



UNIVERSITAS INDONESIA

**“STUDI OPTIMASI ESTERIFIKASI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK KELAPA DENGAN GLUKOSA MENGGUNAKAN LIPASE
Candida rugosa EC 3.1.1.3 TERIMMOBILISASI PADA MATRIKS ZEOLIT”**

SKRIPSI

BALI SUSILO

0806326550

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**“STUDI OPTIMASI ESTERIFIKASI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK KELAPA DENGAN GLUKOSA MENGGUNAKAN LIPASE
Candida rugosa EC 3.1.1.3 TERIMMOBILISASI PADA MATRIKS ZEOLIT”**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana sains

BALI SUSILO

0806326550

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

2012

Universitas Indonesia

Studi optimasi..., Bali Susilo, FMIPA UI, 2012.

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Bali Susilo

NPM : 0806326550

Tanda Tangan :



Tanggal : 3 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

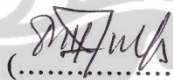
Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Bali Susilo
 NPM : 0806326550
 Program Studi : Kimia S1 Reguler
 Judul Skripsi : Studi Optimasi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimmobilisasi Pada Matriks Zeolit

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS


 (.....)

Pembimbing : Dra. Sri Handayani, M.Biomed


 (.....)

Penguji : Prof. Dr. Usman Sumo Friend Tambunan


 (.....)

Penguji : Dra. Siswati Setiasih Apt., M.S


 (.....)

Penguji : Dr. Emil Budianto


 (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 3 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa , yang telah melimpahkan berkat , rahmat, serta pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul Studi Optimasi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimmobilisasi Pada Matriks Zeolit ini tepat pada waktunya. Tugas akhir ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis untuk meraih gelar Sarjana Sains di Program Studi S1 Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Dalam penyusunan tugas akhir ini, penulis banyak mendapatkan bantuan selama penelitian maupun dalam penyusunan tugas akhir serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Sumi Hudyono, PWS dan Ibu Dra. Sri Handayani M.Biomed, selaku dosen pembimbing, yang telah membimbing, memberi pengarahan, bantuan moril dan materil dalam penyusunan tugas akhir ini. Terima kasih atas segala bantuan serta diskusinya.
2. Bapak Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia, Universitas Indonesia.
3. Kedua Orang Tua serta Adik tercinta yang selalu menemani dan menguatkan dikala suka maupun duka.
4. Bapak Drs. Erzi Rizal Azwar, selaku Pembimbing Akademis penulis dalam empat tahun perjalanan di Departemen Kimia FMIPA UI.
5. Bapak Dr. Yoki Yulizar, dan Bapak Drs. Markus Sutiono yang telah memberikan bantuan bahan-bahan penelitian.
6. Dewan penguji, Prof. Dr. Usman Sumo FT , Dra. Siswati Setiasih, Apt.,M.S , Dr. Emil Budianto yang telah bersedia menguji dan memberi koreksi berharga bagi penulisan skripsi ini.

7. Mba Emma, Mba Tri, Mba Ina, Mba Cucu, sebagai laboran Departemen Kimia, yang telah membantu dalam penyediaan bahan-bahan penelitian dan diskusi mengenai penelitian.
8. Kak Awe dan Kak Ikan, pendahulu yang sudah bersedia direpotkan dalam diskusi-diskusi penelitian.
9. Teman seperjuangan kelompok penelitian, Qnoy “kuncrung”, Sari “the perfect”, Desti Dian Dillah “the 3D”, dalam melaksanakan penelitian ini. Terima kasih telah membantu dalam diskusi maupun kerjasama.
10. KMK FMIPA UI yang sudah menjadi keluarga kedua di kampus dikala suka maupun duka, senang maupun sedih. Banyak kegiatan bersama yang tidak akan terlupakan.
11. Paduan Suara Mahasiswa Paragita UI dimana penulis telah dipercaya sebagai pianis selama 4 tahun kuliah di UI dan memberikan warna lain dalam dunia perkuliahan.
12. Geng Paragita 2008 , yang merupakan teman seperjuangan 4 tahun di UI dan di Paragita. “Seru sekali bersama 4 tahun latihan, lomba, dan konser bersama, sampai jumpa di balairung”
13. Daniel , Anthony , Andreas , sebagai teman seperjuangan dengan mata kuliah yang tak lain dan tak bukan adalah PES sepanjang 8 semester. “Sukses untuk masa depan!”
14. Jojon, Boy, dan Adi sebagai teman diskusi, tetapi terlebih sebagai teman yang menghibur kala bermain *game*.
15. Teman-teman lantai 4, yang kehadirannya selalu terlihat ceria, menyenangkan, dan penuh tawa, Prilly, Decil, Esti, Hafiz, Putri, Daniel, Intan, Rasti, Lidya, Kak Widi, Linyo, Kak Fani dan teman-teman S2 lainnya.
16. Teman-teman lantai 3, Andi, Hadi, Reza, Budi, Asa, Pandu, Dewi, Nia, Mika, Michu, Khusnul, One, Asef, Kak Habibah, Inna, Irna.
17. Kakak Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI yang sudah membantu dalam melakukan pengukuran dengan instrumen-instrumen di kimia.

18. Seluruh karyawan Departemen Kimia FMIPA UI atas segala bantuannya, terutama untuk Pak Sutrisno (Babeh), Pak Amin, Pak Kiri, Pak Wito, dll.
19. Teman-teman angkatan 2008 yang selama empat tahun terakhir ini berjuang bersama di Departemen Kimia dengan pengalaman tak terlupakan pada kelas Metabolisme 2011 yang lalu.
20. Murid-murid piano yang sudah memberikan keceriaan dan semangat dalam melanjutkan pengerjaan tugas ini. “Maaf jadi suka mengganti jadwal les”
21. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

Penulisan tugas akhir ini disadari masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, sangat diharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang. Akhir kata penulis berharap semoga tugas akhir ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu di masa mendatang.

Penulis,

2012

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

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

Nama : Bali Susilo
NPM : 0806326550
Program Studi : S1 Kimia Reguler
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Studi Optimasi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimmobilisasi Pada Matriks Zeolit 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 : Juli 2012

Yang menyatakan,



(Bali Susilo)

ABSTRAK

Nama : Bali Susilo
Program Studi : S1 Kimia Reguler
Judul : Studi Optimasi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimmobilisasi Pada Matriks Zeolit

Ester asam lemak glukosa merupakan ester hasil sintesis asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan glukosa. Ester ini dapat disintesis melalui reaksi enzimatik dengan katalis lipase *Candida rugosa*. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pada esterifikasi menggunakan lipase *Candida rugosa* bebas berhasil mensintesis ester asam lemak karbohidrat menggunakan pelarut n-heksana. Pada penelitian ini reaksi enzimatik dilakukan menggunakan katalis terimmobilisasi pada zeolit. Optimasi immobilisasi dilakukan dengan variasi suhu immobilisasi dan rasio enzim : zeolit. Kondisi optimum yang didapatkan adalah pada suhu immobilisasi 37°C dan rasio enzim : zeolit 1:3 dengan % enzim yang terimmobilisasi sebesar 74,81 % dan aktivitasnya 0,283 U/mg, dengan efisiensi 35,27% dari aktivitas enzim bebas. Optimasi kondisi esterifikasi dilakukan dengan variasi suhu, rasio substrat, waktu inkubasi, dan berat *molecular sieve* dan didapatkan % konversi produk tertinggi 8,745% pada kondisi suhu 40°C, rasio asam lemak:glukosa 1:60, waktu inkubasi 16 jam, serta berat *molecular sieve* 1,1 g.

Kata Kunci : esterifikasi, immobilisasi enzim, lipase *Candida rugosa*, asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa, zeolit

xvi + 76 halaman : 29 gambar ; 17 lampiran ; 9 tabel

Daftar Pustaka : 43 (1986 – 2011)

ABSTRACT

Name : Bali Susilo
Study Progame : Chemistry
Title : Optimization Study of Esterification between Hydrolysis
Result of Fatty Acid from Coconut Oil with Glucose Using
Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Immobilized in Zeolite
Matrix

Fatty acid ester glucose is an ester synthesized from fatty acid result of hidrolized coconut oil with glucose. It can be synthesized via enzymatic reaction with lipase *Candida rugosa* as catalyst. Previous research has demonstrated esterification reaction using free *Candida rugosa* enzymes succeed to synthesize carbohydrates fatty acid ester. In the present study the enzymatic reactions was performed using immobilized enzymes in zeolite support. Optimization of immobilize enzyme was done by temperature variations and the ratio of enzyme : zeolite. The optimum conditions were obtained at a temperature of 37 °C and the ratio of enzyme : zeolite 1:3 in weight percentages that makes the enzyme loading of 74,81% and specific activity 0,283 U / mg, which is the efficiency of 35,27% compared to free enzyme. Optimization of esterification conditions was performed with variations in temperature, substrate ratio, incubation time, and the weight of molecular sieve and obtained top conversion 8,745% at 40 ° C temperature conditions, the ratio of fatty acid: glucose 1:60, incubation time of 16 hours and the weight of a molecular sieve 1,1 g

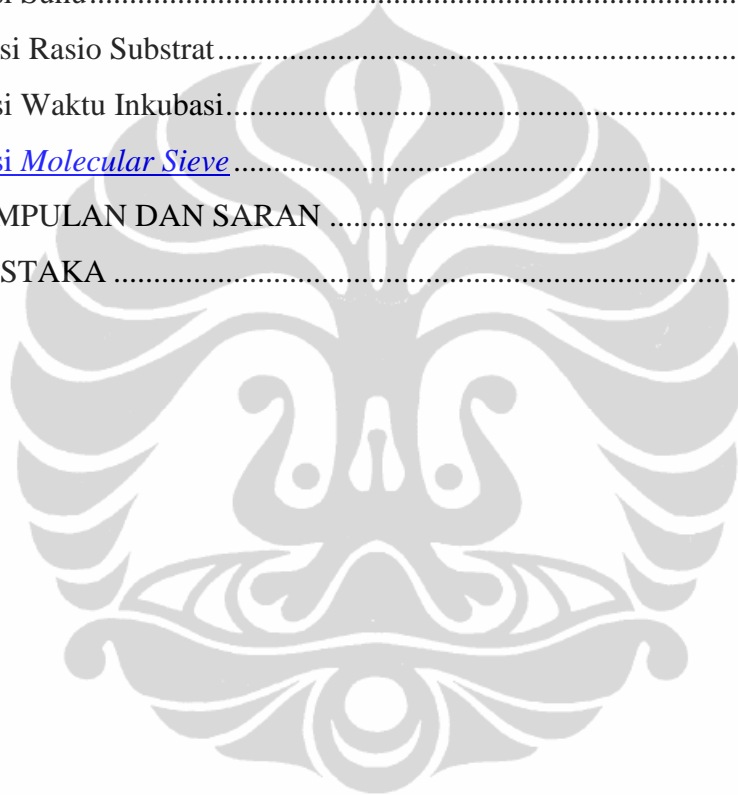
Keywords: esterification, enzyme immobilization, lipase *Candida rugosa*, hidrolized fatty acid from coconut oil, zeolite

DAFTAR ISI

<u>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</u>	ii
<u>HALAMAN PENGESAHAN</u>	iii
<u>KATA PENGANTAR</u>	iv
<u>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI</u>	viii
<u>ABSTRAK</u>	ix
<u>ABSTACT</u>	x
<u>DAFTAR ISI</u>	xi
<u>DAFTAR GAMBAR</u>	xiv
<u>DAFTAR TABEL</u>	xv
<u>DAFTAR LAMPIRAN</u>	xvi
<u>BAB 1 PENDAHULUAN</u>	1
<u>1.1 Latar Belakang</u>	1
<u>1.2 Perumusan Masalah</u>	3
<u>1.3 Tujuan Penelitian</u>	3
<u>1.4 Hipotesis</u>	3
<u>1.5 Manfaat Penelitian</u>	3
<u>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</u>	5
<u>2.1 Tanaman Kelapa</u>	5
<u>2.2 Minyak Kelapa</u>	6
<u>2.3 Glukosa</u>	6
<u>2.4 Enzim</u>	7
<u>2.4.1 Mekanisme Kerja Enzim</u>	8
<u>2.4.2 Klasifikasi dan Penamaan Enzim</u>	10
<u>2.5 Lipase</u>	12
<u>2.5.1 Sumber Lipase</u>	13
<u>2.6 Lipase <i>Candida rugosa</i></u>	14
<u>2.6.1 Sisi Aktif Lipase <i>Candida rugosa</i></u>	14

2.6.2 Lipase <i>Candida rugosa</i> Terimmobilisasi	15
2.7 Zeolit sebagai Media Immobilisasi	16
2.8 <i>Molecular Sieve</i>	17
2.9 Esterifikasi	18
2.10 Ester Asam Lemak Karbohidrat	19
2.11 <i>Emulsifier</i>	19
BAB 3 METODE PENELITIAN	21
3.1 Alat dan Bahan	22
3.1.1 Alat-Alat yang Digunakan	22
3.1.2 Bahan-Bahan yang Digunakan	22
3.2 Prosedur Kerja	23
3.2.1 Preparasi Asam Lemak dari Minyak Kelapa	23
3.2.2 Imobilisasi Enzim dalam Matriks Zeolit	23
3.2.3 Aktivasi <i>Molecular Sieve</i>	24
3.2.4 Menentukan Aktivitas <i>Free Lipase</i> dan <i>Lipase Terimmobilisasi</i>	24
3.2.5 Menentukan Konsentrasi <i>Lipase Terimmobilisasi</i>	25
3.2.6 Esterifikasi Asam Lemak dengan Glukosa Dengan Enzim Terimmobilisasi	26
3.2.7 Esterifikasi Asam Lemak dengan Glukosa Dengan Enzim Bebas sebagai pembanding	26
3.2.8 Terminasi Reaksi Esterifikasi	27
3.2.9 Pemurnian Hasil Esterifikasi	27
3.2.10 Analisis Hasil Esterifikasi	27
3.2.11 Identifikasi Produk	27
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Hidrolisis Trigliserida	28
4.2 Immobilisasi Enzim	31
4.2.1 Aktivasi Zeolit Alam	31
4.2.2 2 Karakterisasi Zeolit Sebelum Aktivasi dan Setelah Aktivasi	32
4.2.3 Immobilisasi Lipase	35
4.2.4 Penentuan Aktivitas <i>Free Lipase</i>	36

