsentrasi substrat dan suhu optimasi untuk menentukan *range* desain RSM.

Pada fermentasi pada tahap ini perlu diperhatikan volume substrat yang ditambahkan dan air yang ditambahkan untuk menghomogenkan medium pertumbuhan, bergantung pada komposisi kondisi fermentasi yang diinginkan,

Uji Pendahuluan Pemilihan Substrate Terbaik

Pada uji ini, kita menggunakan metode *One factor at the time*. Pada uji ini suhu dibuat tetap karena substrat yang akan divariasikan, substrat yang digunakan adalah minyak jelantah, minyak kelapa sawit, minyak zaitun. Dengan konsentrasi minyak 2% (1 ml), jumlah air 44 ml, jumlah starter 10% (5 ml), setiap produksi 50 ml lipase. Kemudian diukur aktifitas dan kadar protein enzim lipasenya. Nilai tertinggi merupakan kondisi substrat terbaik

Uji Pendahuluan Variasi Suhu

Pada uji variasi suhu ini, konsentrasi substrat dipilih tetap, yaitu 2% (1 ml dalam 50 ml), selanjutnya suhu divariasikan dari 27 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C, 40°C. Dengan kondisi demikian maka, air yang digunakan untuk melarutkan sebanyak 44 ml. Pada tahap ini, sebenarnya cukup dengan menggunakan salah satu minyak diantara minyak kelapa sawit, minyak zaitun, dan minyak jelantah. Karena minyak terbaik telah ditentukan pada tahap uji sebelumnya. Namun, penulis melakukan tahap ini untuk semua minyak, dengan tujuan untuk memastikan hasil uji tahap pertama. Nilai aktifitas enzim dan kadar protein enzim tertinggi menandakan titik terbaik.

Uji pendahuluan konsenstrasi substat

Pada kondisi ini substrat divarisiakan dari 1 %, 2%, 4%, 6,% 10%, 20%, 40%, 60%. Konsekuensi dari perbedaan komposisi substra dalam volum ini tentunya akan mempengaruhi jumlah air yang digunakan untuk menghomogenkan medium fermentasi. Berikut rumus cara menghitung jumlah air yang digunakan

Jumlah air yang digunakan = Volume Produksi – 10 % volume produksi (A)- X% volum produksi(B)

2. Tahap *running Respons surface Methodology*

Dari uji pendahuluan diatas, kita dapat menentukan range dimana suhu optimum dan konsentrasi substrat optimum untuk desain RSM. Karena penelitian ini, menggunakan variabel 2 faktor, maka sesuai *rule of thumb RSM* dengan desain central composit , akan dilakukan fermentasi dengan 13 titik fermentasi. Berikut tabel desain 13 titik tersebut. Rancangan desain yang digunakan pada penelitian ini adalah matriks rancangan *Central Composite Design*

Tabel 4 Penentuan desain Ekperimen CCD

Kode	Variabel	-1	0	+1	- Alpha	+ alpha
A	Suhu	25	30	35	22.92893	37.07107
B	Konsentrasi substrat	1	2	3	0.585786	3.414214

Level nol (0) merupakan nilai yang diharapkan hasil dari uji pendahuluan, dan untuk menentukan batas bawah -1 level dan batas atas +1 level. Kemudian nilai-nilai parameter dari design expert ini digenerasikan ke dalam software *Design expert*, seperti yang tertera di dalam tabel dibawah ini,

Tabel 5 Matriks eksperiment RSM

Standar	Run	Suhu	Konsentrasi	Aktifitas
10	1	30	2	
2	2	35	1	
6	3	37.07107	2	
13	4	30	2	
12	5	30	2	
5	6	22.92893	2	
9	7	30	2	
3	8	25	3	
8	9	30	3.414213562	
4	10	35	3	
7	11	30	0.585786438	
1	12	25	1	
11	13	30	2	

Ada 13 titik yang merupakan ciri khas dari *central composite design* dua faktor. Seluruh titik pada tabel itu diuji di laboratorium untuk mencari nilai aktifitas lipase dari setiap variasi perlakuan yang diberikan oleh RSM . Dari percobaan kita dapat menentukan nilai aktifitas terbaik, kemudian software design expert akan memberikan berbagai macam bentuk analisis, sehingga kita dapat menyimpulkan titik mana yang terbaik dan optimum dari suatu proses.

3. Tahap Validasi Hasil RSM

Setelah melakukan running pada tahap dua, RSM akan memberikan beberapa kondisi ideal dari suatu proses. Kondisi ideal itu yang kita validasi untuk membuktikan seberapa bagus desain yang kita miliki.

3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa kelompok variabel penelitian, yaitu

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang diatur pada suatu nilai tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis substrat, konsentrasi substrat dan suhu produksi lipase. Pada uji pendahuluan, Jenis substrat yang divariasikan adalah minyak goreng dari palm oil, minyak zaitun, dan minyak jelantah. Konsentrasi substrat divariasikan menjadi 1%,2%,4%,6%,10%,20%,40%,60%. Suhu divariasikan pada suhu 27 °C, 30 °C, 33 °C,35 °C,37 °C dan 40 °C. Pada uji RSM variabel bebasnya konsentrasi substrat dan suhu produksi lipase dengan komposisi seperti pada tabel 6.

2. Variabel terikat

Variabel ini merupakan variabel yang diukur nilainya setelah diberikan harga tertentu pada variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas enzim.

3. Variabel kontrol

Variabel tetap dalam penelitian ini adalah enzim lipase dan menggunakan bakteri *Rhodotorula mucilaginosa* (YUICC 422)

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, LAPTIAB - BPPT, Serpong, Tangerang, Banten dan waktu penelitian dari bulan Januari 2012 hingga Juni 2012.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-Alat digunakan dalam penelitian ini adalah milik Laboratorium Bioindustri BPPT Tangerang. Alat-alat yang digunakan antara lain, alat gelas seperti cawan petri, tabung reaksi, tabung fermentasi (Pyrex), *Incubator static* (Memert), timbangan analitik (Radwag), *Hotplate stirrer* (Heidolph), Autoklaf (Hitachi), pH meter (Ino Lab), mikrotube (Eppendorf), *Shaking incubator* (Kuhner), tabung sentrifugasi (Nunc), *High Speed Refrigerated Centrifuge* dan Rotor R10A2

(Himac), *Sentrifuge* (Hitachi), *Vortex* (Eppendorf), spektrofotometer UV-vis (Hitachi), pipet mikro (Thermo).

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan berasal dari koleksi dari BPPT Serpong, dan beberapa bahan yang didapatkan dengan membeli di luar BPPT Serpong. Pada penelitian ini menggunakan *Yeast* UICC422 (*Rhodotorula mucilaginosa*) yang merupakan khamir koleksi UI yang didapatkan dari isolasi limbah terkontaminasi limbah telah digunakan dan disimpan oleh BPPT Serpong. Penumbuhan dan Peremajaan *yeast* ini menggunakan medium pertumbuhan *Potato Dextra Agar* dan *Potato Dextra Broth* (Difco). Medium yang digunakan untuk menumbuhkan *yeast* menggunakan ekstrak *yeast* (Scharlau), Polivinil alcohol (Merk), K_2HPO_4 (Merck), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), NaCl (Merck), $(NH_4)_2SO_4$ (Merck). Untuk melihat aktifitas enzim digunakan P-nitrofenil palmitat (Merck), isopropanol, gum Arabic, triton x100 (Sigma), dan untuk membuat kurva standar aktifitas menggunakan *nitrophenol* (Sigma). Kurva standar protein menggunakan Bouvine Serum Albumine (Sigma). Substrat selama produksi enzim menggunakan minyak goreng kelapa sawit (Bimoli), minyak zaitun, dan minyak jelantah dari pedang ayam goreng di sekitar BPPT.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media dan Produksi enzim

3.5.1.1 Peremajaan Isolat

Stok kultur dari kulkas bersuhu $-88^{\circ}C$ perlu diaktifkan kembali dan dibuat ke koloni tunggal agar dapat digunakan fermentasi. Hal pertama yang dilakukan adalah menumbuhkannya pada medium *Potato Dextra Broth* (PDB). Medium PDB yang telah distrilisasi sebanyak 5 ml dibuat dengan komposisi 26,5 gram dalam 1000 ml. ditambahkan *Yeast* di stok kulture dengan perbandingan, *yeast* dan PDB 1:5. Kemudian dibiakkan dengan menaruhnya pada shaker kuhner 150 rpm, 30 C selama 5 hari. Selanjutnya membuat medium PDA pada cawan petri untuk membentuk koloni tunggal *yeast*, dengan komposisi 39 gram dalam 1000 ml, dengan modifikasi

NaCl 1,5%. *Yeast* yang telah tumbuh dan berwarna pink tersebut digores pada medium PDA yang telah dibuat pada cawan petri.

3.5.1.2 Pembuatan Isolat

Pembuatan Isolat pada tabung miring dilakukan dengan menumbuhkan *Yeast* pada medium agar. Medium yang digunakan adalah *Potato Dextra Agar* (PDA). Komposisi PDA yang digunakan yaitu 39 medium PDA dalam 1000 ml akuades. Medium ini dimodifikasi dengan penambahan NaCl 1,5%. Kemudian dilarutkan hingga sempurna dan homogen dengan bantuan stirrer dan pemanasan. Kemudian dimasukkan dengan sangat aseptis sebanyak 4 ml tabung reaksi yang telah disterilisasi. Penambahan *kloramfenikol* juga dapat dilakukan sebagai antibakteri. Kemudian larutan disterilisasi pada autoklaf selama 15 menit, 1 atm, 121 C. Setelah diseterilisasi, tabung diletakkan miring pada papan kayu. Kemudian didiamkan sekitar 12 jam agar mengeras dan membentuk agar. Kemudian secara aseptis *yeast* koloni tunggal yang telah dibuat pada cawan petri, ditumbuhkan pada agar miring dengan cara menggoresnya dengan pola tertentu.