4.2.5 Optimasi Immobilisasi dengan Variasi Suhu	37
4.2.6 Optimasi Immobilisasi dengan Variasi Rasio Enzim : Zeolit	38
4.3 Esterifikasi Glukosa dengan Asam Lemak Minyak Kelapa	40
4.3.1 Esterifikasi Menggunakan Enzim Bebas Sebagai Pembanding	40
4.3.2 Esterifikasi Menggunakan Enzim Terimmobilisasi	43
4.4 Optimasi Reaksi Esterifikasi	44
4.4.1 Optimasi Suhu	44
4.4.2 Optimasi Rasio Substrat	46
4.2.5 Optimasi Waktu Inkubasi	48
4.2.6 Optimasi <i>Molecular Sieve</i>	49
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	51
DAFTAR PUSTAKA	53

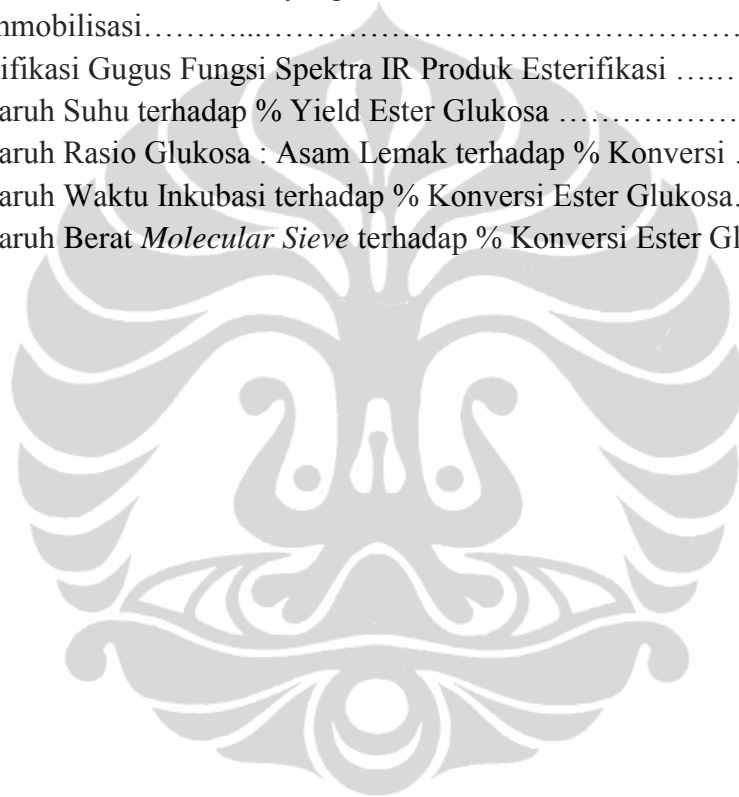


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kelapa.....	5
Gambar 2.2 Struktur D-Glukosa.....	7
Gambar 2.3 Bagian–Bagian Enzim.....	8
Gambar 2.4 Pengikatan Substrat Pada Enzim Di Bagian Sisi Katalitik.....	9
Gambar 2.5 Teori mekanisme kerja enzim A) <i>Lock and Key Theory</i> (B) <i>Induced Fit</i> 10.....	10
Gambar 2.6 Reaksi – reaksi yang dikatalisis lipase	13
Gambar 2.7 Lipase <i>Candida rugosa</i>	15
Gambar 2.8 Kerangka Zeolit.....	16
Gambar 2.9 Mekanisme Reaksi Esterifikasi Dengan Kehadiran Katalisis Asam..	19
Gambar 3.1 Bagan Kerja Secara Umum.....	21
Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Trigliserida dengan Katalis Basa KOH.....	30
Gambar 4.2 Fasa Organik dan Air Hasil Hidrolisis Trigliserida.....	31
Gambar 4.3 Asam Lemak hasil Hidrolisis Minyak Kelapa	32
Gambar 4.4 Zeolit Sebelum Aktivasi (kiri) dan Setelah Aktivasi (kanan).....	33
Gambar 4.5 Spektra IR zeolit sebelum aktivasi (merah) dan setelah diaktivasi (biru)	34
Gambar 4.6 Zeolit alam teraktivasi pada perbesaran 10.000 x (a),50.000 x (b),dan 100.000 x (c) dengan detektor SE 24.....	35
Gambar 4.7 Enzim terimmobilisasi pada zeolit dianalisa pada perbesaran 10.000 kali menggunakan 2 detektor berbeda (a) SE (b) BSE 24.....	36
Gambar 4.8 Enzim Terimmobilisasi.....	37
Gambar 4.9 Grafik Variasi Suhu vs Aktivitas Enzim Terimmobilisasi.....	38
Gambar 4.10 Kurva standar BSA pada metode Lowry	39
Gambar 4.11 Grafik % Enzim yang Masuk dan Aktivitas Enzim Immobil.....	40
Gambar 4.12 Hasil Reaksi Esterifikasi a) Sebelum dan b) Sesudah Sentrifugasi...42	
Gambar 4.13 Spektra IR produk Esterifikasi Dengan Lipase Bebas	43
Gambar 4.14 Hasil Emulsi Minyak dan Air	44
Gambar 4.15 Hasil reaksi esterifikasi a) Setelah Serminasi dan b) Setelah Sentrifugasi	44
Gambar 4.16 Hasil Emulsi Minyak dan Air Menggunakan Produk Hasil Reaksi Esterifikasi Dengan Enzim Terimmobilisasi	45
Gambar 4.17 Grafik Hubungan Suhu Reaksi vs % Konversi Ester Glukosa.....	46
Gambar 4.18 Grafik Hubungan Rasio Substrat vs % Konversi Ester Glukosa....	48
Gambar 4.19 Grafik Hubungan Waktu Inkubasi vs % Konversi Ester Glukosa ...	49
Gambar 4.20 Grafik Hubungan Berat <i>Molecular Sieve</i> vs % Konversi Ester.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Nomenklatur Enzim.....	11
Tabel 4.1 Identifikasi Gugus Fungsi Spektra IR Zeolit Sebelum Aktivasi dan Sesudah Aktivasi.....	34
Tabel 4.2 Data Variasi Suhu dan Aktivitas Enzim Terimmobilisasi	38
Tabel 4.3 Data Variasi Rasio, Enzim yang masuk, dan Aktivitas Enzim Terimmobilisasi.....	40
Tabel 4.4 Identifikasi Gugus Fungsi Spektra IR Produk Esterifikasi	43
Tabel 4.5 Pengaruh Suhu terhadap % Yield Ester Glukosa	46
Tabel 4.6 Pengaruh Rasio Glukosa : Asam Lemak terhadap % Konversi	48
Tabel 4.7 Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap % Konversi Ester Glukosa.....	49
Tabel 4.8 Pengaruh Berat <i>Molecular Sieve</i> terhadap % Konversi Ester Glukosa...	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Rasio Reagen dan Pelarut Esterifikasi.....	59
Lampiran 2 Perhitungan % <i>Loading</i> dan Aktivitas Enzim Immobil.....	60
Lampiran 3 Perhitungan Hasil Reaksi.....	61
Lampiran 4 Perhitungan Berat Molekul Asam Lemak Hasil Hidrolisis.....	62
Lampiran 5 Perhitungan Angka Asam dan % <i>yield</i> Hidrolisis	63
Lampiran 6 Absorbansi Standar BSA dan Sampel.....	64
Lampiran 7 Variasi Suhu Immobilisasi.....	65
Lampiran 8 Variasi Rasio Immobilisasi.....	66
Lampiran 9 Optimasi Suhu Esterifikasi.....	67
Lampiran 10 Optimasi Rasio Substrat	68
Lampiran 11 Optimasi Waktu Inkubasi Esterifikasi	69
Lampiran 12 Optimasi Berat <i>molecular sieve</i>	70
Lampiran 13 Spektra IR Zeolit.....	71
Lampiran 14 Spektra IR Asam Lemak Kelapa.....	72
Lampiran 15 Spektra IR Glukosa.....	73
Lampiran 16 Spektra IR Ester Glukosa <i>Free</i> Enzim.....	74
Lampiran 17 Analisis Komponen Minyak Kelapa.....	75

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai negara dengan kelimpahan sumber daya alam hayati, Indonesia memiliki banyak sekali sumber-sumber kekayaan yang dapat dimanfaatkan dan ditambahnilaikan, untuk memiliki harga jual serta kegunaan yang lebih. Salah satunya adalah penggunaan tanaman kelapa, yang cukup berkelimpahan di pesisir Indonesia. Kelapa terkenal sebagai pohon serba guna, yang dapat dimanfaatkan dari mulai daun, batang, buah, bahkan sampai sabutnya. Salah satu penggunaan yang paling utama adalah produksi minyak kelapa untuk keperluan memasak. Minyak kelapa juga merupakan sumber asam lemak seperti asam laurat dan miristat (Ketaren, 1986).

Menurut FAO dan FDA minyak kelapa termasuk minyak yang dapat dikonsumsi sebagai *dietary fat* dan secara umum dapat dianggap aman bagi kesehatan. Akan tetapi konsumsi yang berlebihan dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi kolesterol, hasil metabolisme minyak, sehingga dapat menyebabkan penyakit-penyakit seperti jantung koroner, darah tinggi, kegemukan, dan bahkan kanker (Singh RB, et.al., 1996). Dampak negatif ini dapat dihindari dengan membuat bahan makanan yang mirip dengan lemak serta mempunyai rasa dan tekstur yang tidak jauh berbeda.

Ester asam lemak karbohidrat sederhana dapat menjadi jawaban tantangan ini. Senyawa dengan memiliki struktur mirip dengan lemak alami ini dapat menjadi suatu substitusi lemak dengan kelebihan tidak tercerna, tidak terabsorpsi, serta tidak berkalori. Studi menunjukkan bahwa senyawa ini dapat menjadi pengganti lemak dalam bahan makanan (Sakidja, 1998). Bergantung pada derajat esterifikasinya, ester asam lemak karbohidrat dapat berfungsi sebagai *emulsifier* pada derajat esterifikasi yang rendah atau *fat replacer* pada derajat esterifikasi yang lebih tinggi.

Sebagai *emulsifier* sifat senyawa ini ramah lingkungan karena dapat terdegradasi baik pada kondisi aerob maupun anaerob. Sifat lain dari senyawa ini sendiri tidak mempunyai rasa, bau serta tidak menyebabkan iritasi pada kulit.

Emulsifier merupakan suatu senyawa aktif yang memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu struktur molekul yang sama yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Ditambah dengan sifatnya yang ramah lingkungan, *emulsifier* dari ester asam lemak karbohidrat dapat banyak diaplikasikan secara luas dalam bidang industri (Bruschweller dan Hautenne, 1990).

Ester asam lemak karbohidrat dapat diperoleh melalui esterifikasi antara gula sederhana dengan asam lemak yang berasal dari minyak kelapa, baik secara kimiawi maupun enzimatis. Esterifikasi secara kimiawi untuk memproduksi ester asam lemak karbohidrat telah dilakukan, tetapi memerlukan kondisi reaksi yang menghabiskan banyak energi dan kurang ramah lingkungan (Yamamoto dan Kimani, 1986). Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah menggunakan reaksi secara enzimatis. Reaksi secara enzimatis pada penelitian sebelumnya telah dilakukan, dengan menggunakan katalis lipase *Candida rugosa* untuk mengkatalisis esterifikasi antara asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan sukrosa (Barkah, 2011).

Reaksi enzimatis tanpa regenerasi enzim setelah reaksi biasanya menyebabkan pemborosan biaya dan menjadi tidak ekonomis untuk skala industri. Saat ini dikembangkan cara-cara modifikasi enzim sebagai katalis, seperti immobilisasi enzim tersebut pada media yang *inert* dan tidak terlarut pada sistem reaksi. Metode ini diketahui memiliki beberapa keuntungan, diantaranya cenderung menstabilkan struktur enzim yang digunakan, sehingga meningkatkan ketahanan enzim terhadap kondisi pH, suhu, dan pelarut organik (Matsumoto dan Ohashi, 2002).

Pendekatan penelitian kali ini adalah untuk menghasilkan produk dengan menghitung presentase *rendemen* dan melakukan uji *emulsifier* sederhana terhadap produk yang terbentuk. Pengembangan metode yang dilakukan adalah dengan melakukan immobilisasi enzim pada matriks zeolit serta menggunakan *molecular sieve* yang bertujuan menarik air hasil samping pembuatan ester sehingga menggeser kesetimbangan ke arah produk.

1.2 Perumusan Masalah

1. Bagaimanakah pengaruh katalis terimmobilisasi lipase *Candida rugosa* terhadap esterifikasi asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan glukosa?
2. Bagaimana kondisi optimum reaksi tersebut dengan menggunakan lipase *Candida rugosa* yang terimmobilisasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Melakukan immobilisasi lipase *Candida rugosa* ke dalam matriks zeolit.
2. Melakukan sintesis ester asam lemak glukosa dari minyak kelapa dan glukosa menggunakan katalis lipase *Candida rugosa* yang terimmobilisasi.
3. Mendapatkan kondisi optimum esterifikasi asam lemak dengan glukosa menggunakan lipase *Candida rugosa* terimmobilisasi pada matriks zeolit.

1.4 Hipotesis

1. Katalis lipase yang terimmobilisasi pada matriks zeolit akan memiliki aktivitas katalitis , sehingga dapat digunakan sebagai katalis esterifikasi antara asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan glukosa.
2. Suhu, perbandingan konsentrasi antara glukosa dengan asam lemak, waktu reaksi, dan berat *molecular sieve* berpengaruh terhadap hasil produk ester glukosa yang dihasilkan.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini akan dipelajari dan dicari kondisi optimum reaksi pembuatan ester asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan glukosa dengan bantuan lipase *Candida rugosa* terimmobilisasi pada zeolit. Kondisi optimum ini didapatkan

pada skala laboratorium, yang nantinya diharapkan dapat ditindaklanjuti dalam skala semi atau bahkan untuk perindustrian.