3.5.1.3 Pembuatan Starter

Pembuatan medium starter enzim lipase menggunakan medium PDB (*Potato Dextrose Broth*) dengan cara 2.65% media PDB dimasukkan ke elenmeyer 50 ml, dilarutkan dengan akuades. Kemudian dihomogenkan dengan stirrer dan dipanaskan hingga larut serta disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121 C tekanan 1 atm selama 15 menit. Biakan isolat *yeast* yang telah diremajakan diinokulasi pada agar miring, sebanyak 5 ose ke dalam medium starter secara aseptis. Kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 150 rpm, suhu 30⁰C selama 14 jam.

3.5.1.4 Fermentasi untuk Produksi Lipase

Pembuatan medium fermentasi, dengan 45 ml YNBB ditambahkan 15 gram NaCl dan 2% ml minyak goreng. Selanjutnya ditambahkan 10% starter *yeast*. Diinkubasi dengan shaker incubator dengan kecepatan 150 rpm suhu 30C selama 72

jam (Retra,2009). Dibuat juga medium control tanpa penambahan *yeast*. Suhu dipertahankan pada suhu 30 °C

3.5.1.5 Panen dan Penyiapan Ekstrak Kasar Lipase

Setelah selama 72 jam dibiakkan, Suspensi hasil fermentasi dimasukkan ke tube untuk di sentrifugasi menggunakan *High Speed Refrigerated Centrifuge Himac CR21G* dan rotor R10A2 selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil dan dipisahkan dari padatnya. Supernatant yang didapatkan telah mengandung ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim di uji aktifitasnya menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 410 nm, dan kemudian dicari kadar proteinnya menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 595 nm dengan metode Bradford .

3. 5.2 Uji Pendahuluan dengan Metode *One Factor at the Time (OFAT)*

3.5.2.1 Penentuan Konsentrasi Substrat (*Inducer*)

Tujuan tahap ini adalah untuk melihat potensi minyak goreng bekas atau minyak jelantah sebagai substrat inducer dalam fermentasi atau produksi enzim lipase. Semua metode sama dengan pada sub bab sebelumnya, hanya berbeda pada jenis inducer, inducer yang digunakan adalah minyak jelantah, dan pembanding minyak goreng dan minyak *olive oil*. Kemudian nilai aktifitas tertinggi dari fermentasi ini, akan digunakan selama fermentasi.

3.5.2.2 Uji Pendahuluan Optimasi Suhu

Pada tahap ini, digunakan metode OFAT (*One Factor at the Time*) dimana konsentrasi substrat dibuat tetap yaitu 2%, dan menggunakan minyak terpilih. Sementara semua proses metode fermentasi sama seperti pada sub bab 3.5.1.1-3.5.1.5. Hal yang berbeda pada tahap ini adalah suhu yang digunakan untuk produksi lipase divariasikan pada suhu 27⁰C,30⁰C,33⁰C,35⁰C,37⁰C,40⁰ C. Kemudian dilihat aktifitas dan protein terbaiknya.

3.5.2.3 Uji Pendahuluan Konsentrasi Substrat (Induser)

Pada tahap ini, masih menggunakan metode OFAT dimana suhu yang terpilih pada tahap sebelumnya dibuat tetap, dan bervariasi konsentrasi Induser yaitu 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 40%, 60%.

3.5.3. Optimasi dengan Respon Surface Method (RSM)

Pada tahap ini, hasil dari uji pendahuluan didapatkan nilai prediksi suhu dan konsentrasi substrat induser optimum, kemudian data itu digunakan untuk menentukan batas atas dan batas bawah desain *Central Composite* yang digunakan pada metode RSM ini. Karena penelitian ini melibatkan 2 faktor yang berbeda, menurut *rule of thumb* desain RSM akan diberikan 13 titik variasi interaksi antara dua variabel yang di input. Kemudian melakukan fermentasi untuk ke 13 titik yang disarankan oleh RSM. Kemudian dengan berbagai alur analisis statistika RSM, akan didapatkan keadaan dua variabel penting yang optimum.

3.5.4 Melakukan Uji Optimasi Desain RSM

Hasil analisis RSM kita uji ke dalam proses produksi lipase yang sama dengan sebelumnya dengan berbagai macam modifikasi bergantung keadaan yang RSM berikan sebagai hasil analisisnya.

3.5.5 Pengujian Aktifitas Enzim Lipase dan Kadar Protein

3.5.5.1 Metode Uji Lipase

Aktivitas lipase pada penelitian pemurnian dan karakterisasi lipase diukur dengan metode spektrofotometer menggunakan *p*-nitrofenil palmitat sebagai substratnya (Silva, *et al.*, 2005). Larutan A dibuat dengan mencampurkan 30 mg *p*-nitrofenil palmitat ke dalam 10 mL isopropanol. Larutan B dibuat dengan melarutkan 100 mg *Gum Arabic* dan 400 mg Triton X-100 dengan 90 mL bufer Tris-Cl 50 mM pH 8,0 (retra, 2009). Larutan A dan B dicampurkan sampai homogen dengan perbandingan A dan B 9 : 1. Selanjutnya, sebanyak 100 μ L enzim dan 900 μ L

substrat dimasukkan ke dalam eppendorf. Blanko dibuat dengan menggantikan enzim lipase dengan bufer Tris-Cl 50 mM pH 8,6. Tabung eppendorf diinkubasi dalam termomixer selama 30 menit pada suhu 37 °C. Kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Satu unit enzim dinyatakan sejumlah 1 μ mol *p*-nitrofenol secara enzimatis dilepaskan dari substrat setiap menit. Hasil pengukuran absorbansi kemudian dikonversi ke dalam aktivitas berdasarkan persamaan kurva standar *p*-nitrofenil. Persamaan kurva standar *p*-nitrofenil adalah

$$Y = ax + b$$

Keterangan:

Y= Nilai aktivitas (μ mol)

X= Absorbansi

Aktivitas (Y) dikonversi untuk memperoleh nilai aktivitas lipase (satuan unit/mL) dengan persamaan:

$$U = Y \times 100 / (t \times V \times Mr \text{ nitphenol})$$

Keterangan:

U= Aktivitas lipase (U/min/mL)

Y= Nilai aktivitas (μ mol)

t = Waktu reaksi (menit)

V= Volume ekstrak kasar lipase (mL)

Persamaan kurva ini didapatkan dari kurva standar yang dibuat, dengan melihat absorbansi dari berbagai variasi konsentrasi nitrophenol pada tris HCl pH 8. Hal ini dilakukan karena enzim lipase akan mengubah *p*-nitrofenil palmitat yang merupakan substratnya menjadi nitrophenol. Oleh karena itu, kita mencoba melihat nitrophenol murni dengan berbagai macam konsentrasi dan absorbansinya.

Tabel 6 Rancangan kurva kalibrasi aktifitas

	Nitro	tris	Absorbansi (Y)
1	0	1000	
2	100	900	
3	200	800	
4	300	700	
5	400	600	
6	500	500	
7	600	400	
8	700	300	
9	800	200	
10	900	100	
11	1000	0	

Pengukuran *Aktivitas Spesifik Lipase* dihitung dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein lipase.

$$\text{Aktivitas spesifik enzim lipase} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{aktivitas lipase} \left(\frac{U}{mL} \right)}{\text{kadar protein} \left(\frac{mg}{mL} \right)}$$

3.5.5.2 Pengukuran Kadar Protein

Pengukuran protein menggunakan metode *Bradford (1976)*, 30µL *crude* enzim direaksikan dengan 1.5 ml reagen Bradford dan dinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Dan diukur pada spectofotometer pada panjang gelombang 595nm. Blanko yang digunakan adalah 30µL akuades ditambabahkan 1.5 ML reagen Bradford.

Reagen Bradford dibuat dengan cara mencampurkan 0.01 g coomassie brilian blue (CBB) G-250, kemudian dilarutkan dalam 50 ml etanol 95% (v/v), lalu ditambahkan 100 ml asam fosfor 85% (v/v). Campuran dihomogenkan, lalu disaring

dengan kertas saring dan disimpan dalam botol gelap dan suhu rendah. Stok pereaksi Bradford harus diencerkan 5 kali sebelum digunakan.

Untuk mengukur kadar proteinya dengan bantuan kurva standar *Bovine Serum Albumin*, yang merupakan hubungan konsentrasi protein standar BSA dengan nilai panjang gelombang 750 nm. Berikut rancangan kurva BSA

Tabel 7 Rancangan kurva standar BSA

BSA	Tris HCl	ABS
1	0	1000
2	100	900
3	200	800
4	300	700
5	400	600
6	500	500
7	600	400
8	700	300
9	800	200
10	900	100
11	1000	0

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan utama penelitian ini adalah menentukan nilai konsentrasi induser optimum dan suhu optimum pada produksi lipase dari fermentasi rendam *Rhodotorula mucilaginosa* untuk menghasilkan aktifitas lipase tertinggi. Tujuan lain dari penelitian ini adalah menentukan potensi minyak jelantah sebagai induser minyak kelapa sawit dibandingkan minyak zaitun dengan melihat aktifitas enzim lipase. Parameter yang digunakan untuk mengukur setiap variabel dalam penelitian ini adalah aktifitas enzim lipase dan kadar protein yang didapatkan dari serangkaian percobaan yang dilakukan.

Pada tahap pertama dilakukan uji pendahuluan yang menggunakan metode *OFAT (One Factor at the Time)*. Pada tahap ini setidaknya ada tiga hasil yang didapatkan berdasarkan aktifitas dan protein yang dimiliki enzim lipase. Pertama, nilai aktifitas dan kandungan protein minyak jelantah yang dibandingkan dengan nilai aktifitas dan protein ketika menggunakan minyak kepala sawit dan palm oil yang dapat menggambarkan substrat terbaik. Kedua, nilai suhu optimum dari produksi lipase. Ketiga, nilai konsentrasi substrat optimum produksi lipase. Dari hasil, ketiga dan kedua kita jadikan dasar acuan dan pertimbangan dalam menentukan batas atas dan batas bawah input metode RSM. Kelebihan metode RSM dibandingkan dengan OFAT, RSM juga ikut memikirkan interaksi dari variabel-variabel yang divarisiakan. Pada akhirnya, hasil model dari RSM akan divalidasi dengan dilakukan fermentasi sesuai kondisi yang RSM berikan.

4.1 Penentuan Substrat Terbaik.

Substrat merupakan sumber karbon yang digunakan oleh mikroba sebagai sumber energi. Produksi lipase sendiri sangat bergantung pada substrat yang digunakan, komposisi media yang berbeda akan memiliki efek simultan pada produksi lipase dengan jenis mikroorganisme yang berbedada. Hal ini dikarenakan

psikologikal dan biokimia *pathway* dari suatu mikroorganisme. (Ebrahimpour, 2008). Substrat atau induser dalam produksi lipase merupakan salah satu faktor penting yang memiliki pengaruh signifikan dalam produksi lipase (kumar & gupta, 2008). Oleh karena penelitian ini, salah satu faktor yang menjadi perhatian adalah konsentrasi substrat,

Penelitian ini bertujuan mencari optimasi produksi lipase maka kita rancang sedemikian rupa agar satu satunya sumber karbon yang digunakan merupakan lemak. Dengan hanya ada sumber karbon yang berasal dari lemak, maka *Rhodotorula mucilaginosa* akan memaksa dirinya menghasilkan lipid dalam jumlah besar dibandingkan dengan enzim lainnya, karena hanya lipase yang dapat mengkatalis metabolisme lemak. Pemilihan substrat berupa minyak ini juga sejalan dengan literature yang menyatakan bahwa *Rhodotorula mucilaginosa* tidak dapat mengfermentasi karbohidrat.(Figueras, 2000)

Lipid yang digunakan pada penelitian ini adalah minyak jelantah yang didapatkan dari pedagang penjual ayam goreng diserpong. Minyak goreng bekas sangat banyak ditemukan dikawasan BPPT Serpong, oleh karena itu dipilih substrat dari minyak goreng bekas atau jelantah ini, untuk mengetahui potensinya sebagai penghasil lipase. sebagai pembanding lipid yang digunakan untuk menghasilkan lipase berasal dari minyak kelapa sawit yang diadapat dan minyak zaitun.

Berdasarkan perobaaan produksi lipase menggunakan lipid dari minyak jelantah, minyak kelapa sawait dan minyak zaitun sebanyak 2%, waktu inkubasi 72 jam dan suhu 30⁰ C adalah sebagai berikut,

Tabel 8 Perbandingan pada uji aktifitas dengan variasi substrat

Substrat	Absorbansi Uji Aktifitas	Absorbansi protein	Aktifitas U/ml	Aktiftas Sspesifik U/mg
Goreng palm oil	0.324	0.142	0.058	0.265
jelantah	0.286	0.118	0.051	0.257
olive	0.305	0.122	0.055	0.255

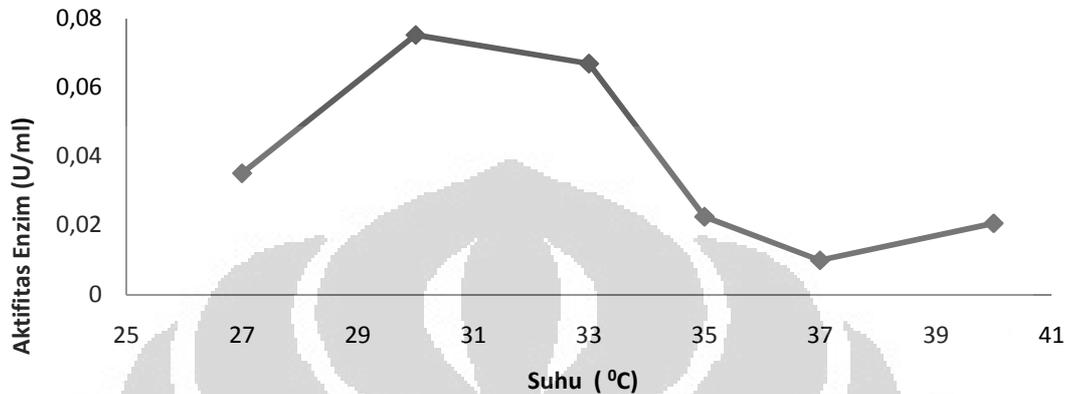
Berdasarkan tabel 8 diatas, dapat disimpulkan substrat terbaik untuk memproduksi lipase adalah minyak goreng dari kelapa sawit dengan absorbansi 0.3235 atau setara dengan 0.057 U/ml. Olive oil dengan absorbansi yang tidak jauh dari palm oil sebesar 0.305 atau setara 0.054 U/ml., juga dapat dijadikan substrat pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa*. Hal ini sesuai dengan penelitian Bancez pada 2010 yang mengatakan olive oil sebagai salah satu substrat yang baik bagi *yeast*. Selain itu Penelitian ini sesuai dengan hasil dari papaparaskevas, (1992), aktifitas lipase dari palm oil lebih tinggi dibandingkan dengan olive oil. Dengan demikian, substrat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah minyak dari kelapa sawit atau *palm oil*. Minyak disini tidak hanya berlaku sebagai substrat melainkan sumber karbon bagi pertumbuhan mikroorganisme itu sendiri (Xu, 2008)

Dari hasil percobaan ini juga membuktikan bahwa minyak jelantah masih potensial untuk dimanfaatkan kembali sebagai penghasil lipase melalui fermentasi rendam *Rhodotorula mucilaginosa*. Meskipun nilai absorbansi dan aktifitasnya tidak jauh lebih baik dibandingkan dengan nilai absorbansi dan aktifitas dari palm oil dan olive oil. Sehingga pemanfaatan minyak jelantah sebagai salah satu alternative pengganti substrat pertumbuhan *yeast* ini sangat mungkin dilakukan.

4.2 Penentuan Suhu Optimum

Suhu merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang penting bagi mikroorganisme, karena suhu sangat mempengaruhi proses metabolisme mikroorganisme. Pada umumnya mikroorganisme termasuk golongan *termofilik* yang memiliki rentang suhu 30 °C -40°C dimana suhu optimum fermentasi biasanya pada suhu 37 °C. Berdasarkan literature dari penelitian retra suhu optimum dari fermentasi *Rhodotorula mucilaginosa* adalah 30 C. Untuk memastikan apakah benar suhu tersebut suhu optimum pertumbuhan mikroba, penulis mencoba menfermetasi mulai dari suhu 27 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C dan 40 °C. Berbeda dengan Retra, yang melakukan uji ini dengan rentang besar 30°C, 35°C, 40 °C, 45°C. Rentang suhu yang digunakan penelitian ini rentangnya relatif kecil, dengan tujuan untuk melihat

secara seksama perbedaan suhunya. Ketika variabel suhu ini divariasikan. Semua faktor yang mempengaruhi fermentasi dijaga stabil.