BAB 2

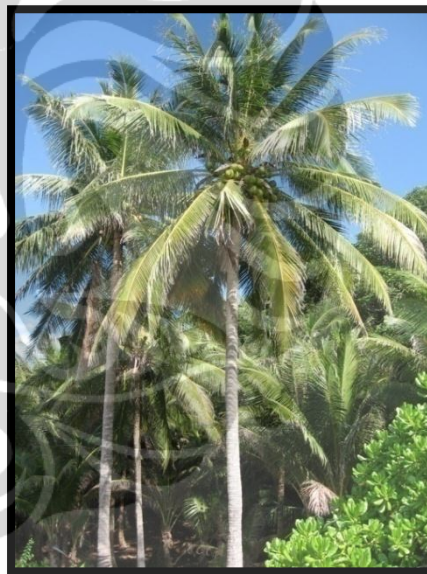
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kelapa

Tanaman kelapa dikenal sebagai pohon yang mempunyai banyak kegunaan, mulai dari akar sampai pada ujungnya (daun), dari produk non-kuliner maupun kuliner/makanan, dan juga produk industri sampai produk obat-obatan. Bagi banyak negara di dunia, tanaman ini disebut sebagai "Pohon Kehidupan".

Berikut adalah taksnomi tanaman kelapa :

Kingdom : Plantae
 Subkingdom : Tracheobionta
 Super Divisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Liliopsida
 Sub Kelas : Arecidae
 Ordo : Arecales
 Famili : Arecaceae
 Genus : *Cocos*
 Spesies : *Cocos nucifera* L



Gambar 2.1 Tanaman Kelapa

[Sumber: <http://teksdi.blogspot.com/2011/04/gambar-dan-informasi-mengenai-kelapa.html>]

Pada gambar 2.1 dapat dilihat tanaman kelapa yang utuh di sekitar pesisir pantai. Sebagai pohon serba guna, salah satu bagian kelapa yang paling sering dimanfaatkan adalah buahnya, dapat menjadi makanan yang bergizi, menjadi tempurung untuk pembuatan arang dan alat-alat makan, dan bagian daging buahnya yang disebut kopra dapat dimanfaatkan untuk pembuatan minyak kelapa.

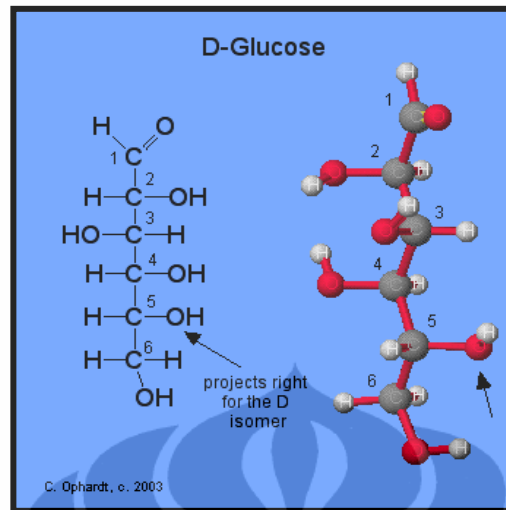
2.2 Minyak Kelapa

Minyak kelapa adalah minyak yang dapat dikonsumsi, yang diekstraksi dari kernel atau daging kelapa matang yang dipanen dari pohon kelapa (*Cocos nucifera*). Di berbagai belahan dunia tropis, minyak ini telah menjadi sumber utama lemak dalam diet jutaan orang selama beberapa generasi. Minyak ini memiliki berbagai aplikasi dalam makanan, obat-obatan, dan industri (Marina, A.M, 2009). Minyak kelapa sangat stabil dalam panas, yang membuatnya cocok untuk memasak pada suhu tinggi seperti menggoreng. Karena bersifat stabil itulah minyak lambat untuk teroksidasi dan dengan demikian tahan terhadap ketengikan, yang berlangsung hingga dua tahun karena kandungan lemak jenuh tinggi.

Minyak kelapa, sebagaimana minyak nabati lainnya, merupakan senyawa trigliserida yang tersusun atas berbagai asam lemak yang 90% di antaranya merupakan asam lemak jenuh seperti asam laurat dan miristat. Selain itu minyak kelapa yang belum dimurnikan juga mengandung sejumlah kecil komponen bukan lemak seperti fosfatida, *gum*, sterol (0,06% - 0,08%), tokoferol (0,003%), asam lemak bebas (kurang dari 5%), serta sedikit protein dan karoten. Sterol berfungsi sebagai *stabilizer* dalam minyak dan tokoferol sebagai antioksidan (Ketaren, 1986)

2.3 Glukosa

Glukosa merupakan monosakarida yang mengandung gugus aldehida dan terdiri atas enam karbon. Senyawa glukosa sering disebut gula darah karena dijumpai dalam darah. Glukosa mempunyai suatu gugus aldehida pada karbon ke-1 dan gugus hidroksil pada karbon ke-2 sampai ke-6. Gambar 2.2 adalah struktur *fischer* D-Glukosa



Gambar 2.2 Struktur D-Glukosa

[Sumber :Ophardt , 2003]

Glukosa mengandung 0,02% bentuk rantai lurus dan 99,98% konformasi berbentuk kursi siklik. Hal ini disebabkan karena karbohidrat memiliki gugus fungsi alkohol dan aldehida yang memiliki hambatan ruang sterik. (Ophardt, 2003).

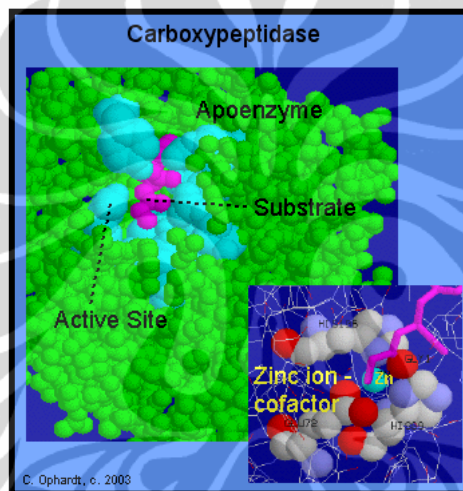
2.4 Enzim

Enzim adalah biokatalisator organik yang dihasilkan organisme hidup di dalam sel, yang terdiri atas protein atau suatu senyawa yang berikatan dengan protein. Enzim mempunyai dua fungsi pokok sebagai berikut :

1. Mempercepat atau memperlambat reaksi kimia.
2. Mengatur sejumlah reaksi yang berbeda-beda dalam waktu yang sama.

Enzim disintesis dalam bentuk calon enzim yang tidak aktif, kemudian diaktifkan dalam lingkungan pada kondisi yang tepat. Misalnya, tripsinogen yang disintesis dalam pankreas, diaktifkan dengan memecah salah satu peptidanya untuk membentuk enzim tripsin yang aktif.

Enzim tersusun atas dua bagian. Apabila enzim dipisahkan satu sama lainnya menyebabkan enzim tidak aktif. Namun keduanya dapat digabungkan menjadi satu, yang disebut holoenzim. Suatu enzim (holoenzim) tersusun atas bagian protein dan bukan protein. Bagian protein disebut apoenzim dan bagian non protein disebut kofaktor. Apoenzim adalah bagian protein dari enzim, bersifat tidak tahan panas, dan berfungsi menentukan kekhususan dari enzim. Kofaktor dapat berupa ion logam (Cu^+ , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , Na^+), atau koenzim yang berupa bahan organik, misalkan vitamin B (B1, B2) (Orphadt, 2003). Gambar 2.3 menunjukkan beberapa bagian pada enzim :

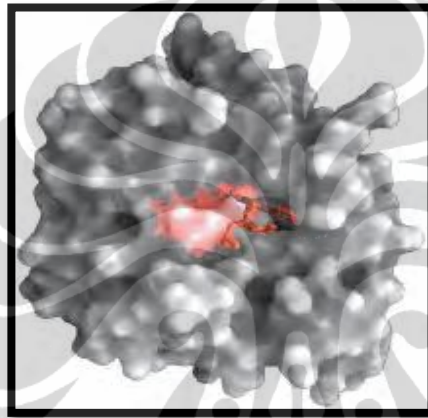


Gambar 2.3 Bagian – bagian enzim
[Sumber : Orphadt, 2003]

2.4.1 Mekanisme Kerja Enzim

Enzim mengkatalisis reaksi dengan cara meningkatkan laju reaksi. Enzim meningkatkan laju reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi (energi yang diperlukan untuk reaksi). Penurunan energi aktivasi dilakukan dengan membentuk kompleks dengan substrat. Setelah produk dihasilkan, kemudian enzim dilepaskan untuk membentuk kompleks baru dengan substrat yang lain.

Enzim memiliki sisi aktif, yaitu bagian enzim yang berfungsi sebagai katalis. Pada sisi ini, terdapat gugus prostetik yang diduga berfungsi sebagai zat elektrofilik, sehingga dapat mengkatalis reaksi yang diinginkan. Bentuk sisi aktif enzim adalah spesifik, sehingga diperlukan substrat yang spesifik pula. Hanya molekul dengan bentuk yang cocok dapat menjadi substrat bagi enzim. Agar dapat bereaksi, enzim dan substrat harus saling komplementer. Gambar 2.4 memperlihatkan sisi katalitik enzim :



Gambar 2.4 Pengikatan Substrat Pada Enzim Di Bagian Sisi Katalitik

[Sumber: Lehninger, 2004]

Cara kerja enzim dapat dijelaskan dengan dua teori, yaitu teori gembok dan anak kunci serta teori *induced fit*.

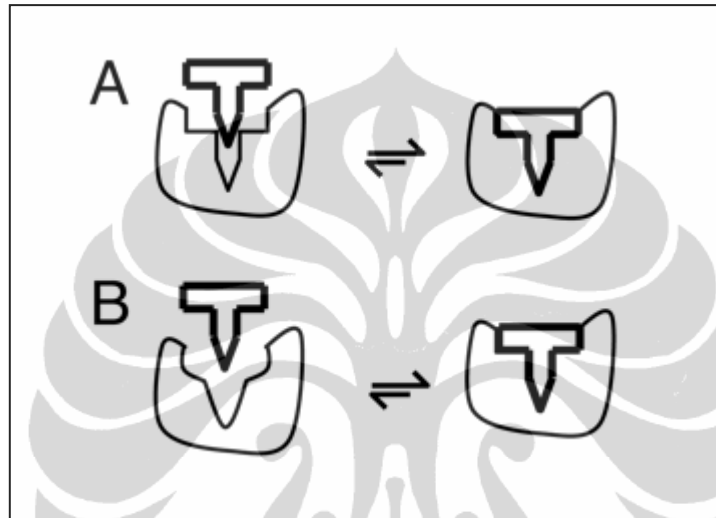
a. Teori gembok dan anak kunci (*Lock and key theory*)

Enzim dan substrat bergabung bersama membentuk kompleks, seperti kunci yang masuk dalam gembok. Di dalam kompleks, substrat dapat bereaksi dengan energi aktivasi yang rendah. Setelah bereaksi, kompleks terurai dan melepaskan produk serta membebaskan enzim. Menurut teori ini enzim bersifat *rigid* dan tidak menerima substrat yang strukturnya berbeda dengan sisi katalitiknya.

b. Teori ketepatan yang terinduksi (*Induced fit theory*)

Menurut teori ketepatan yang terinduksi, sisi aktif enzim merupakan bentuk

yang fleksibel. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif termodifikasi melingkupi substrat membentuk kompleks. Ketika produk sudah terlepas dari kompleks, enzim tidak aktif akan kembali menjadi bentuk yang lepas, sehingga substrat yang lain kembali bereaksi dengan enzim tersebut. Gambar 2.5 adalah menunjukkan model dari dua teori diatas :



Gambar 2.5 Teori mekanisme kerja enzim.(A) *Lock and Key Theory* (B) *Induced Fit*
[Sumber : Tobi dan Bahar, 2005]

Setelah bergabungnya substrat dengan enzim, akan terbentuk kompleks enzim-substrat (ES). Dalam kompleks inilah reaksi katalitik dimulai dan secara matematis, kinetika dari reaksi enzimatis dihitung mulai saat terbentuk kompleks tersebut, sampai reaksi berjalan sempurna dan substrat terkonversi menjadi produk.

2.4.2 Klasifikasi dan Penamaan Enzim

Enzim dapat diklasifikasikan berdasarkan tipe dan mekanisme reaksi yang dikatalisisnya. Pada awalnya, kebanyakan enzim yang diketahui adalah menghidrolisis ikatan hidrogen. Penamaannya hanya ditambahkan akhiran *-ase* pada akhiran substrat atau substansi yang dihidrolisis, seperti amilase untuk enzim yang

menghidrolisis amilum atau lipase untuk enzim yang menghidrolisis lipid. Namun seiring berkembangnya pengetahuan akan reaksi yang terjadi dan banyaknya enzim yang mengkatalisis substrat yang sama dengan mekanisme yang berbeda, maka penamaan dengan cara ini sudah kurang relevan lagi dipakai.

International Union of Biochemistry akhirnya membentuk *Enzyme Commission* untuk membentuk sebuah nomenklatur atau nama sistematis dari enzim-enzim tersebut. Secara singkat, setiap enzim dilengkapi dengan angka dari EC (*Enzyme Commission*) sebanyak 4 digit angka yang dipisahkan oleh titik. Angka pertama adalah kelas enzimnya, kedua dan ketiga adalah reaksi yang dikatalisis secara lebih spesifik, dan angka keempat adalah angka spesifik yang diberikan oleh EC (Lehninger, 2004). Tabel 2.1 menjelaskan data nomenklatur angka pertama dari EC:

Tabel 2.1 Nomenklatur Enzim

Angka Pertama	Kelas Enzim	Reaksi yang Dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Reaksi redoks (transfer elektron atau proton)
2	Transferase	Transfer atom atau gugus dari satu substrat ke lainnya (di luar reaksi kelas lainnya)
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4	Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pembentukan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi
5	Isomerase	Reaksi isomerisasi
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N diikuti dengan pemutusan fosfat dari ATP

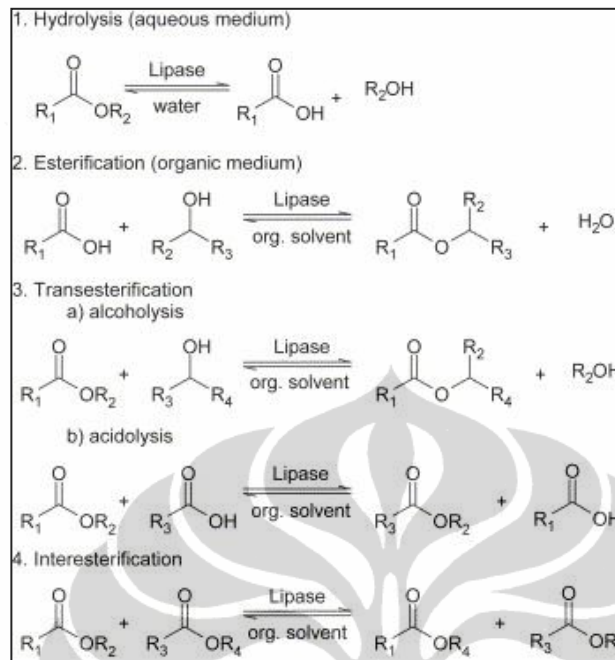
2.5 Lipase

Lipase adalah enzim larut air yang digunakan dalam mengurai lemak, yang biasa disebut trigliserida. Pada manusia, lipase terutama diproduksi di pankreas, dan memfasilitasi penyerapan lemak oleh usus. Enzim ini juga ditemukan dalam kebanyakan organisme hidup, termasuk tumbuhan, hewan, bakteri, dan ragi. Lipase memiliki sejumlah besar kegunaan, baik fisiologis dan industri.

Lipase EC.3.1.1.3 secara khusus adalah enzim yang mengkatalisis secara reversibel hidrolisis lemak hewan dan minyak nabati dalam kondisi alamiah. Hasil hidrolisis ini berupa asam lemak dan gliserol. Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya -, triasilgliserol - merupakan senyawa nonpolar. Oleh karena itu lipase bekerja pada bagian antar muka (*interface*) fasa air dan fasa minyak.

Lipase akan bertindak sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis apabila berada dalam medium dengan kandungan air yang tinggi atau dengan kata lain medium yang digunakan adalah air (*aqueous medium*). Namun, dalam kondisi terdapat pelarut organik dan kandungan air yang sedikit lipase cenderung bekerja dalam esterifikasi, transesterifikasi (asidolisis, interesterifikasi, alkoholisis), daripada reaksi hidrolisis. (Adomopoulos, 2006).

Gambar 2.6 menunjukkan daftar reaksi yang dikatalisis oleh lipase:



Gambar 2.6 Reaksi – reaksi yang dikatalisis lipase

[Sumber: Ghanem, 2006]

2.5.1 Sumber Lipase

Lipase secara umum dapat ditemukan di antara hewan tingkat tinggi, mikroorganisme, dan tanaman. Enzim ini memenuhi peran penting dalam metabolisme biologis lipid. Lipase diperlukan sebagai enzim pencernaan untuk memfasilitasi tidak hanya transfer lipid dari satu organisme ke organisme lain, tetapi juga deposisi dan mobilisasi lemak yang digunakan sebagai cadangan energi dalam organisme.

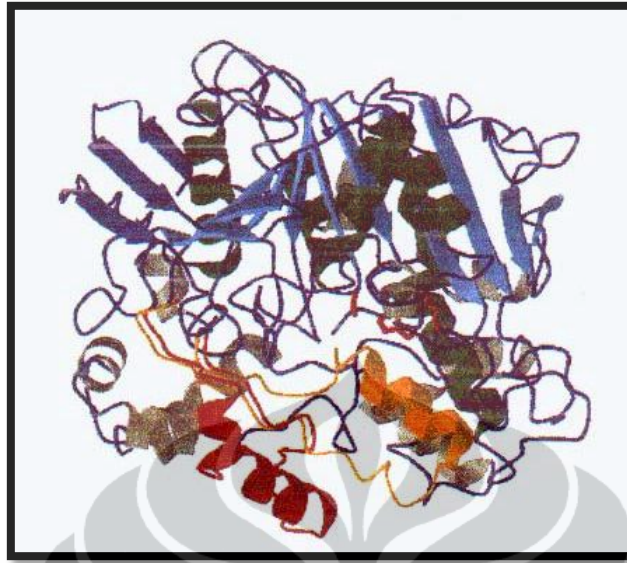
Pada hewan, lipase dapat ditemukan di dalam organ pankreas. Enzim ini memecah trigliserida, minyak, lemak, ester asam lemak sederhana, serta aril ester. Sedangkan pada tumbuhan, lipase dapat diisolasi dari ekstrak kasar lobak, biji jarak, dan beras melalui proses ekstraksi dengan aseton atau larutan buffer. Lipase yang berasal dari mikroorganisme lebih umum digunakan, baik untuk kebutuhan laboratorium maupun untuk industri. Pada mikroorganisme lipase diperoleh melalui proses fermentasi, dan ditemukan sebagai enzim ekstraselular maupun intraselular (Ozturk, 2001).

2.6 Lipase *Candida rugosa*

Candida rugosa adalah jamur yang berasal dari genus *Candida* yang dikenal sebagai organisme pembawa infeksi pada belahan geografis tertentu. Akan tetapi *Candida rugosa* juga punya manfaat, salah satunya adalah sebagai sumber lipase yang aktivitasnya cukup tinggi. Lipase yang berasal dari *Candida rugosa* memiliki massa molekular sebesar 120.000 Da dan titik isoelektrik berada pada pH 4,5 serta aktivitas optimum berada di antara pH 6,5 dan 7,5 (Petersen et al., 2001). Lipase *Candida rugosa* ini spesifik untuk menghidrolisis asam lemak trigliserida yang dibentuk oleh *cis*-9 asam lemak tak jenuh (oleat, linoleat, dan linolenat), sedangkan urutan spesifisitas asam lemak untuk lipase *Candida rugosa* yaitu oleat > laurat > palmitat > miristat > stearat (Ozturk, 2001).

2.6.1 Sisi Aktif Lipase *Candida rugosa*

Seperti enzim-enzim lainnya, lipase juga memiliki sisi aktif katalitik, tempat reaktan dikatalisis. Lipase *Candida rugosa* telah cukup dipelajari secara luas dalam konformasi terbuka maupun tertutup. Enzim ini terdiri dari 466 residu asam amino pada rantai polipeptidanya. Lipase *Candida rugosa* memiliki bentuk hidrolase dengan sisi katalitik *triad* (Ser209-Glu341-His449) dan penutup yang menghalangi sisi katalitik. Sisi katalitik lipase *Candida rugosa* dihalangi oleh struktur heliks (residu 65-94) yang terdiri atas berbagai asam amino. Struktur penghalang tersebut bersifat *rigid*, karena adanya ikatan disulfida (Cys60-Cys97) dan interaksi ionik antara residu Glu96 dan Arg37 (Mala dan Takeuchi, 2008). Gambar 2.7 menunjukkan struktur tiga dimensi lipase *Candida rugosa* :



Gambar 2.7 Lipase *Candida rugosa*

[Sumber: Ozturk, 2001]

2.6.2 Lipase *Candida rugosa* Terimmobilisasi

Ide utama dari immobilisasi enzim ini adalah membuat enzim-enzim, terutama yang langka ataupun sangat mahal, menjadi dapat digunakan ulang dan lebih efisien. Produk yang dihasilkan juga bisa lebih baik dan murni, karena dengan diimmobilisasi enzim yang terpakai dalam reaksi seharusnya lebih sedikit dari enzim bebas.

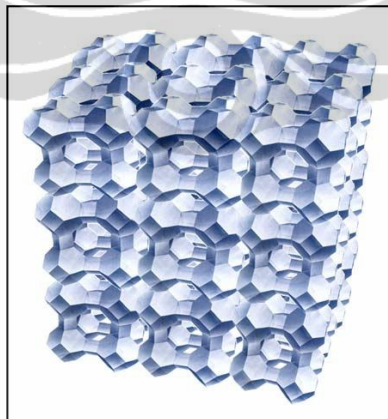
Immobilisasi adalah suatu cara untuk mempertahankan sisi aktif enzim agar tahan terhadap lingkungan, dengan cara mengikat suatu enzim pada molekul penyangga yang membuat persilangan yang kuat di antara asam amino penyusun enzim hingga membentuk struktur granula yang stabil. Struktur padat ini dapat digunakan berulang kali, karena enzim yang terimmobilisasi menjadi tidak larut dalam air, sehingga mudah dipisahkan dari larutan pereaksi (Matsumoto dan Ohashi, 2003).

Keuntungan perlakuan immobilisasi antara lain sebagai berikut:

- Enzim dapat digunakan kembali.
- Proses dapat dioperasikan terus menerus dan dapat dengan mudah dikontrol.
- Produk dapat dipisahkan dengan mudah.
- Limbah dan penanganan masalah bahan dapat diminimalkan.
- Dalam beberapa kasus, sifat enzim (aktivitas dan stabilitas) dapat diubah menjadi lebih baik oleh media immobilisasi.
- Meningkatkan kestabilan pH dan termal.

2.7 Zeolit Sebagai Media Immobilisasi

Zeolit umumnya didefinisikan sebagai kristal alumina silika yang berstruktur tiga dimensi, yang terbentuk dari tetrahedral alumina dan silika dengan rongga-rongga di dalam yang berisi ion-ion logam (biasanya alkali atau alkali tanah) dan molekul air yang dapat bergerak bebas. Secara empiris, rumus molekul zeolit adalah $M_{x/n} \cdot (AlO_2)_x \cdot (SiO_2)_y \cdot xH_2O$. Struktur zeolit sejauh ini diketahui bermacam-macam, tetapi secara garis besar strukturnya terbentuk dari unit bangun primer, berupa tetrahedral, yang kemudian menjadi unit polihedral dan akhirnya membentuk unit struktur zeolit (Setiaji, 2000). Gambar 2.8 menunjukkan struktur kerangka zeolit :



Gambar 2.8 Kerangka zeolit

[Sumber: <http://www.zeolite-remedies.com>]

Zeolit dapat mengalami dehidrasi (melepaskan molekul H₂O) apabila dipanaskan. Pada umumnya struktur kerangka zeolit akan menyusut saat dipanaskan untuk pelepasan air, tetapi kerangka dasarnya tidak mengalami perubahan secara nyata. Molekul H₂O seolah-olah mempunyai posisi yang spesifik dan dapat dikeluarkan secara reversibel. Zeolit yang terdehidrasi akan mempunyai struktur pori terbuka dengan *internal surface area* besar sehingga kemampuan mengadsorb molekul selain air semakin tinggi (Rosdiana, 2006).

Sifat zeolit sebagai adsorben dan penyaring molekul, dimungkinkan karena struktur zeolit yang berongga, sehingga zeolit mampu menyerap sejumlah besar molekul yang berukuran lebih kecil atau sesuai dengan ukuran rongganya. Selain itu kristal zeolit yang telah terdehidrasi merupakan adsorben yang selektif dan mempunyai efektivitas adsorpsi yang tinggi.

2.8 *Molecular Sieve*

Molecular Sieve adalah molekul yang mempunyai pori-pori dengan ukuran yang tepat dan seragam yang digunakan sebagai adsorben untuk gas dan cairan. Molekul yang cukup kecil akan masuk ke dalam pori-pori *molecular sieve* dan terserap, sementara molekul yang besar akan lolos. Sebagai contoh, molekul air yang cukup kecil dapat melalui pori-pori dengan mudah, sementara molekul yang lebih besar tidak. Maka dalam hal ini, air akan dipaksa masuk ke dalam pori-pori dan terperangkap di dalamnya. Karenanya, *molecular sieve* dapat difungsikan sebagai desikator atau pengering air. *Molecular sieve* dapat menyerap air sampai 22% lebih berat dari berat aslinya (Nadykto dan Yu, 2003).

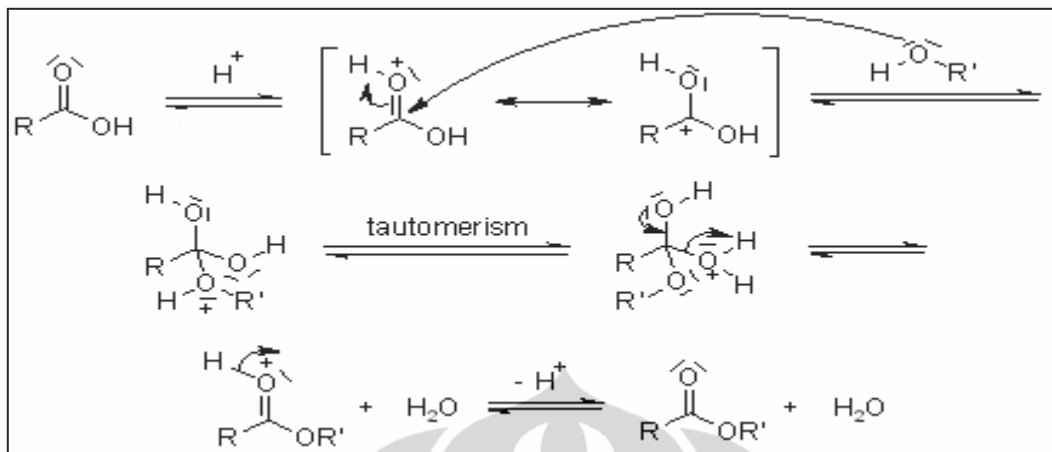
Kebanyakan *molecular sieve* tersusun atas mineral alumino silikat, *clay*, karbon aktif dengan pori-pori mikro, atau komponen sintetik yang memiliki struktur yang terbuka yang memungkinkan molekul kecil berdifusi.

Metode untuk regenerasi *molecular sieve* di antaranya dengan perubahan tekanan (seperti dalam konsentrat oksigen), pemanasan, dan membersihkan dengan gas pembawa (seperti ketika digunakan dalam dehidrasi etanol). Selain itu pemanasan di bawah tekanan yang vakum juga dapat dilakukan. Suhu yang biasa digunakan untuk meregenerasi *molecular sieve* yang mengadsorpsi air ialah antara $130^{\circ} - 250^{\circ}\text{C}$.

2.9 Esterifikasi

Ester adalah turunan dari asam karboksilat yang gugus hidroksil (-OH) dari asam karboksilatnya digantikan oleh gugus alkoksi (-OR). Reaksi pembentukan suatu ester disebut sebagai esterifikasi. Esterifikasi ialah reaksi antara suatu asam karboksilat dengan suatu alkohol. Esterifikasi kimiawi biasanya menggunakan katalis asam anorganik (H_2SO_4 atau HCl) dan bersifat reversibel. Tanpa katalis ini, esterifikasi akan berlangsung sangat lambat. Laju esterifikasi suatu asam karboksilat bergantung terutama pada halangan sterik dalam alkohol dan asam karboksilatnya. Kuat asam dari asam karboksilat hanya memainkan peranan kecil dalam laju pembentukan ester (Fessenden, 1986).