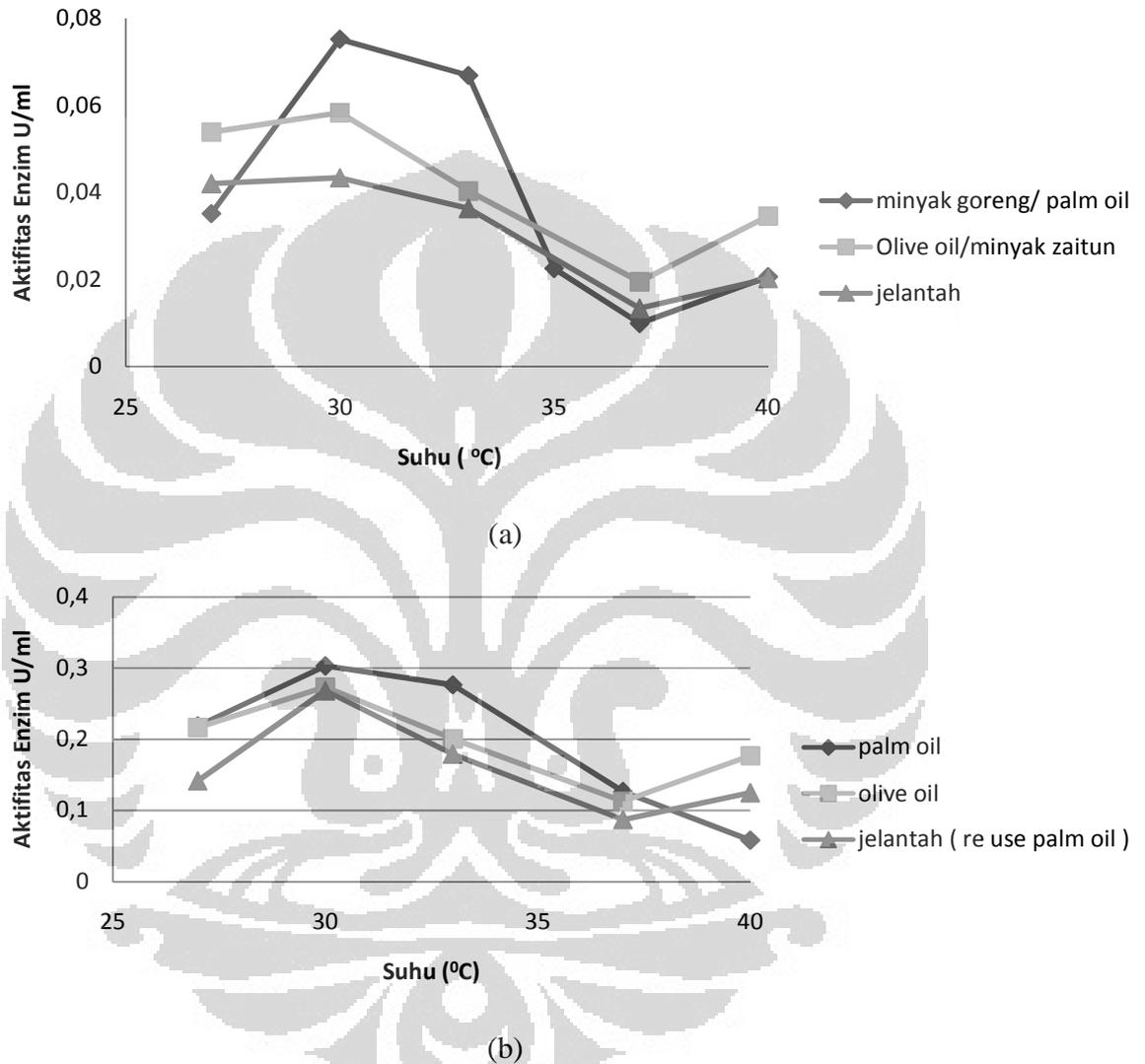


Gambar 10 pengaruh suhu pada aktifitas lipase dengan substrat minyak goreng

Berdasarkan grafik diatas (gambar10) dapat dilihat bahwa suhu untuk produksi lipase yang menghasilkan lipase dengan aktifitas tertinggi adalah 30 °C. Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian tentang produksi lipase dari *yeast* yang memiliki suhu optimum . Suhu yang menghasilkan aktifitas lipase terendah adalah suhu 37 °C. Kondisi ini, berkaitan dengan kondisi metabolisme *Rhodotorula mucilaginosa* itu sendiri. Pada suhu 37 °C enzim yang ada di tubuh *Rhodotorula mucilaginosa* sudah mulai bekerja tidak optimum, disebabkan oleh protein ditubuh mikroba ini mulai terdenaturasi. Jika diamati, pada suhu 40 °C terjadi kenaikan aktifitas lipase. Penulis menduga bahwa ini diakibatkan oleh jenis lipase lainya yang dihasilkan oleh enzim ini, pendapat ini didukung oleh penelitian *Retra 2009* yang menyatakan ada 4 jenis lipase yang dihasilkan zimogram. Sehingga, kemungkinan salah satu dari lipase tersebut memiliki titik optimum lainya.

Sebagai tambahan pada penelitian ini, penulis juga membandingkan produksi lipase yang dihasilkan oleh minyak goreng / palm oil, olive oil dan jelantah pada variasi suhu. Seperti yang terlihat pada grafik dibawah (gambar 11). Pada gambar tersebut dapat dilihat jelas bahwa minyak goreng atau palm oil masih yang terbaik

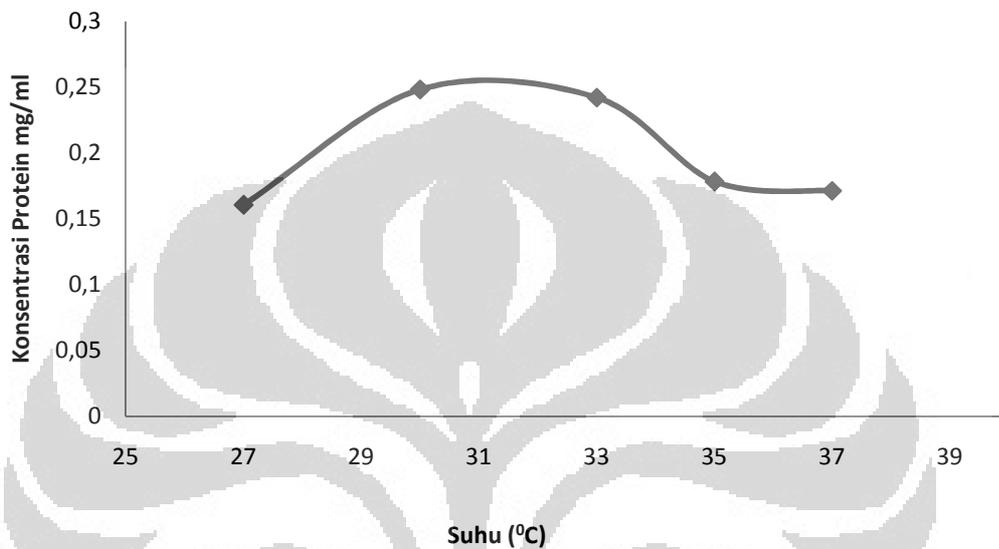
sebagai substrat penghasil lipase, meskipun untuk suhu semakin tinggi olive oil lebih tinggi aktifitas lipasanya.



Gambar 11. (a)Aktifitas lipase varisasi suhu dengan variasi minyak dan (b) aktifitas spesifik variasi suhu dan minyak

Dari penelitian ini juga dapat disimpulkan bahwa jumlah protein yang dihasilkan cenderung berbanding lurus dengan aktifitas yang dihasilkan. Pada suhu 30 °C, aktifitas lipase optimum, begitu juga jumlah proteinnya juga pada kadar tertinggi pada kondisi ini. Hal ini disebabkan, semakin banyak enzim yang dihasilkan

semakin banyak protein yang dihasilkan juga, karena enzim merupakan protein. Selanjutnya titik optimum ini akan digunakan sebagai pertimbangan dalam menentukan titik dalam desain RSM

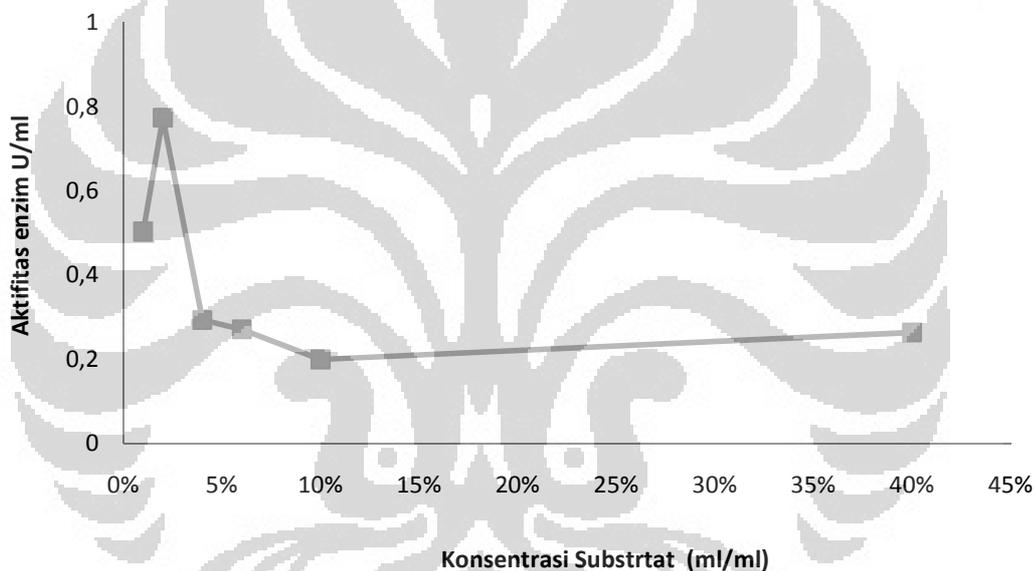


Gambar 12 Pengaruh suhu terhadap konsentrasi protein

4.3 Uji Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

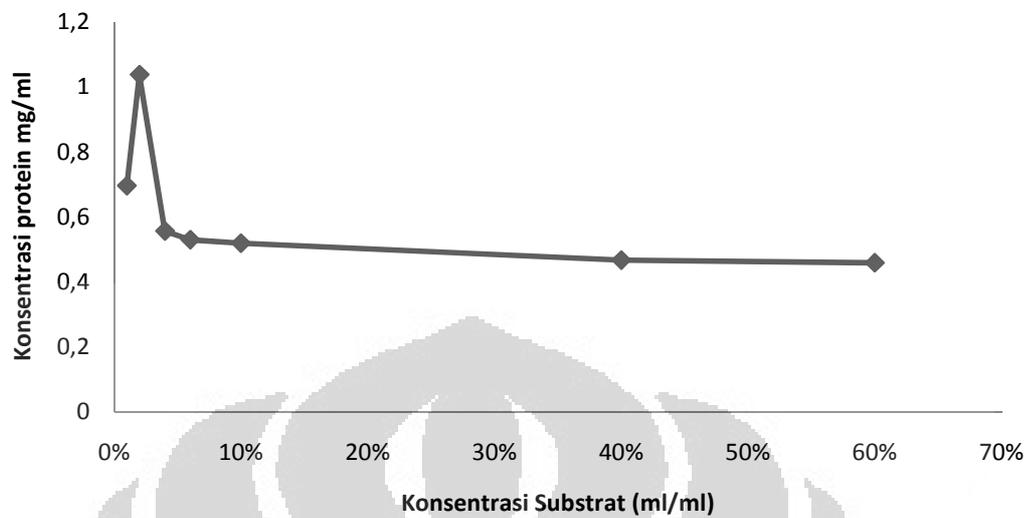
Setelah didapatkan suhu optimum produksi lipase dan substrat terbaik dari substrat yang digunakan dalam penelitian ini, dilanjutkan dengan mencari nilai konsentrasi substrat optimum dari penelitian ini. Pada penelitian ini, konsentrasi substrat yang digunakan divariasikan mulai dari 1%, 2%, 5%, 20%, 20%, 40% dan 60%. Dapat dilihat di dalam gambar dibawah, bahwa kurva aktifitas optimum pada konsentrasi substrat 2%. Hal ini sejalan dengan kondisi konsentrasi substrat pada penelitian yang dilakukan Retra 2009. Dari gambar dibawah ini dapat diamati, selama penambahan konsentrasi substrat aktifitas lipase yang diproduksi terus berkurang. Penulis menduga pada kondisi konsentrasi substrat semakin tinggi, jumlah air semakin berkurang, jumlah air ini sangat diperlukan dalam memproduksi lipase yang merupakan jenis enzim hidrolisis sehingga air menjadi faktor penting dalam produksi lipase. Selain itu, air berguna sebagai salah satu bahan pereksi katalis

trigliserida menjadi gliserol dikatalis lipase pada metabolisme lemak. Air juga menyediakan ruang *interface* pertemuan antara gugus hidrodilik lipid dengan enzim. Grafik penurunan ini juga disebabkan media pertumbuhan sudah jenuh dengan semakin banyaknya substrat yang ada (amin, et al, 2007). Ketika titik jenuh telah tercapai, penambahan konsentrasi substrat tidak akan membuat perbedaan. Namun, karena dalam penelitian ini, dengan penambahan substrat jumlah air pun berkurang sementara air diperlukan dalam reaksi ini, maka berakibat pada penurunan aktifitas atau enzim yang dihasilkan selama produksi enzim.



Gambar 13 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktifitas lipase

Seperti yang diduga pada pembahasan sebelumnya, kadar protein akan cenderung berbanding lurus dengan produksi lipasenya. Semakin tinggi yeild lipase yang dihasilkan protein yang dihasilkan juga akan semakin tinggi. Seperti yang dapat dilihat dari gambar berikut. Selanjutnya didapatkan kadar konsentrasi substrat optimum dari percobaan ini adalah 2%. Hasil ini akan dijadikan sebagai pertimbangan penting dalam menyusun desain model dari metode *Response Surface Methodology*.



Gambar 14 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kadar protein

4.4 Penentuan Desain *Response Surface Methodology*

Setelah melakukan uji pendahuluan, kami merancang desain optimasi menggunakan RSM. Kelebihan metode ini dibandingkan Uji pendahuluan yang menggunakan metode OFAT, yaitu RSM mempertimbangkan interaksi dari variabel variabel yang di variasikan dalam hal ini, interaksi antara suhu dan konsentrasi substrat.

Langkah pertama dalam mendesain RSM adalah memilih desain percobaan. Ada dua jenis desain yang dimiliki oleh RSM yaitu, *Central Composite Design (CCD)* dan *Box Bhenken Design (BBD)*. Kedua desain ini dapat digunakan untuk mengoptimasi model kuadratik. Namun, ada beberapa perbedaan antara dua desain ini. perbedaan pertama, CCD biasanya digunakan untuk mengolah data dan mengoptimasi data yang bersifat *sequential* sedangkan Box bhenken digunakan untuk mengolah data *non sequential* . perbedaan kedua, BBD memiliki jumlah titik desain yang lebih sedikit dibandingkan dengan CCD, karena BBD tidak memiliki sentral point, sementara central point ini dapat membantu mengetahui dengan lebih jelas kesesuaian model yang didapatkan. Berdasarkan penjelasan diatas, karena data

yang digunakan dalam uji pendahuluan cenderung *sequential* dan untuk lebih kesesuaian model yang lebih mudah dinterpretasikan, maka dipilih model CCD.

Langkah selanjutnya dalam mengoptimasi suatu proses dengan RSM adalah menentukan batas bawah dan batas atas dari variabel-variabel yang divariasikan. Pada penelitian ini ada dua variabel yang digunakan yaitu suhu, dan konsentrasi substrat. Berbeda dengan optimasi OFAT yang ketika salah satu variabel divariasikan, variabel lain dibuat tetap, metode ini bervariasi semua variabel secara bersamaan. Berikut model desain batas bawah dan batas atas dari variabel suhu dan variabel konsentrasi substrat.

Tabel 9 Rancangan batas bawah dan batas atas desain.

Kode	Name	Units	level -1	level + 1	alpha -	alpha +
A	Suhu	C	25	35	22.93	37.07
B	Konsentrasi	v/v	1	3	0.59	3.414

Pada gambar diatas dapat dilihat batas bawah dari suhu adalah 25 °C sedangkan batas atas 35 °C. Angka ini dipilih berdasarkan pertimbangan bahwa suhu optimum pada uji pendahuluan adalah 30 °C. Oleh karena itu, penulis merancang agar *central point* berada pada suhu 30 °C, dengan cara merancang desain suhu optimum dengan rentang batas bawah dan batas atas 25 °C-35 °C. Dengan alasan yang sama, penulis juga menentukan batas bawah dan batas atas dari konsentrasi suhu pada rentang 1%-3%, agar mendapatkan titik tengah atau *central point* pada nilai 2%. Kemudian RSM akan memberikan data kondisi yang harus difermentasi secara laboratorium untuk melihat kesesuaian model. Ada tiga belas titik yang harus dilakukan fermentasi. Berikut hasil fermentasi titik titik tersebut,

Tabel 10 Desain running fermentasi RSM dan hasilnya

suhu Vs Konsentrasi	aktifitas absorbansi	protein absorbansi	U/ml		mg/ml U	unit/mg spesifik
			y	<i>U aktfias</i>		
substrat	rata2	rata2	aktifitas	protein	protein	
22/2	0.0765	0.089	0.005	0.012	0.159	0.073
25/1	0.116	0.072	0.007	0.018	0.128	0.138
25/3	0.107	0.088	0.007	0.016	0.157	0.105
30/0.5	0.205	0.115	0.013	0.031	0.205	0.153
30/3.4	0.148	0.108	0.009	0.025	0.193	0.117
30/2	0.3992	0.129	0.025	0.061	0.239	0.266
30/2	0.309	0.121	0.020	0.047	0.216	0.219
30/2	0.292	0.124	0.019	0.045	0.221	0.202
30/2	0.3465	0.126	0.022	0.053	0.224	0.236
30/2	0.376	0.135	0.024	0.056	0.240	0.239
35/1	0.195	0.11	0.013	0.030	0.196	0.152
35/1	0.02775	0.054	0.002	0.004	0.096	0.044
37/2	0.0352	0.076	0.002	0.005	0.135	0.040

Berdasarkan hasil percobaan melakukan fermentasi ketiga belas titik diatas kita akan mendapatkan nilai aktifitas yang akan kita masukkan ke kolom diatas sebagai input RSM. Selanjutnya pemilihan model dilakukan berdasarkan beberapa parameter antara lain, jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Tests*) dan ringkasan model secara statistik (*Model Summary Statistics*). Model yang mungkin terpilih dari metode permukaan respon adalah model linier, 2FI (antara dua faktor), dan kuadratik.

4.4.1 Uji Pemilihan Model Berdasarkan *Sequential Model Sum of Square*

CCD memiliki banyak model matematika yang dapat digunakan untuk menentukan desain terbaik. Uji yang dilakukan saat ini, berdasarkan pada jumlah kuadrat dari urutan model, dimana model yang terbaik adalah model yang memiliki

nilai probabilitas kurang dari 5%. Nilai ini berarti ketidaktepatan model yang diberikan kurang dari 5%.

Tabel 11 Analisis *Sequential Model Sum of Square*

Sequential Model Sum of Squares [Type I]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	0.0125	1	0.0125			
Linear vs Mean	0.0002	2	0.0001	0.2234	0.8037	
2FI vs Linear	0.0002	1	0.0002	0.2998	0.5974	
Quadratic vs 2FI	0.0048	2	0.0021	64.922	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	3.66E-05	2	1.83E-05	0.4864	0.6412	Aliased
Residual	0.0002	5	3.77E-05			
Total	0.0172	13	0.0013			

Berdasarkan tabel diatas hanya model *Cubic vs Quadratik* yang dapat dijadikan kandidat model, karena satu satunya yang memiliki nilai probabilitas kurang dari 5%.

4.4.2 Uji Pemilihan Model Berdasarkan *Lack of fit*

Uji ini berdasarkan pada seberapa berpengaruh nilai *lack of fti* atau ketidak sesuai model. Parameter keberpengaruh ketidaktepatan model adalah nilai *p-value*. Secara spesifik tujuan dari uji ini adalah menguji kesesuaian model yang didesain dengan desain model orde 2. Berdasarkan uji *lack of fit* pada gambar dibawah model yang disarankan oleh *software design expert* adalah model *quadratic*.

Tabel 12 *Lack of fit*

Lack of Fit Tests						
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	0.0044	6	0.0007	15.510	0.0096	
2FI	0.0042	5	0.0008	17.987	0.0076	
Quadratic	3.77E-05	3	1.26E-05	0.2683	0.8458	Suggested
Cubic	1.05E-06	1	1.05E-06	0.0224	0.8882	Aliased
Pure Error	0.0002	4	4.68E-05			

4.4.3 Uji Pemilihan Model Berdasarkan R squared

Uji ini berdasarkan nilai *R Squared adjusted and Predicted* dimana nilai yang baik adalah nilai yang mendekati nilai 1.

Tabel 13 *Model Summary Statistic*

Model Summary Statistics						
Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.02131	0.042762	-0.14869	-0.55864	0.00740	
2FI	0.02210	0.073615	-0.23518	-1.05659	0.00976	
Quadratic	0.00567	0.952612	0.91876	0.881905	0.00056	Suggested
Cubic	0.006138	0.960331	0.904793	0.924205	0.00036	Aliased

Pada tabel diatas dapat dilihat model yang disarankan adalah model quadratic karena nilai *Rsquared adjusted dan R-Squared predicted* yang paling mendekati nilai 1 adalah model *cubic*. Sehingga *software* ini menyarankan model *quadratic*.

4.4.4 Uji ANOVA

Untuk mengetahui interaksi respon antar variabel dalam proses, analisis ini digunakan. Model persamaan ini, memiliki 2 term linier, 1 efek interaksi dan 2 efek kuadratik.

Tabel 14 ANNOVA Model Produksi lipase

Response						
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance tabel [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Model	0.004523	5	0.000905	28.14361	0.0002	significant
A-suhu	1.01E-05	1	1.01E-05	0.313083	0.5932	
B-Kosentrasi substrat	0.000193	1	0.000193	6.003616	0.0441	
AB	0.000146	1	0.000146	4.557606	0.0702	
A^2	0.003447	1	0.003447	107.2514	<	0.0001
B^2	0.001182	1	0.001182	36.76422	0.0005	
Residual	0.000225	7	3.21E-05			
Lack of Fit	3.77E-05	3	1.26E-05	0.268345	0.8458	not significant
Pure Error	0.000187	4	4.68E-05			
Cor Total	0.004748	12				

Pada tabel diatas A menggambarkan variabel suhu, B merupakan variabel konsentrasi. Parameter pengaruh signifikan dari suatu faktor adalah besarnya nilai probailitas p Value >F harus kurang dari 5%. Dari tabel diatas yang memiliki kriteria parameter ini adalah nilai suhu kuadrat dan nilai konsentrasi kuadrat. Dengan demikian kuadrat dari suhu dan konsentrasi sangat berpengaruh pada proses model ini. Nilai interaksi suhu dan konsentrasi sedikit signifikan karena ia

berada nilai 7%. Meskipun demikian nilai interaksi suhu dan konsentrasi masih sangat berkaitan karena nilai probabilitas p Value >F harus lebih besar mendekati 5%. Pada tabel diatas juga dapat dilihat nilai *lack of fit* tidak signifikan dibandingkan dengan kemungkinan eror murni. Sehingga, nilai 84.75% *lack of fit* yang terjadi disebabkan oleh *noise*. Nilai *lack of fit* yang tidak signifikan ini yang diinginkan dari suatu model.