Karena reaksinya yang reversibel, agar kesetimbangan selalu bergeser ke arah pembentukan produk, dapat dilakukan beberapa hal. Berdasarkan prinsip Le Chatelier, penambahan salah satu reaktan secara berlebih pada sistem kesetimbangan menyebabkan pergeseran reaksi yang mengarah ke pembentukan produk. Selain itu, penarikan produk samping dari reaksi juga dapat menggeser kesetimbangan ke arah produk. Esterifikasi ini terdiri dari beberapa tahap, yang dalam gambar 2.9 akan dijelaskan mekanismenya menggunakan katalis asam.



Gambar 2.9 Mekanisme Esterifikasi Dengan Kehadiran Katalisis Asam

[Sumber: R. Moumne, S. Lavielle, P. Karoyan, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 3332-3334]

2.10 Ester Asam Lemak-Karbohidrat

Ester asam lemak-karbohidrat merupakan surfaktan nonionik yang memiliki kemampuan yang baik dalam mengaktifkan permukaan dan mudah didegradasi. Jenis surfaktan ini dapat digunakan sebagai zat tambahan untuk produk makanan, kosmetik, farmasi, dan bahan pembersih. Sintesis konvensional senyawa ini telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dengan metode yang berbeda-beda, terutama pada beberapa dekade belakangan ini, sejak ester tersebut dapat dipreparasi dari senyawa alami yang dapat diperbaharui dan tidak habis terpakai seperti karbohidrat dan asam lemak (Kasori dan Taktabagai, 1997).

2.11 Emulsifier

Emulsi merupakan suatu sistem dispersi cairan dalam cairan. Untuk menstabilkan sistem emulsi biasanya ditambahkan *emulsifier*. *Emulsifier* merupakan suatu senyawa aktif penurun tegangan permukaan (*surface active agent*) yang sekaligus memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu struktur molekul yang sama.

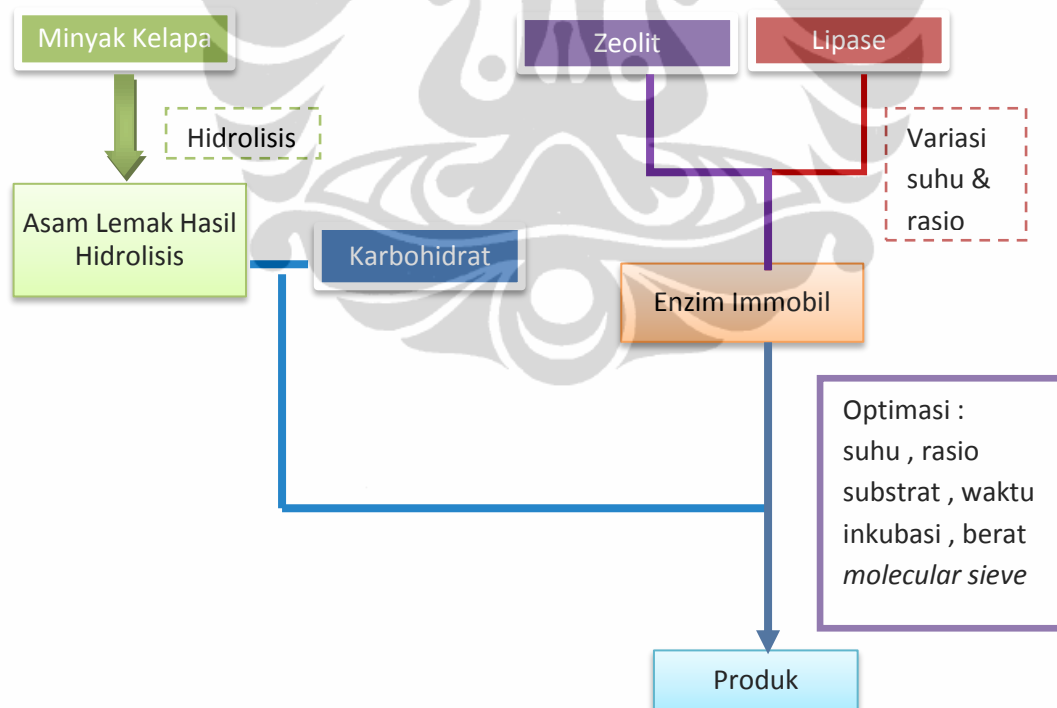
Terdapat dua macam bentuk emulsi, yaitu emulsi air dalam minyak atau *water in oil* (w/o) dan emulsi minyak dalam air atau *oil in water* (o/w). Kedua tipe *emulsifier* ini dibedakan pada lebih terikatnya pengemulsi tersebut pada zat polar atau non polar. Bila *emulsifier* lebih terikat pada air atau lebih larut dalam air (polar) maka dapat lebih membantu terjadinya dispersi minyak dalam air sehingga terjadilah emulsi minyak dalam air (o/w), contohnya susu. Bila *emulsifier* lebih larut dalam minyak (nonpolar) terjadilah emulsi air dalam minyak (w/o), contoh margarin dan mentega.



BAB 3

METODE PENELITIAN

Penelitian kali ini dapat dibagi menjadi beberapa tahapan, yakni tahap preparasi alat dan bahan penelitian, hidrolisis minyak kelapa untuk memperoleh asam lemak, immobilisasi lipase pada zeolit pada variasi suhu dan rasio enzim dengan zeolit, sintesis ester asam lemak sukrosa, melakukan penyaringan hasil ester dengan *molecular sieve*, menganalisis struktur dengan instrumentasi FESEM, spektrometer UV-vis, dan FT-IR. Optimasi esterifikasi dilakukan pada beberapa variabel, yaitu optimasi waktu reaksi, temperatur, perbandingan mol antara sukrosa dengan asam lemak, dan variasi berat *molecular sieve*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Bagan kerja secara umum:



Gambar 3.1 Bagan Kerja Secara Umum

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat-alat yang digunakan

Pada penelitian ini, alat-alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang digunakan di Laboratorium Biokimia seperti *beaker glass*, labu ukur, batang pengaduk, botol timbang, corong biasa, corong pisah, gelas ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipet gondok, erlenmeyer, buret, labu bulat leher tiga, termometer, piknometer, tabung reaksi, dan tabung *centrifuge*. Selain itu juga digunakan spatula, *bulb*, neraca analitis, pH meter, *hot plate magnetic stirrer*, oven, serta *horizontal incubator shaker*, sedangkan instrumentasi yang digunakan adalah FT-IR, spektrofotometer UV-vis, dan HPLC.

3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

- Enzim
Enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah lipase yang berasal dari *Candida rugosa* yang diperoleh dari Sigma-Aldrich dengan spesifikasi sebagai berikut:
 - Bentuk fisik : padat
 - Warna : kuning muda
 - Aktivitas spesifik : 2,45 U/mg (1 U sesuai dengan banyaknya enzim yang menyebabkan penglepasan 1 Umol asam oleat dari triolein sebagai substrat per menit pada suhu 40° C dan pH 8,0)
- Minyak Kelapa
- Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Laboratorium Biokimia Departemen Kimia FMIPA UI. Bahan kimia yang digunakan adalah glukosa, KOH 1 M, etanol 95%, HCl 3N, akuades, n-heksana, *molecular sieve*, Na₂SO₄ anhidrat, buffer tris-HCl pH 7,0, NaOH 0,5 N, zeolit, NaCl 1M, NaOH 0,1 N, Bovine Serum Albumin (BSA) 400 ppm, larutan Natrium Karbonat 2%

berat , larutan CuSO_4 1,56% berat, Natrium Kalium Tartat 2,37% berat , reagen Folin 1N, larutan aseton serta indikator fenolftalein.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Preparasi asam lemak dari minyak kelapa

Hidrolisis trigliserida dilakukan untuk memperoleh asam lemak yang terdapat pada minyak kelapa. Hidrolisis trigliserida berkatalis basa dilakukan dengan cara sebagai berikut:

Memasukkan 20 g minyak kelapa ke dalam labu bulat leher tiga, kemudian ke dalam minyak ditambahkan 100 mL KOH 1 M dalam alkohol 95%. Campuran ini kemudian dipanaskan dengan sistem refluks selama 1 jam pada suhu $62 \pm 2^\circ \text{C}$ disertai pengadukan dengan *magnetic stirrer*. Setelah dipanaskan, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 50 mL akuades. Setelah itu, campuran ditambahkan 35 mL HCl 3 N. Kemudian dilakukan pemisahan antara fasa organik yang merupakan asam lemak dengan fasa air. Fasa organik diekstraksi dengan 50 mL n-heksana sebanyak dua kali ekstraksi untuk menghilangkan fasa air yang masih tercampur dengan asam lemak. Selanjutnya ke dalam fasa organik ditambahkan 1 g Na_2SO_4 anhidrat. Setelah itu, larutan tersebut didekantasi untuk memisahkan padatan Na_2SO_4 . Pelarut n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotatory evaporator* sampai filtrat yang dihasilkan pekat.

3.2.2 Immobilisasi enzim dengan matriks Zeolit

- **Aktivasi Zeolit**

Menyiapkan zeolit berukuran 0,8 mm dengan cara ditumbuk kemudian diayak. Kemudian menimbang zeolit yang diperlukan. Zeolit yang sudah ditimbang kemudian dicuci dengan air untuk dibersihkan pada suhu 70°C selama 1 jam dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

Zeolit diaktivasi dengan cara direndam dalam NaCl 1 M selama 12 jam dengan penggantian larutan sebanyak dua kali untuk mengganti ion Ca^{2+} . Setelah dipanaskan dalam oven untuk menghilangkan air pada suhu 105°C , zeolit kemudian dikalsinasi pada suhu 300°C selama 3 jam di dalam oven dan didinginkan pada suhu ruang. Zeolit yang sudah teraktivasi ini kemudian dipersiapkan untuk tahap immobilisasi di dalam larutan lipase.

- **Preparasi Biokatalis**

Lipase yang telah ditimbang dengan variasi w/w (1:3; 1:4; 1:5) terhadap zeolit dilarutkan pada 50 mL buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,0.

- **Immobilisasi Biokatalis**

Zeolit yang sudah teraktivasi kemudian dimasukkan ke dalam larutan buffer yang sudah berisi lipase. Campuran kemudian diaduk dengan variasi suhu (27 , 32 , 37 , dan 45) $^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Diharapkan selama proses pengadukan terjadi proses adsorpsi melalui pertukaran ion-ion antara lipase dan zeolit. Pada tahap proses adsorpsi inilah lipase akan menempel pada penyangganya (lipase terimmobilisasi). Kemudian, campuran disaring dengan penyaring vakum. Filtrat diambil untuk penentuan *loading efficiency*. Enzim yang telah terimmobilisasi dikeringkan semalam dan disimpan dikulkas sampai digunakan.

3.2.3 Aktivasi *Molecular Sieve*

Molecular sieve diaktivasi dengan cara pemanasan pada temperatur 400°C selama tiga jam. Kemudian *molecular sieve* dikeringkan dengan aseton.

3.2.4 Menentukan Aktivitas *Free Lipase* dan *Lipase Terimmobilisasi*

Aktivitas enzim bebas ditentukan dengan melakukan hidrolisis minyak kelapa dengan menggunakan enzim bebas. Dalam wadah erlenmeyer dimasukkan 0,425 mL minyak kelapa, 0,5 g *gum arabic*, lalu ditambahkan buffer Tris-HCl pH 7 sebanyak 7,65 mL. Dalam campuran kemudian ditambahkan 15 mg lipase yang sudah

dilarutkan dalam buffer pH 7 sebanyak 1,5 mL. Campuran diinkubasi dalam *horizontal incubator shaker* selama 1 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 150 rpm. Terminasi reaksi dilakukan dengan menambahkan volume alkohol : aseton = 1:1 sebanyak 10 mL, lalu dititrasi menggunakan NaOH 0,05 N untuk menentukan kadar asam lemak yang dibebaskan enzim serta aktivitasnya. Reaksi ini dilakukan *triplo* dengan menggunakan blanko. Blanko menggunakan semua substrat dan perlakuan yang sama dengan sampel di atas tetapi tanpa menambahkan katalis lipase.

Aktivitas enzim terimmobilisasi juga ditentukan dengan metode hidrolisis yang sama dengan enzim bebas, tetapi dengan mengganti 15 mg lipase bebas dengan 60 mg lipase terimmobilisasi dengan rasio enzim : zeolit = 1:4.

3.2.5 Menentukan konsentrasi protein yang terimmobilisasi

Metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein yang terimmobilisasi adalah dengan metode Lowry. Pertama kali dibuat kurva kalibrasi dengan larutan BSA sebagai standar dan dibuat plot kurva kalibrasi. Kemudian disiapkan reagen Lowry untuk analisis, dimana 2 g padatan Na₂CO₃ dalam NaOH 0,1 N 100 mL dicampurkan dengan 10 mL larutan CuSO₄ 1,56% berat dengan Natrium Kalium Tartat 2,37% berat dengan perbandingan volume 50 : 1.

Untuk menganalisis konsentrasi protein pada sampel, diambil 0,5 mL sampel dan dimasukkan ke dalam tabung Folin-Wu, kemudian ditambahkan 5 mL reagen Lowry dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Folin 1 N pada sampel dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Setelah diinkubasi, sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 700 nm dan ditentukan konsentrasinya dengan kurva kalibrasi yang telah dibuat.

3.2.6 Esterifikasi asam lemak dengan glukosa menggunakan enzim terimmobilisasi

Pada wadah erlenmeyer direaksikan 0,1 mmol glukosa dengan 6 mmol asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan keberadaan 0,1 g lipase terimmobilisasi dan *molecular sieve* yang sudah diaktivasi. Campuran kemudian ditambahkan n-heksana 1:1 v/v dan dikocok dengan *horizontal incubator shaker* pada kecepatan 200 rpm pada temperatur yang diinginkan.