Tabel 15 Nilai Keakuratan Desain

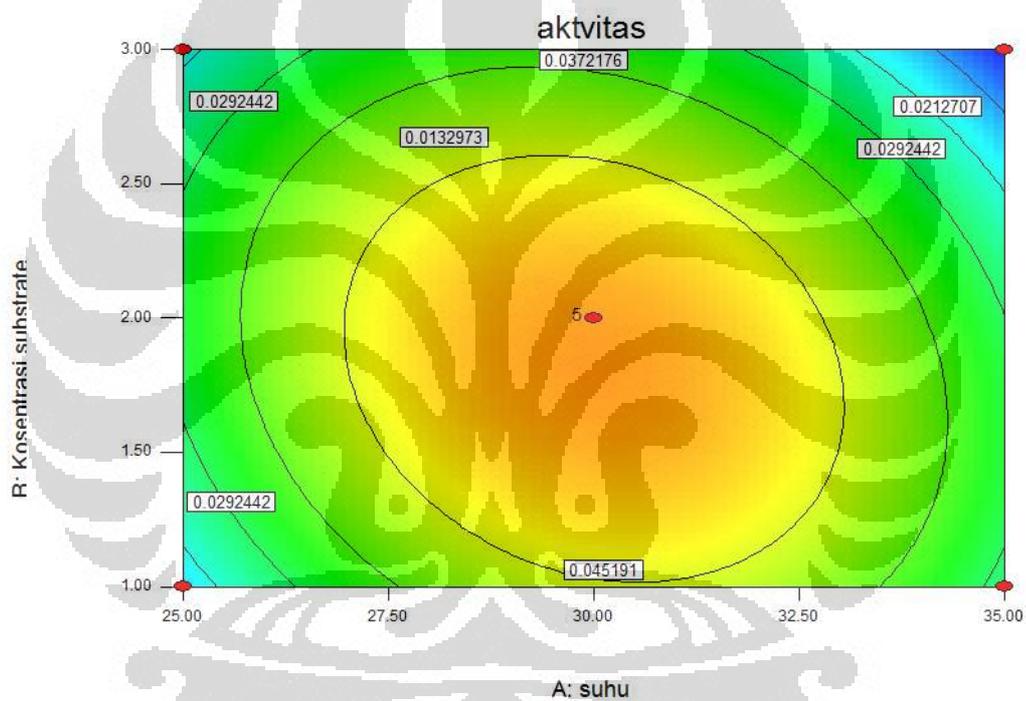
Std. Dev.	0.236479	R-Squared	0.952604
Mean	1.292291	Adj R-Squared	0.91875
C.V. %	18.29918	Pred R-Squared	0.881858
PRESS	0.975767	Adeq Precision	12.30041

Berdasarkan uji ANOVA pada tabel diatas diperoleh nilai koefisien determinasi $R^2=0,9526$ yang menunjukkan bahwa 95,26% variabel sampel pada produksi lipase dipengaruhi oleh variabel independen, dan hanya 4,74 % dari semua variabel yang tidak dapat dijelaskan oleh model. Dari tabel diatas dapat dilihat nilai deviasi yang rendah hanya 0.23. Nilai deviasi yang rendah menggambarkan keakuratan model tersebut. Dari tabel diatas juga hubungan nilai *pred R squared* 0.8819 dan nilai *Adj R Squared* 0.9187 cukup rasional untuk disimpulkan mereka berinteraksi dengan baik. Nilai *adj R squared* juga mengoreksi nilai R^2 , dimana nilai *adj R squared* bisa jadi lebih kecil dari nilai R^2 karena ukuran sample yang kecil (amin, et all, 2007). Nilai CV (18.2 %) menggambarkan tingkat residu antara nilai aktual dan nilai prediksi dari aktifitas enzim.

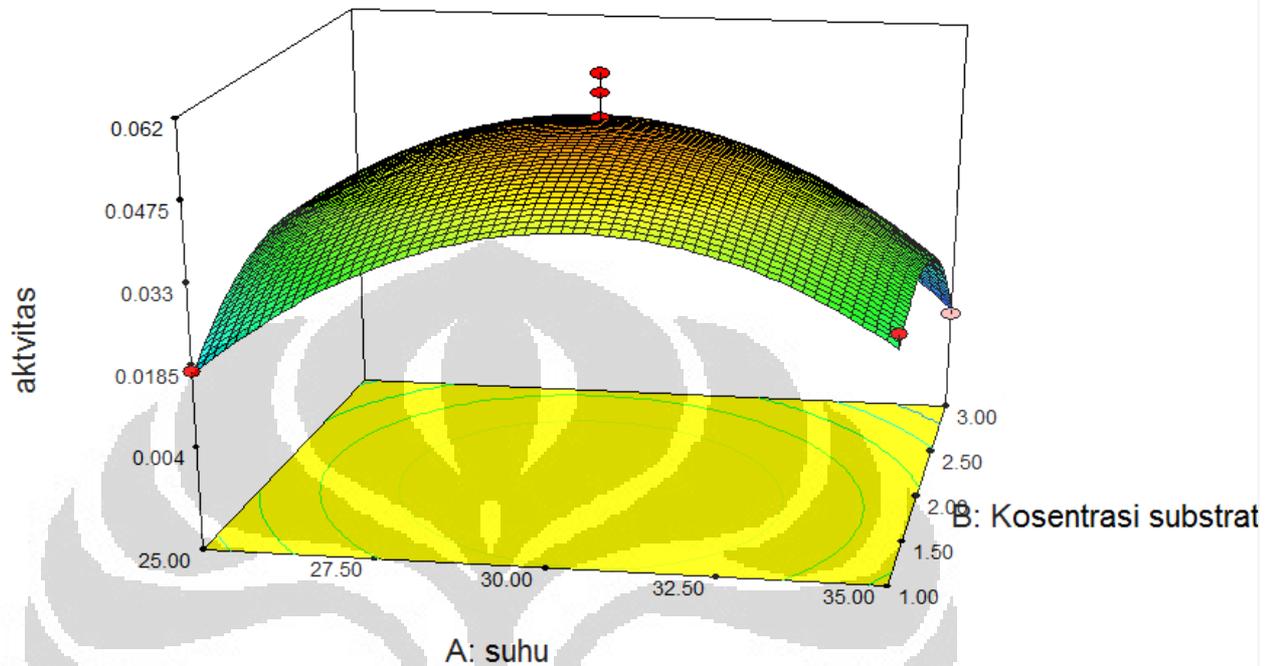
Persamaan dari model yang disarankan dari anova adalah demikian

$$\text{aktivitas} = -0.85691 + (0.055623 \times \text{suhu}) + (0.083533 \times \text{Konsentrasi substrat}) - (1.21036 \times 10^{-3} \times \text{suhu} \times \text{Konsentrasi substrat}) - (8.90452 \times 10^{-4} \times \text{suhu} \times \text{suhu}) - (0.013034 \times \text{Konsentrasi substrat} \times \text{Konsentrasi substrat})$$

Berdasarkan persamaan diatas dapat disimpulkan bahwa, pengaruh suhu dan konsentrasi substrat sangat berpengaruh terhadap produksi lipase. Hal ini dapat dilihat bahwa nilai variabel suhu dan variabel konsentrasi substrat memiliki tanda positif.



Gambar 15. Interaksi konsentrasi substrat dengan suhu untuk mendapatkan aktifitas maksimum pada produksi lipase bentuk counter



Gambar 16. Interaksi konsentrasi substrat dengan suhu untuk mendapatkan aktifitas maksimum pada produksi lipase bentuk 3D

4.5 Validasi Model

Setelah dilakukan berbagai proses analisis, *software design expert* akan memberikan saran optimasi dari desain yang diberikan, sebagai berikut

Tabel 16 Optimasi yang dilakukan oleh RSM

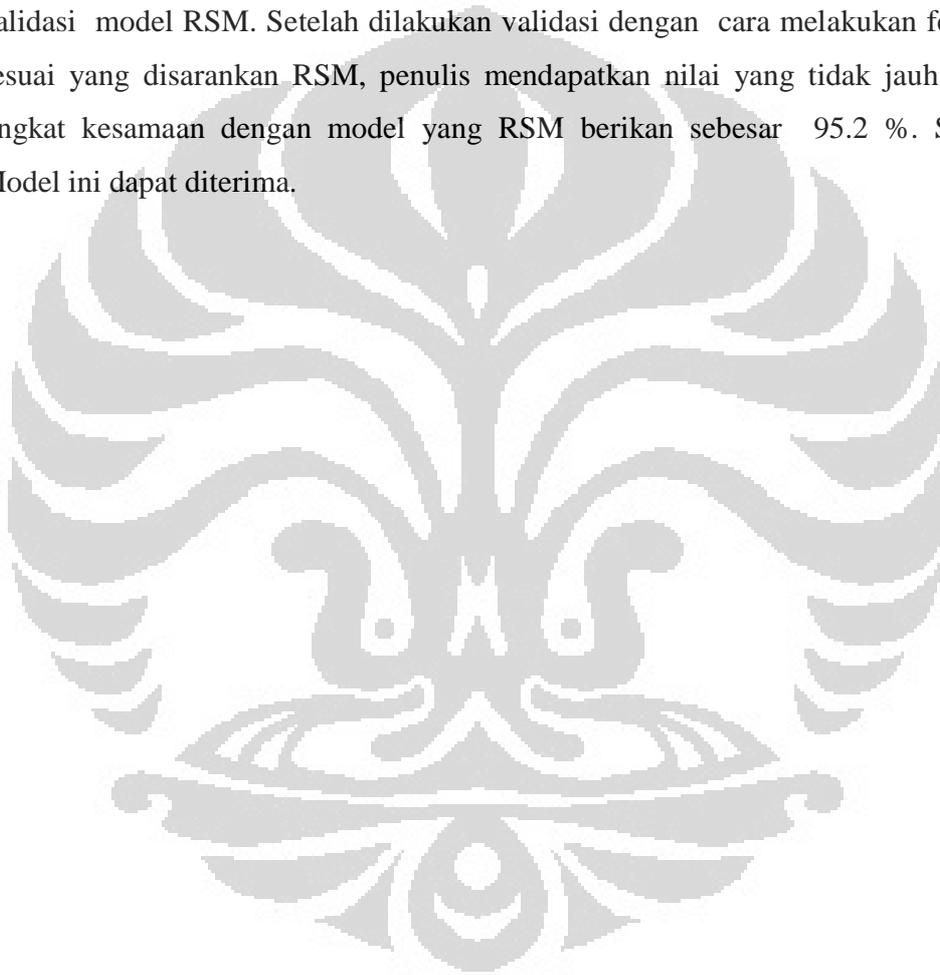
Solutions						
Number	Suhu	Kosentrasi substrat	Aktivitas	Desirability		
1	32.99	1.672	0.053	0.761	Selected	