Reaksi dilakukan secara triplo dengan melakukan variasi pada waktu inkubasi, temperatur, perbandingan molar rasio antara glukosa dan asam lemak, dan variasi berat *molecular sieve*. Variasi waktu inkubasi yang dilakukan adalah 4, 8, 16, dan 32 jam. Variasi suhu reaksi yang digunakan adalah 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, dan 45°C. Variasi perbandingan molar rasio antara glukosa dan asam lemak yang digunakan adalah 1:12, 1:30, 1:60, 1:90. Variasi berat *molecular sieve* yang digunakan adalah 0,2 g, 0,7 g, 1,1 g, dan 1,5 g.

3.2.7 Esterifikasi asam lemak dengan glukosa menggunakan enzim bebas sebagai pembanding

Pada wadah erlenmeyer direaksikan 0,2 mmol glukosa dengan 12 mmol asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan menambahkan enzim bebas *Candida rugosa* sebanyak 5% w/w reaktan yang dilarutkan pada 1,5 mL buffer pH 7 dan 0,1 g *molecular sieve*. Campuran kemudian ditambahkan pelarut n-heksana 1:1 (v substrat /v pelarut) dan dikocok dengan *horizontal incubator shaker* pada kecepatan 200 rpm di suhu 30°C selama 12 jam. Produk dari reaksi ini dianalisis dengan FTIR.

3.2.8 Terminasi esterifikasi

Penghentian reaksi dilakukan dengan merendam erlenmeyer dalam penangas air pada suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ untuk menonaktifkan lipase *Candida rugosa*.

3.2.9 Pemisahan produk esterifikasi

Setelah esterifikasi dilakukan, enzim yang terimmobilisasi dipisahkan dari produk melalui proses penyaringan. Esterifikasi menghasilkan emulsi dan untuk merusaknya dilakukan sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3400 rpm selama 15 menit. Setelah dilakukan proses sentrifugasi hasil reaksi akan terpisah menjadi tiga fase. Fase organik yang berupa asam lemak yang terlarut dalam n-heksana lalu dipisahkan.

3.2.10 Analisis hasil esterifikasi

Untuk analisis hasil esterifikasi, dilakukan proses titrasi guna penentuan persentase *rendemen*. Titrasi dilakukan pada sisa asam lemak dan produk dalam erlenmeyer dengan NaOH dengan menggunakan fenolftalein sebagai indikator titik akhir titrasi. Titrasi dilakukan sebanyak tiga kali pada sampel, dengan menggunakan blanko sebagai pembanding.

3.2.11 Identifikasi produk

Identifikasi produk dilakukan dengan menggunakan instrumentasi FT-IR. Identifikasi dengan FT-IR dilakukan terhadap produk, glukosa, asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa, serta ester glukosa pembanding dari enzim bebas.

Sebelum dilakukan pengukuran FT-IR, produk hasil reaksi terlebih dahulu dikeringkan di oven pada suhu 60° C. Produk dan glukosa yang berbentuk padat kemudian dibuat pelet dengan mencampurkannya dengan kalium bromida lalu dilakukan pengukuran FT-IR. Untuk asam lemak yang berbentuk cairan pada suhu ruang, pengukuran dilakukan dengan membuat lapisan tipis asam lemak di antara lempeng KRS-5.

Identifikasi produk juga dilakukan dengan uji *emulsifier* sederhana, dengan memasukkan minyak dan air dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan produk hasil esterifikasi dan dikocok.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian kali ini bertujuan akhir pada optimasi esterifikasi, yang membutuhkan substrat di antaranya glukosa dan asam lemak dari minyak kelapa. Minyak ini cukup mudah ditemukan di Indonesia dan terjangkau harganya. Langkah pertama yang dilakukan adalah menghidrolisis minyak kelapa (trigliserida) menjadi asam lemaknya.

4.1 Hidrolisis Trigliserida

Hidrolisis trigliserida dapat dilakukan melalui beberapa cara, seperti hidrolisis dengan air murni pada temperatur dan tekanan tinggi, menggunakan katalis asam maupun basa, ataupun secara enzimatik. Kelemahan dari cara hidrolisis dengan air murni, adalah diperlukannya temperatur dan tekanan tinggi (biasanya 250 °C dan 70 bar), sedangkan untuk cara enzimatik kelemahannya terletak pada mahalannya harga enzim dan penggunaannya yang sulit, karena enzim terlarut dalam fasa yang sama dengan reaktannya (Murty, et al., 2002).

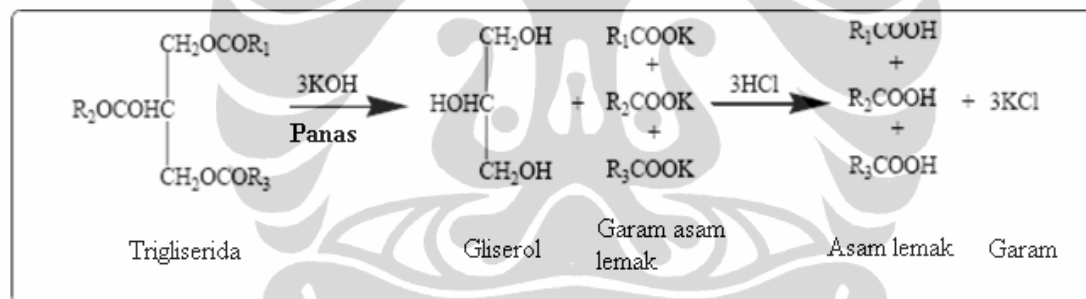
Reaksi hidrolisis menggunakan katalis basa lebih menguntungkan dibandingkan dengan katalis asam. Hal ini disebabkan pada penggunaan katalis asam, reaksi hidrolisis yang terjadi akan menjadi reaksi yang bersifat *reversible* atau bolak-balik, sedangkan dengan katalis basa reaksi menjadi bersifat *irreversible* atau satu arah, sehingga produk yang dihasilkan lebih tepat sasaran. Reaksi hidrolisis menggunakan basa ini sering disebut juga dengan saponifikasi.

Katalis basa yang digunakan biasanya adalah basa alkali kuat seperti NaOH dan KOH. Namun dalam reaksi hidrolisis kali ini, digunakan basa KOH karena memberikan beberapa keuntungan seperti lebih reaktif daripada NaOH sesuai dengan deret kereaktifan dalam satu golongan. Selain itu, keelektropositifan dalam 1 golongan juga bertambah dari atas ke bawah akibat jari-jari atom yang lebih besar, sehingga K lebih mudah membentuk ion positif daripada Na. Dalam salah satu penelitian yang dimuat di jurnal *International Environmental Science Technology %*

rendemen hidrolisis *vegetable oil* oleh KOH adalah lebih besar daripada NaOH (Refaat, et al., 2008).

Pada proses hidrolisis, KOH dilarutkan dalam etanol yang berfungsi sebagai pelarut perantara dan membantu mempercepat proses hidrolisis minyak. Etanol digunakan karena merupakan pelarut yang memiliki kepolaran di antara air dan minyak. Oleh karena itu katalis reaksi hidrolisis ini dilarutkan dalam etanol, agar terjadinya kontak dengan minyak yang akan dihidrolisis akan lebih mudah dan reaksi dapat berjalan dengan lebih cepat. Selain itu, dalam etanol KOH akan membentuk gugus kalium etoksida yang merupakan katalis basa yang lebih kuat daripada OH⁻ seperti pada KOH yang dilarutkan dalam air.

Bila hanya menggunakan air saja untuk melarutkan KOH maka reaksi akan berjalan lebih lambat akibat sulit bercampurnya air dengan minyak.



Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Trigliserida dengan Katalis Basa KOH

[Sumber: Salimon, et al. , 2011]

Dari gambar 4.1 di atas terlihat bahwa setelah direfluks dengan KOH, trigliserida akan menjadi garam asam lemak kalium. Campuran tersebut perlu dikonversikan menjadi asam lemaknya dengan menambahkan aquades dan HCl berlebih. Penambahan ini juga berfungsi untuk memisahkan senyawa-senyawa lipid lainnya yang tidak tersabunkan. Dari proses ini terbentuk 2 fasa. Dalam fasa air akan terdapat etanol dan garam kalium, sementara dalam fasa organik terdapat asam lemak. Gambar 4.2 menunjukkan 2 fasa dalam corong pisah :



Gambar 4.2 Fasa Organik dan Air Hasil Hidrolisis Trigliserida

Setelah membuang fasa air di bagian bawah corong pisah, pada fasa organik terdapat asam lemak yang terlarut dalam n-heksana beserta sisa air yang mungkin tersisa. Penambahan penarik air Na_2SO_4 bertujuan untuk memastikan tidak ada air yang terlarut dalam fasa organik, sebelum akhirnya larutan produk asam lemak diuapkan pelarutnya menggunakan *rotatory evaporator*. Penguapan ini didasarkan pada perbedaan titik didih antara n-heksana dengan asam lemak, menggunakan pompa vakum dan pemutaran untuk pemanasan yang lebih merata.

Hasil hidrolisis minyak kelapa menghasilkan komponen asam lemak terbesar berupa asam laurat (C12) dan asam miristat (C14) (tabel dapat dilihat pada lampiran). Asam-asam lemak ini merupakan asam lemak rantai sedang, sehingga berwujud cair pada suhu ruang.

Hasil ini juga sesuai dengan literatur yang ada bahwa minyak kelapa memiliki komponen asam lemak terbesar asam Laurat 44%-52% dan asam Miristat sebesar 13%-19%. Hidrolisis minyak kelapa ini akhirnya menghasilkan asam lemak berwarna bening kekuningan yang berwujud cair. Persen rendemen hidrolisis yang diperoleh cukup besar, yakni 92,80% , dengan perhitungan hidrolisis 20 g minyak kelapa akan menghasilkan 18,56 g asam lemak. Gambar 4.3 menunjukkan hasil asam lemak yang telah diuapkan pelarutnya :



Gambar 4.3 Asam Lemak hasil Hidrolisis Minyak Kelapa

4.2 Immobilisasi Enzim

4.2.1 Aktivasi Zeolit Alam

Pada penelitian ini, digunakan zeolit alam Klinoptilolit yang berasal dari daerah Bayah, Jawa Barat dan diperoleh dari CV Transindo Utama. Sebelum digunakan sebagai media immobilisasi bagi enzim, perlu dilakukan aktivasi dan pembersihan zeolit terlebih dahulu agar zeolit menjadi lebih optimal fungsinya.

Aktivasi meliputi aktivasi secara fisika dengan mencuci zeolit dalam aquades dengan pengulangan 3 kali pencucian. Hal ini dimaksudkan untuk membebaskan zeolit dari pengotor-pengotor seperti debu, tanah, dan batuan lain yang tercampur serta menutupi pori zeolit. Kemudian langkah selanjutnya adalah penyeragaman kation dari zeolit klinoptilolit ini. Klinoptilolit mempunyai beberapa kation pada strukturnya untuk menetralkan muatan negatif dari ikatan Al-O. Dengan menggunakan larutan NaCl 1M, diharapkan ion Na^+ dapat menyeragamkan kation dalam pori-pori zeolit. Kemudian zeolit dicuci dengan aquabides untuk menghilangkan ion-ion pengotor seperti Cl^- . Setelah bebas pengotor, zeolit kemudian dikalsinasi pada suhu 300°C untuk menguapkan air yang terperangkap dalam pori-porinya, sekaligus membakar pengotor-pengotor organik, sehingga daya adsorpsinya terhadap molekul lain bertambah.

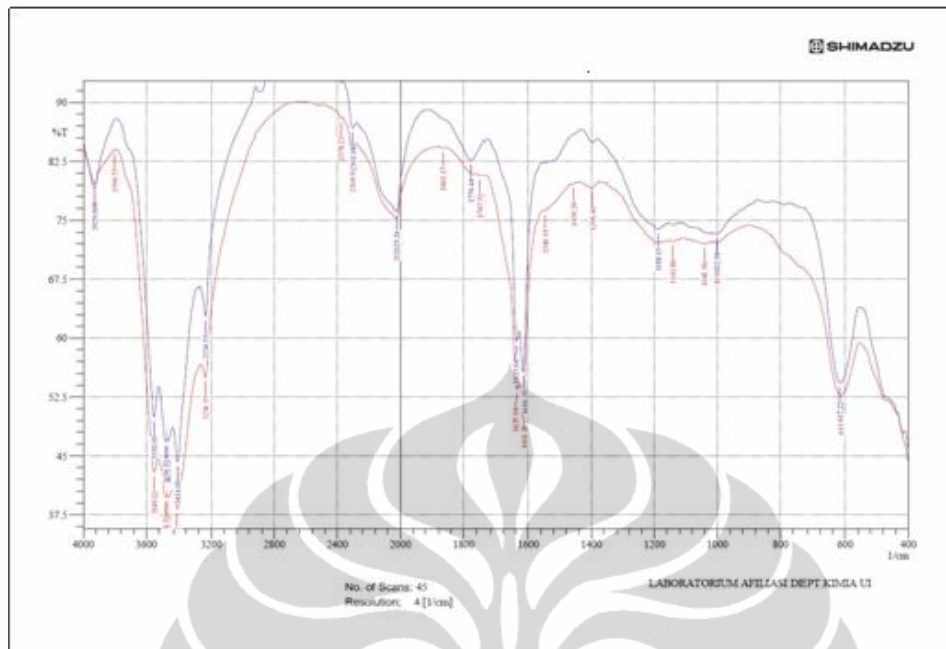


Gambar 4.4 Zeolit sebelum aktivasi (kiri) dan setelah diaktivasi (kanan)

Gambar 4.2 adalah gambar zeolit sebelum dan sesudah diaktivasi. Terlihat pada gambar di atas bahwa ada perbedaan warna antara zeolit alam yang belum diaktivasi dan yang telah diaktivasi. Perubahan warna ini terjadi karena pengotor-pengotor yang terdapat dalam zeolit telah dibersihkan dan tidak lagi menutupi permukaan.

4.2.2 Karakterisasi Zeolit Sebelum Aktivasi dan Setelah Aktivasi

Karakterisasi zeolit dilakukan dengan instrumen FTIR. Hasil karakterisasinya memperlihatkan spektra yang tidak jauh berbeda antara zeolit awal dengan zeolit teraktivasi, dengan puncak-puncak serapan yang masih mirip. Hal ini menunjukkan bahwa proses aktivasi tidak merusak struktur zeolit secara signifikan. Aktivasi hanya membebaskan zeolit dari pengotor-pengotor dan air yang masih mungkin terperangkap di dalamnya. Gambar 4.5 memperlihatkan spektra FTIR dari zeolit sebelum aktivasi dan sesudah diaktivasi.



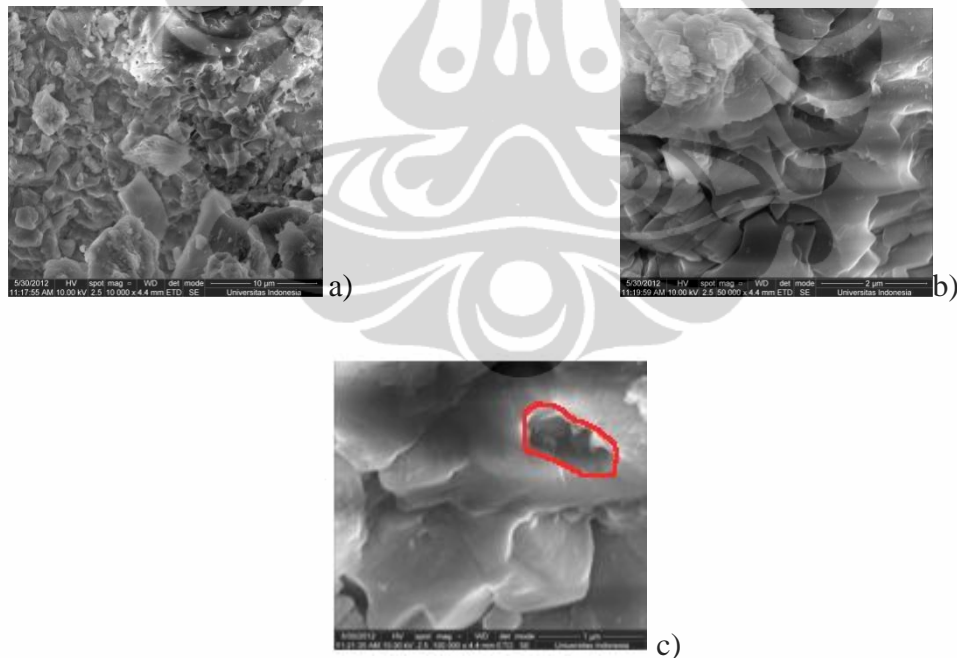
Gambar 4.5 Spektra IR zeolit sebelum aktivasi (merah) dan setelah diaktivasi (biru)

Tabel 4.1 Identifikasi Gugus Fungsi Spektra IR Zeolit Sebelum Aktivasi dan Sesudah Aktivasi

	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Jenis Gugus Fungsi
1	3236-3550	O-H
2	2301-2378	Si-OH
3	1616-1635	Si-O
4	1041	Al-O
5	615-617	Na-O

Terlihat pada tabel 4.1, pada spektra FT-IR terdapat serapan-serapan yang menunjukkan adanya gugus-gugus OH, Si-OH, Si-O, Al-O, dan Na-O. Senyawa-senyawa ini adalah senyawa yang umum ditemukan pada sebuah zeolit alam (Supriatna, 1995).

Selanjutnya, zeolit yang telah diaktivasi dikarakterisasi dengan instrumen *Field Emission Scanning Electron Microscope* (FESEM). Instrumen ini mempunyai kesamaan prinsip kerja dengan SEM, tetapi dengan perbesaran dan gambaran yang lebih jelas, karena adanya *Field Emission Source* yang berbeda – FESEM menggunakan filamen dari tungsten (Wolfram) – yang dapat memfokuskan medan listrik dengan sangat baik. Dengan instrumen ini, dapat terlihat topografi dan gambaran mengenai permukaan serta pori-pori zeolit pada perbesaran yang diinginkan. Detektor yang digunakan untuk melakukan analisis bentuk permukaan adalah SE atau *Secondary Electron Detector*. Cara kerja FESEM ini adalah dengan melepaskan elektron ke permukaan sampel, pantulan yang terjadi dibaca oleh detektor ini dan memberi gambaran. Gambar 4.6 menunjukkan topografi permukaan dari zeolit yang sudah teraktivasi :



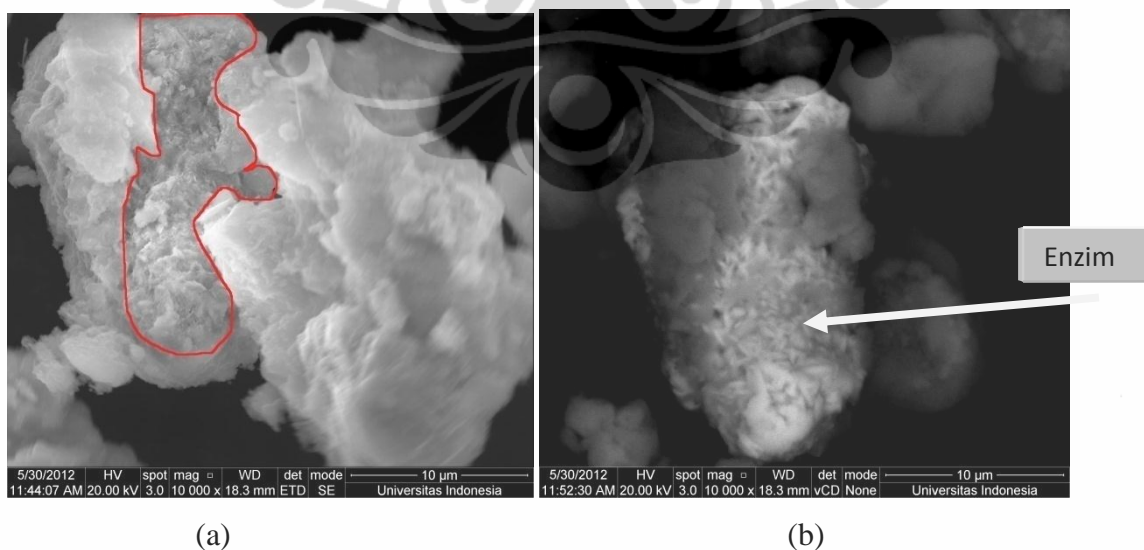
Gambar 4.6 Zeolit alam teraktivasi pada perbesaran 10.000 x (a), 50.000 x (b), dan 100.000 x (c) dengan detektor SE

Dari gambaran yang diperoleh di atas, terlihat bahwa permukaan zeolit belum terlalu merata besarnya. Pada daerah permukaan zeolit yang dianalisis pori-pori juga masih agak jarang terlihat. Hal ini disebabkan oleh masih adanya pengotor yang tertinggal dalam zeolit, sehingga pori belum terbuka seluruhnya (Rosdiana, 2006). Warna merah pada gambar c) menunjukkan salah satu pori di zeolit teraktivasi.

4.2.3 Immobilisasi Lipase

Immobilisasian enzim dilakukan untuk menambahkan daya tahan enzim terhadap lingkungannya, seperti pH, suhu, pelarut, maupun untuk kepentingan penggunaan kembali enzim tersebut pada proses kontinu. Immobilisasi enzim pada zeolit termasuk dalam tipe immobilisasi melalui adsorpsi (Knezevic, 1998). Immobilisasi ini dipengaruhi faktor-faktor seperti luas permukaan, komposisi kimia, maupun ukuran partikel. Keuntungan immobilisasi menggunakan zeolit adalah metode yang mudah dilakukan, murah, dan juga mudah disimpan.

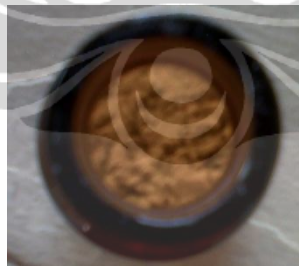
Hasil immobilisasi enzim dalam zeolit ini dianalisis dengan FESEM untuk melihat apakah enzim teradsorpsi pada permukaan zeolitnya. Pada Gambar 4.7 dapat dilihat hasil enzim yang sudah diimmobilisasi dalam zeolit:



Gambar 4.7 Enzim terimmobilisasi pada zeolit dianalisis pada perbesaran 10.000 kali menggunakan detektor (a) SE (b) BSE

Pada Gambar 4.7 (a) terlihat adanya perbedaan struktur mineral zeolit yang telah ditambahkan dengan enzim dibandingkan Gambar 4.6. Perbedaan ini ditunjukkan dengan lingkaran merah. Pada bagian tersebut struktur topografi zeolit awal yang terlihat seperti dinding-dinding lebar telah sedikit berubah dengan adanya molekul enzim yang menempel, menjadi terlihat seperti agak kasar, tidak teratur, dan seperti ada serpihan. Hal ini diperjelas dengan gambar (b), yang menggunakan detektor BSE atau *Back Scattering Electron*, gambar yang dihasilkan dapat memunculkan kontras yang berbeda antara senyawa kimia yang berbeda. Warna lebih terang pada gambar diartikan sebagai senyawa yang memiliki berat molekul relatif besar daripada warna yang lebih gelap. Enzim, yang merupakan makromolekul yang tersusun atas berbagai asam amino, menjadi kandidat kuat senyawa yang teradsorpsi pada permukaan zeolit. Dengan bantuan instrumen FESEM ini dapat disimpulkan bahwa immobilisasi enzim pada zeolit telah dapat dilakukan dan jenisnya adalah adsorpsi pada permukaan.

Enzim yang telah diimmobilisasi punya bentuk fisik seperti serbuk, berwarna kecokelatan yang berasal dari warna enzim *Candida rugosa*. Gambar 4.8 adalah hasil dari immobilisasi enzim.



Gambar 4.8 Enzim terimmobilisasi

4.2.4 Penentuan Aktivitas *Free Lipase*

Penentuan aktivitas *free lipase* dilakukan dengan metode titrimetri menggunakan NaOH sebagai titran dari hasil hidrolisis minyak kelapa dengan enzim. Banyaknya asam lemak yang terhidrolisis akan berbanding lurus terhadap besarnya aktivitas dari enzim tersebut. Hasil dari metode titrimetri menunjukkan aktivitas

enzim sebesar 10,559 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 703,933 U/g. Aktivitas *free* lipase digunakan sebagai pembandingan aktivitas enzim terimmobilisasi.

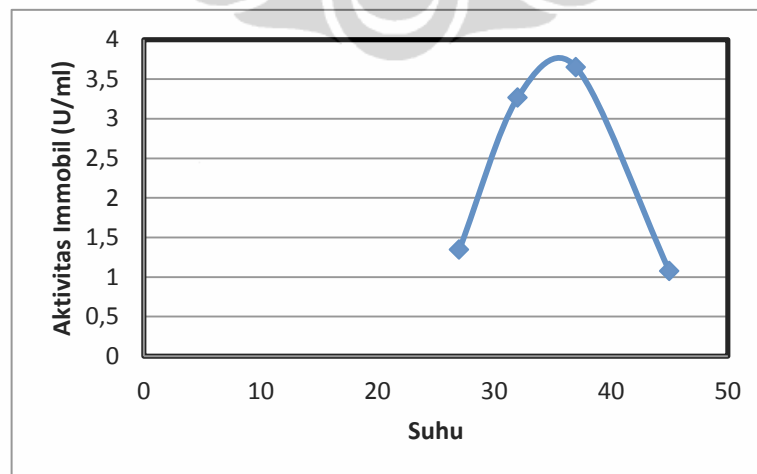
4.2.5 Optimasi Immobilisasi dengan Variasi Suhu

Untuk menentukan apakah enzim yang sudah diimmobilisasi dapat memiliki aktivitas katalitik dan mengoptimalkan kondisi immobilisasi, pertama-tama dilakukan variasi suhu immobilisasi. Setelah terimmobilisasi, enzim digunakan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis minyak kelapa, dengan metode yang sama seperti penentuan aktivitas *free* lipase untuk memperoleh nilai aktivitas pada masing-masing suhu.

Tabel 4.2 dan Gambar 4.9 menunjukkan data variasi suhu vs aktivitas enzim

Tabel 4.2 Data Variasi Suhu dan Aktivitas Enzim Terimmobilisasi

Suhu(°C)	Aktivitas (U/mL)
27	1,3446
32	3,2655
37	3,6497
45	1,0715

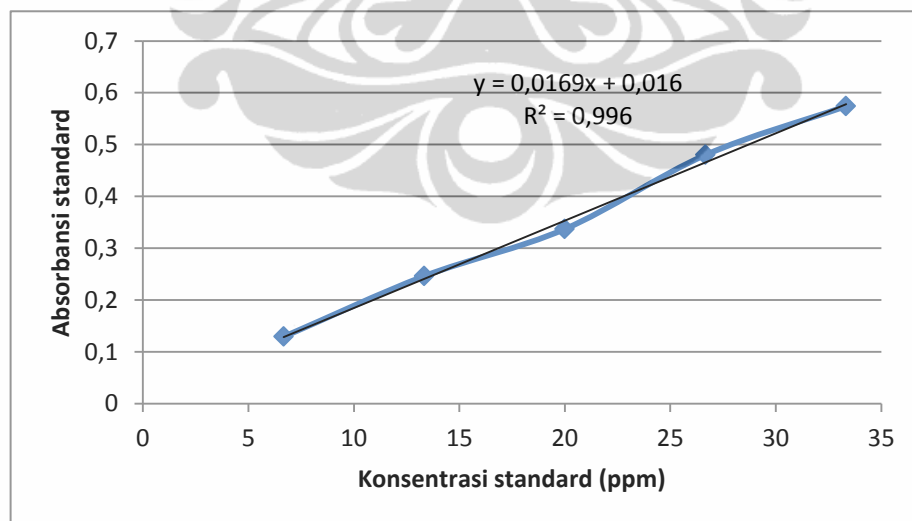


Gambar 4.9 Grafik Variasi Suhu vs Aktivas Enzim Terimmobilisasi

Dari Gambar 4.9 terlihat bahwa peningkatan suhu saat immobilisasi meningkatkan aktivitas enzim. Peningkatan ini akibat semakin luasnya permukaan zeolit seiring peningkatan suhu immobilisasi (Lin, Y.C dan Hsunling Bai, 2006). Semakin luas permukaan berarti semakin banyak enzim yang dapat menempel pada zeolit, tetapi setelah melewati suhu optimalnya aktivitas akan menurun karena terjadi perubahan struktur asam amino penyusun enzim (Klibanov, 1986).