Setelah dilakukan validasi didapatkan nilai aktifitas ebagai berikut,

Tabel 17 Validasi model RSM

Suhu	Kosentrasi substrat	absorbansi aktiftas rata-rata	Aktiftas
32.99033	1.672	0.311	0.0565

Setelah RSM memberikan saran titik mana yang harus divalidasi dilakukan uji validasi model RSM. Setelah dilakukan validasi dengan cara melakukan fermentasi sesuai yang disarankan RSM, penulis mendapatkan nilai yang tidak jauh berbeda, tingkat kesamaan dengan model yang RSM berikan sebesar 95.2 %. Sehingga, Model ini dapat diterima.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa,

1. Nilai aktiftas enzim lipase dengan substrat minyak jelantah sebesar 0.051 U/ml sedangkan nilai aktiftas enzim lipase dengan substrat minyak goreng dari palm oil dan minyak zaitun sebesar 0.057 U/ml dan 0.054 U/ml. Dari data tersebut dapat disimpulkan nilai aktiftas enzim dari minyak jelantah tidak jauh lebih baik dari minyak goreng dari kepala sawit dan minyak zaitun. Namun, perbedaan aktiftas minyak jelantah dengan minyak *palm oil* dan minyak zaitun reaktif kecil dan tidak terlalu signifikan, sehingga, minyak jelantah yang banyak di daerah Serpong masih dapat digunakan sebagai bahan pengganti substrat dalam produksi lipase menggunakan *Rhodotorula mucilaginosa*.
2. Kondisi optimum interaksi suhu dan konsentrasi substrat dari produksi lipase menggunakan jenis *Rhodotorula mucilaginosa* adalah 32.99 °C dan konsentrasi substrat 1.67%, menghasilkan aktiftas lipase sebesar 0.053 U/ml
Dengan persamaan model, sebagai berikut
aktvitas = $-0.85691 + (0.055623 \times \text{suhu}) + (0.083533 \times \text{Kosentrasi substrat}) - (1.21036 \times 10^{-3} \times \text{suhu} \times \text{Kosentrasi substrat}) - (8.90452 \times 10^{-4} \times \text{suhu} \times \text{suhu}) - (0.013034 \times \text{Kosentrasi substrat} \times \text{konsentrasi substrat})$

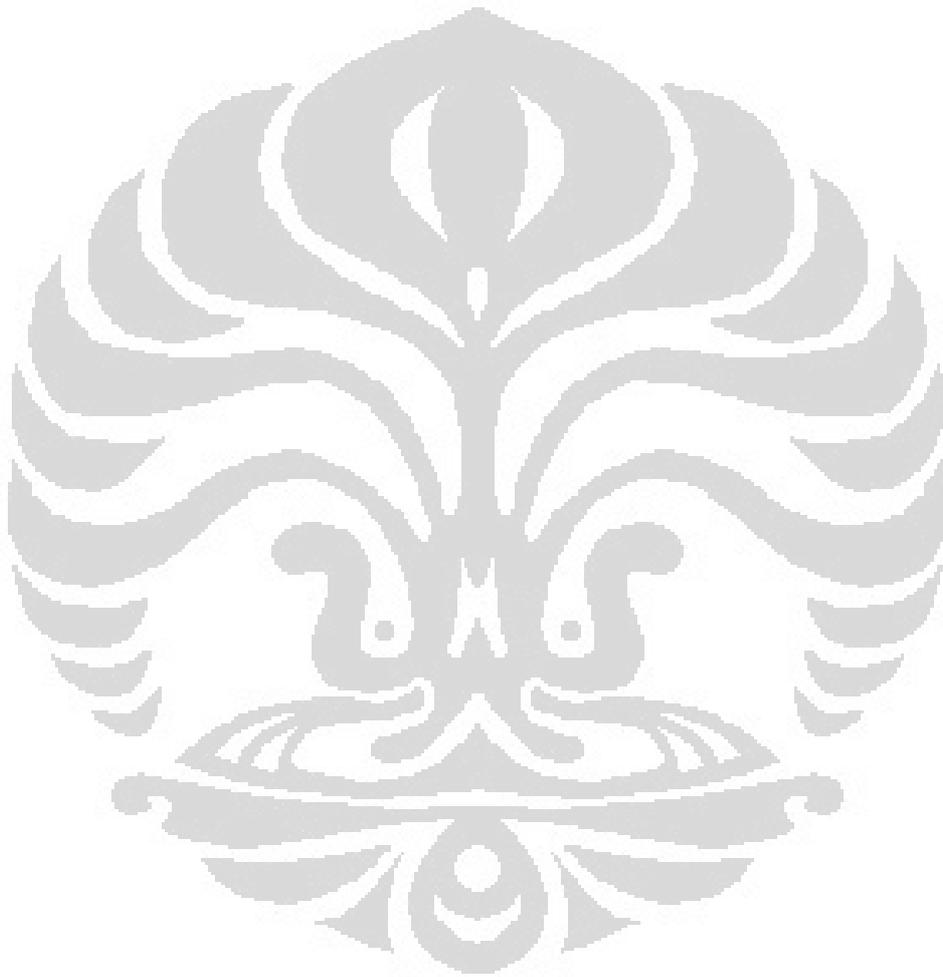
5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan dari penelitian ini, penulis menyarankan

1. Penelitian ini hanya memvariasikan 2 variabel. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi RSM kembali dengan variabel penting lebih dari dua macam agar keterkaitan antar faktor bisa lebih teroptimasi, sehingga didapatkan aktiftas enzim yang maksimum untuk skala yang lebih besar. Faktor penting lainnya yang dapat dioptimasi antara lain, agitasi, aerasi, pH,

lama inkubasi, konsentrasi substrat , medium, sumber nitrogen dan suhu produksi enzim

2. Pengukuran enzim sebaiknya dalam keadaan murni bukan dalam keadaan crude enzim untuk hasil yang lebih persisi.



DAFTAR PUSTAKA

- Amin M, Bhatti HN, Perveen F (2008). Production, partial purification and thermal characterization of β -Amylase from *Fusarium solani* in solid-state fermentation. *J. Chem. Soc. Pak.* 30: 480-485.
- Avneet kour. *Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene.* Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 Vol.9 No.1, Issue of January 15, 2006
- Balia, R., L. 2004. Potensi dan Prospek *Yeast* (Khamir) dalam Meningkatkan Diversifikasi Pangan di Indonesia. Universitas Padjajaran, Bandung.
- Bancerz, R., Ginalska G., and Gromada, F. 2005. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9 ϕ . *Microbiol Biotechnol.* 32: 253–260
- Benjamin S, Pandey A (1997). Coconut cake-a potent substrat for the production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. *Acta Biotechnologia*, 17: 241-251.
- Benjamin S, Pandey A (1998). Mixed-solid substrat fermentation: A novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. *Acta Biotechnologia*, 18: 315-324.
- Bennett, J. E. 1990. Searching for the *yeast* connection [editorial; comment] [see comments]. *N Engl J Med.* 323:1766-7.
- Bhatti HN, Nawaz S (2009). Production of endoglucanase by *Fusarium solani* grown in solid-state fermentation. *Asian J. Chem.* 21: 1943- 1948.
- Bhatti HN, Rashid MH, Nawaz R, Asgher M, Perveen R, Jabbar A(2007). Optimization of media for enhanced glucoamylase production in solid-state fermentation by *Fusarium solani*. *Food Technol. Biotechnol.* 45, 51-56.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microorganism quantities of protein, using the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Dutra JC, da Terzi S, Bevilaqua JV et al (2008) Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Appl Biochem Biotechnol* 147:63–75
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al. (2005). "A comprehensive classification system for lipids". *Journal of Lipid Research* 46 (5): 839–61. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200. PMID 15722563
- Fukuda H, Kondo A, Noda H (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416. Ghanem A, Aboul-Enein HY (2004). Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron*, 15: 3331-3351.
- Ghanem EH, Al-Sayeed HA, Saleh KM: An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J Microb Biot* 2000, 16:459-464.
- Gunawan ER, Basri M, Rahman MBA, Salleh AB, Rahman RNZA: Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. *Enzyme Microb Technol* 2005, 37:739-744.
- Gupta N, Sahai V, Gupta R: Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans* : Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem* 2007,42:518-526.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(6): 763-781.
- Gupta N, Rathi P, Gupta R (2002). Simplified p-nitrophenyl palmitate assay for lipase and esterases. *Anal. Biochem.* 311: 98-99. Kaushik R, Saran S, Israr J,
- Guo Z, Xu X. 2005. New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. *Org Biomol Chem* 3 (14): 2615-2619.
- Gutarra MLE, Godoy MG, Maugeri F et al (2009) Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 100:5249–5254

- Hasan F, Shah AA, Hameed A: Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microb Technol* 2006, 39:235-251.
- Hernández-Rodríguez B, Cordova J, Bárzana E et al (2009) Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *J Mol Catal B Enzym* 61:136–142
- Jyoti vakhlu. 2006. *Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning*. Department of Biotechnology University of Jammu Jammu-180006 (J&K)cIndia Tel: 094191-17624
- Kumar SS, Gupta R (2008). An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochem*. 43: 1054- 1060.
- Kumar S, Katiyar N, Ingle P et al (2011) Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrat for lipase production. *Bioresour Technol* 102:4909–4912
- Kumar R, Mahajan S, Kumar A, Singh D (2010). Identification of variabels and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnol*. doi:10.1016/j.nbt.2010.06.007.
- Kurtzman, C. P., and J. W. Fell (ed.). 2000. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Larios A, Garcia HS, Oliart RM, Valerio-Alfaro G (2004). Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 65: 373-376.
- Lotti M, Monticelli S, Montesinos JL, Brocca S, Valero F, Lafuente J: Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem Phys Lipids* 1998, 93:143-148.
- Lowry, O. Nira, J. R., Lewis, F., dan Rose J.R. 1951. *Protein Measurement With The Follin Phenol Reagent*. Washington University School of Medicine. St. Louis

- Maeder, M., P. R. Vogt, G. Schaer, A. von Graevenitz, and H. F. Gunthard. 2003. Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Infection*. 31:181-3
- Martinez-Rodriguez A, Garcia HS, Saucedo- Castañeda G et al (2008) Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 151:393–401
- Mala JG, Edwinoliver NG, Kamini NR et al (2007) Mixed substrat solid-state fermentation for production and extraction of lipase .*Gen Appl Microbiol* 53:247–53
- Monteiro JB, Nascimento MG, Ninow JL (2003). Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous sistem. *Biotechnol. Lett.* 25: 641-644.
- Raimbault M, Alazard D (1980) Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 9:199–209
- Rajendran A, Palanisamy A, Thangavelu V (2008). Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. *Chin. J. Biotechnol.* 24, 436-444.
- Rajendran A, Thangavelu V (2009). Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Sci. Technol.* 42, 985-992.
- Retra Roza. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Produksi, Karakterisasi dan Pemurnian Parsial Lipase dari Isolat UICC Y-422 serta Aplikasinya dalam Reaksi Transesterifikasi.2010. Serpong-Unair
- Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J et al(2006) Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid-state fermentation. *Proc Biochem* 44:2264–2269
- Rigo E, Ninowa JL, Di Luccio M et al (2010) Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Sci Technol* 43:1132–1137

- Osório NM, Ferreira-Dias S, Gusmão JH, da Fonseca MMR: Response surface modelling of the production of ω -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *J Mol Catal B: Enzym* 2001, 11:677-686.
- Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS (2003). Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods*, 52: 1-18.
- Sifour M, Zaghoul TI, Saeed HM, Berekaa MM, Abdel-fattah YR (2010). Enhanced production of lipase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental design. *New Biotechnol.* (27): 330-336. Amin et al. 5523
- Shaheen I, Bhatti HN, Ashraf T (2008). Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. *Int.J. Food Sci. Technol.* 43, 1152- 1158.
- Sharma R, Soni SK, Vohra RM, Jolly RS, Gupta LK, Gupta JK: Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Ind J Microbiol* 2002, 42:49-54.
- Shukla P, Garai D, Zafar M, Gupta K, Shrivastava S (2007). Process parameters optimization for lipase production by *Rhizopus oryzae* kg- 10 under submerged fermentation using response surface methodology. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.* 2: 93-103.
- Saucedo-Castañeda G, Trejo-Hernández MR(1994) On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Proc Biochem* 29:13–24
- Sexana RK (2006). Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 40: 121-126.
- Soberón-Chávez G, Palmeros B. 1994. *Pseudomonas* lipases: molecular genetics and potential industrial applications. *Crit Rev Microbiol* 20(2): 95-105. (Inggris)

- Sugihara A, Tani T, Tominaga Y: Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J Biochem* 1991, 109:211-215. 28.
- Bora L, Kalita MC: Production and Optimization of Thermostable lipase from a Thermophilic *Bacillus* sp LBN 4. *The Internet J Microbiol* 2007, 4(1):.
- Sun SY, Xu Y (2008). Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochem.* 43: 219-224.
- Svendsen A. 2000. Lipase protein engineering. *Biochem Biophys Acta* 1543(2): 223-228 : (Ingris)
- Svendsen A: *Enzyme Functionality, Design, Engineering, and Screening* New York: Marcel Dekker, Inc; 2004.
- Sztajer H, Maliszewska I, Wieczorek J: Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme Microb Technol* 1988, 10:492-497.
- Teng Y, Xu Y (2008). Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresour. Technol.* 99: 3900-3907.
- Vakhlu, J., dan Kour, A. 2006. *Yeast* lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (1).
- Variketta M., Namboodiri, H., and Chattopadhyaya, R. 2000. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Aspergillus niger*, Paper no. L8402 in *Lipids*. 35, 495–502
- Wang D, Xu Y, Shan T (2008). Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochem. Eng. J.* 41: 30-37.
- Yagiz F, Kazan D, Akin AN (2007). Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chem. Eng. J.* 134: 262-267.

LAMPIRAN

Gambar *Rhodotorula* dalam media agar, dalam bentuk berkelompok, koloni tunggal, dan dalam agar miring



Gambar Tabung setelah fermentasi



Pemilihan Substrat

substrat	Absorbansi
goreng	0.3595
jelantah	0.2855
olive	0.305

Absorbansi pengukuran Aktifitas Sample Pada Pemilihan Suhu Optimum

Suhu Palm Oil	absorbansi
27	0.184
30	0.3935
33	0.35
35	0.118
37	0.052
40	0.108

Suhu Olive Oil	Absorbansi
27	0.182
30	0.305
33	0.211
37	0.102
40	0.181

Suhu Jelantah	Absorbansi
27	0.119
30	0.289
33	0.19
37	0.07
40	0.106

Absorbansi pengukuran Protein Sample Pada Pemilihan Suhu Optimum

T Palm oil	Absorbansi
27	0.092
30	0.142
33	0.1385
35	0.102
37	0.098
40	0.088

T Olive	Absorbansi
27	0.092
30	0.122
33	0.115
37	0.09902
40	0.112

T jelantah	absorbansi
27	0.092
30	0.118
33	0.116
37	0.088
40	0.093

Absorbansi pengikiran konsentrasi substrat

konsentrasi	absorbansi aktifitas	aktiftas U/ml
1%	0.282	0.503543241
2%	0.4335	0.774063812
4%	0.1645	0.293733557
6%	0.152	0.271413378
10%	0.112	0.199988805
40%	0.148	0.264270921

konsentrasi	Absorbansi Protein	mg/ml
1%	0.389	0.69631
2%	0.58	1.0382
4%	0.311	0.55669
6%	0.296	0.52984
10%	0.29	0.5191
40%	0.261	0.46719
60%	0.2562	0.458598

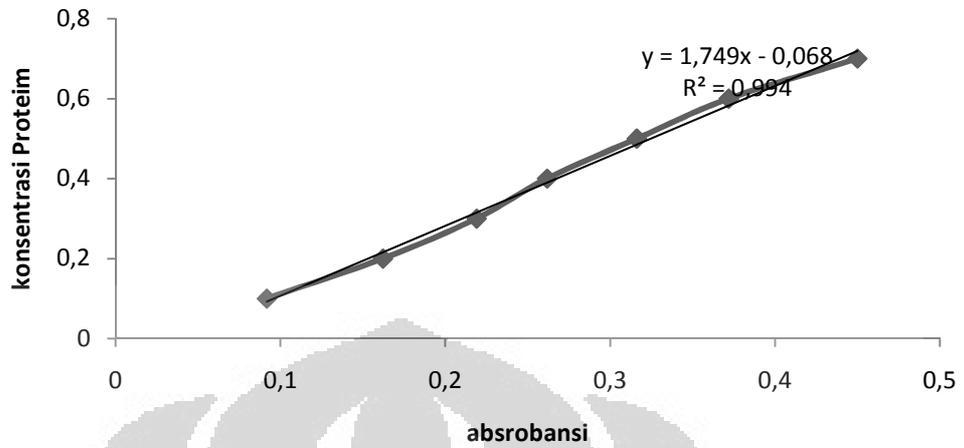
Model Respon Surface Dan Hasilnya

Model RSM	aktifitas absorbansi rata2	protein absorbansi rata2	spesifik absorbansi	y aktifitas	U aktfias	y protein	U protein	unit/mili spesifik
22/2	0.0765	0.189199	0.404336	0.048836	0.11702	0.336774	0.336774	0.347474
25/1	0.116	0.172	0.674419	0.074052	0.177443	0.30616	0.30616	0.579574
25/3	0.107	0.188	0.569149	0.068307	0.163675	0.33464	0.33464	0.489109
30/0.5	0.205	0.2153	0.95216	0.130868	0.313584	0.383234	0.383234	0.818257
30/3.4	0.148	0.20833	0.710411	0.09448	0.226392	0.370827	0.370827	0.610505
30/2	0.3992	0.229	1.743231	0.254841	0.610647	0.40762	0.40762	1.498079
30/2	0.309	0.2212	1.396926	0.197259	0.47267	0.393736	0.393736	1.200475
30/2	0.292	0.224	1.303571	0.186407	0.446666	0.39872	0.39872	1.120249
30/2	0.3465	0.226	1.533186	0.221199	0.530033	0.40228	0.40228	1.317572
30/2	0.376	0.235	1.6	0.240031	0.575158	0.4183	0.4183	1.37499
35/1	0.195	0.21	0.928571	0.124484	0.298287	0.3738	0.3738	0.797985
35/1	0.02775	0.154	0.180195	0.017715	0.042449	0.27412	0.27412	0.154854
37/2	0.0352	0.176	0.2	0.022471	0.053845	0.31328	0.31328	0.171874

Kurva standar Protein

Konsentrasi	Absorbansi
0.1	0.09175
0.2	0.16225
0.3	0.219
0.4	0.26175
0.5	0.3162
0.6	0.372
0.7	0.45

Kurva Standar Protein



Kurva standar Aktifitas

absorbansi	Konsentrasi
0.025	0
0.1882	0.01
0.301	0.02
0.448	0.03
0.63	0.04
0.78	0.05
0.882	0.06
0.9273	0.07

Kurva Standar Aktifitas