4.2.6 Optimasi Immobilisasi dengan Variasi Rasio Enzim : Zeolit

Setelah didapatkan suhu optimal untuk immobilisasi, optimasi immobilisasi enzim dilanjutkan dengan perhitungan aktivitas, % aktivitas enzim immobil dibandingkan enzim bebas, dan % *loading efficiency* pada variasi rasio dari enzim : zeolit. Perhitungan % *loading efficiency* ini dilakukan dengan metode Lowry, dengan menentukan enzim awal yang dipakai dan sisa enzim setelah immobilisasi. *Loading efficiency* atau % *loading efficiency* merupakan salah satu cara mengetahui telah terjadinya adsorpsi enzim pada matriks zeolit.

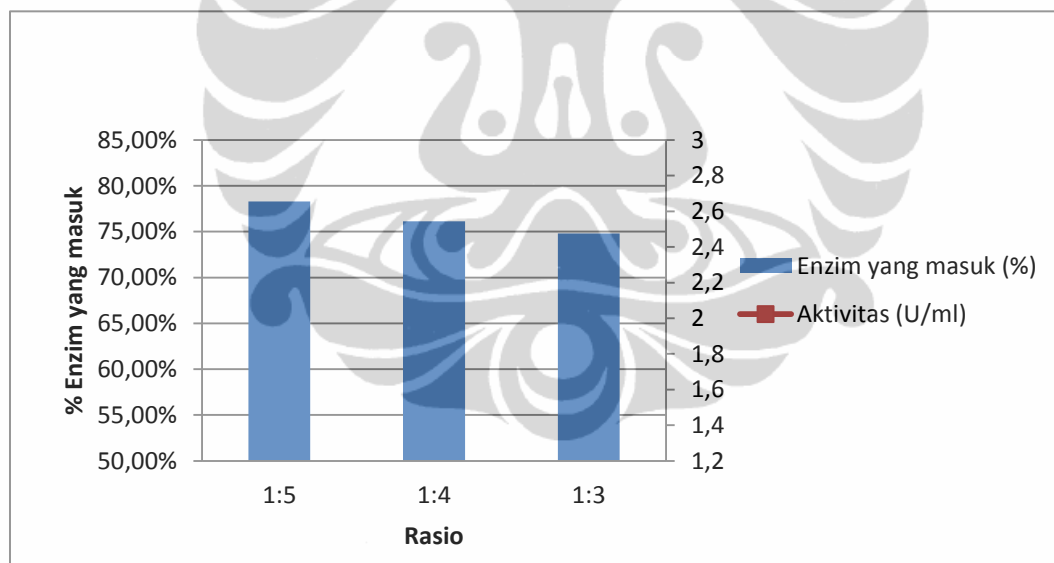


Gambar 4.10 Kurva standar BSA pada metode Lowry

Dengan menggunakan kurva standar pada Gambar 4.10, dapat diketahui konsentrasi enzim awal dan yang tersisa setelah immobilisasi. Pada variasi rasio ini, berat zeolit diatur supaya tetap dan berat enzim diubah hingga memenuhi variasi w/w enzim : zeolit 1:5 , 1:4 , dan 1:3. Aktivitas enzim immobil diukur dengan metode titrimetri dengan melakukan hidrolisis minyak kelapa.

Tabel 4.3 Data Variasi Rasio, *Loading efficiency*, dan Aktivitas Enzim Terimmobilisasi

Rasio Enzim:Zeolit	<i>Loading efficiency</i> (%)	Berat enzim awal (g)	Berat enzim masuk (g)	%Efisiensi Immobilisasi
1:5	78,31	0,04	0,031	27,966%
1:4	76,13	0,05	0,038	31,990%
1:3	74,81	0,07	0,050	35,269%



Gambar 4.11 Grafik % *Loading efficiency* dan Aktivitas Enzim Immobil

Dari Tabel 4.3 serta Gambar 4.11 terlihat bahwa semakin besar nilai rasio (enzim : zeolit), semakin banyak enzim bebas yang akan diimmobilisasi. Hal ini menyebabkan semakin besar pula enzim yang teradsorpsi di permukaan zeolit, walaupun % *loading efficiency* terlihat menurun. Hal ini disebabkan oleh banyaknya

enzim yang harus diadsorpsi zeolit, tetapi luas permukaannya tetap, sehingga tidak semua enzim dapat masuk. Dengan semakin banyaknya enzim yang terimmobilisasi ke dalam zeolit, maka aktivitas katalitiknya semakin besar, karena jumlah enzim yang semakin banyak akan meningkatkan aktivitas katalitiknya.

4.3 Esterifikasi Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Glukosa

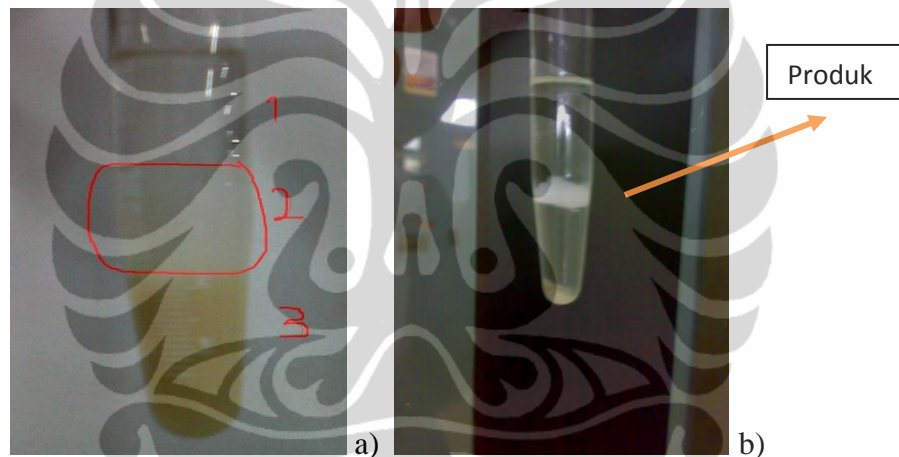
Esterifikasi merupakan reaksi reversibel yang dipengaruhi beberapa faktor dalam menghasilkan produk maupun mempengaruhi aktivitas katalitik dari enzim. Pada penelitian ini faktor-faktor yang divariasikan untuk mendapatkan kondisi optimum reaksi adalah suhu reaksi, rasio substrat, waktu inkubasi, dan berat *molecular sieve*.

Katalis dari reaksi ini, lipase cenderung mengkatalisis esterifikasi pada kondisi air yang sedikit daripada reaksi hidrolisis (Joseph et.al,2008). Sebagai katalis, enzim harus berada dalam bentuk yang baik dan berada dalam lingkungan yang mendukung aktivitas katalitiknya. Sebuah studi mengenai pelarut organik menyatakan bahwa pelarut yang dapat mempertahankan aktivitas dan stabilitas enzim adalah pelarut dengan nilai log P antara 2 sampai dengan 4. Nilai log P adalah nilai distribusi sebuah senyawa dalam dua pelarut, organik dan air, dimana semakin besar nilai ini, maka semakin larut dalam pelarut non-polarlah sebuah senyawa. Pada penelitian ini digunakan pelarut n-Heksana dengan nilai log P 3,5 (Zaks dan Klivanov, 1988). Selain berada dalam nilai rujukan penelitian Zaks dan Klivanov, menurut penelitian sebelumnya n-heksana adalah pelarut organik yang memberikan persen konversi tertinggi pada esterifikasi menggunakan lipase (Syamsul,et.al, 2010). Oleh karena itu dalam penelitian ini pelarut n-heksana dengan perbandingan v/v 1:1 dari total volume substrat.

4.3.1 Esterifikasi dengan Menggunakan Enzim Bebas Sebagai Pembanding

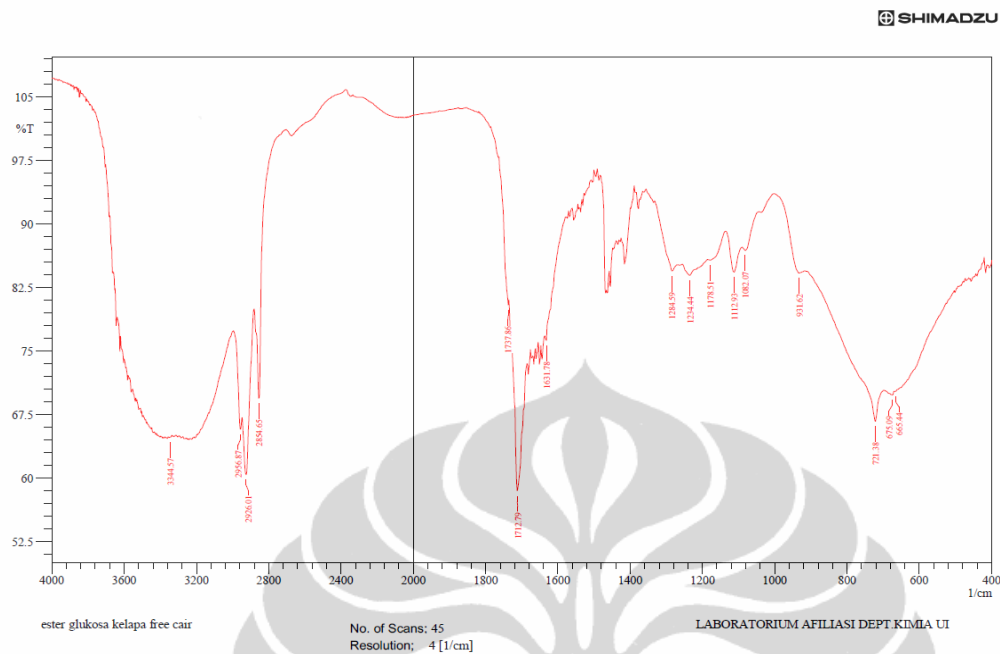
Sebelum melakukan esterifikasi antara asam lemak dengan glukosa menggunakan enzim terimmobilisasi, terlebih dahulu dilakukan percobaan mengenai

esterifikasi menggunakan lipase *Candida rugosa* bebas. Langkah ini dilakukan untuk membuktikan bahwa lipase *Candida rugosa* dapat mengkatalisis pembentukan ester glukosa dari substratnya. Reaksi dilakukan menggunakan pelarut enzim buffer pH 7 dan pelarut reaksi n-heksana, yang awalnya membentuk dua fasa yang tidak bercampur. Glukosa serta enzim akan terlarut dalam fasa yang lebih polar, sedangkan asam lemak akan terlarut dalam n-heksana. Setelah reaksi berlangsung selama 12 jam, terjadi perubahan yakni kekeruhan pada antar fasa di dalam wadah reaksi. Setelah reaksi diterminasi pada suhu 80°C , enzim akan menjadi karena perubahan struktur asam amino. Hasil reaksi kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan fasa produknya. Gambar 4.12 menunjukkan hasil reaksi sebelum dan sesudah sentrifugasi



Gambar 4.12 Hasil esterifikasi a) sebelum dan b) sesudah sentrifugasi

Pada hasil sentrifugasi terlihat bahwa ada tiga lapisan pada produk akhir. Berdasarkan studi pendahuluan ester sukrosa, lapisan tengah adalah produk ester, sehingga dilakukan identifikasi gugusnya dengan FTIR (Barkah, 2011). Gambar 4.13 dan Tabel 4.4 menunjukkan data FTIR yang dimaksud:



Gambar 4.13 Spektra IR produk esterifikasi dengan lipase bebas

Tabel 4.4 Identifikasi Gugus Fungsi Spektra IR produk esterifikasi

	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Jenis Gugus Fungsi
1	3550-3200	O-H
2	2900-2800	C-H
3	1737	C=O ester

Dengan melakukan perbandingan ini, terbukti bahwa lipase *Candida rugosa* dapat mengkatalisis esterifikasi asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan glukosa. Produk yang didapat juga diuji *emulsifier* sebagai pendekatan identifikasi produknya. Hasil uji *emulsifier* produk ini dapat dilihat pada Gambar 4.14 :

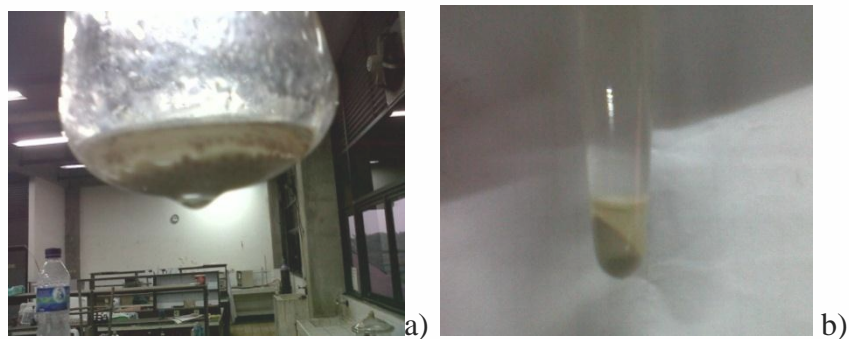


Gambar 4.14 Hasil emulsi minyak dan air

4.3.2 Esterifikasi dengan Menggunakan Enzim Terimmobilisasi

Esterifikasi dengan lipase terimmobilisasi dilakukan dengan perlakuan yang sama dengan lipase bebas tetapi dengan penambahan *molecular sieve* dan lipase terimmobilisasi pada sistemnya. Pada awal pencampuran terbentuk dua fasa dalam reaktan, akibat perbedaan kepolaran antara substrat glukosa dengan asam lemak dan pelarut n-heksana.

Terminasi reaksi dilakukan setelah reaksi selesai dan sebelum melakukan titrasi penentuan persen konversi produk. Terminasi reaksi dilakukan menggunakan air mendidih untuk mematikan enzim. Suhu yang tinggi dapat menyebabkan enzim terdenaturasi karena adanya pemutusan ikatan-ikatan kimia pada struktur sekunder, tersier, dan/atau kuartener enzim, serta adanya perubahan struktur primer enzim akibat kerusakan asam-asam amino tertentu oleh suhu tinggi. (Ahern dan Klibanov, 1987). Hasil reaksi setelah diterminasi dan setrifugasi ditunjukkan Gambar 4.15:



Gambar 4.15 Hasil esterifikasi a) setelah terminasi b) setelah sentrifugasi

Kemudian untuk pendekatan identifikasi produk dilakukan uji *emulsifier* sederhana terhadap hasil produk reaksi. Emulsi antara minyak dan air yang didapat cukup bercampur, namun masih belum bertahan lama, karenan produknya masih terlalu kecil. Gambar 4.16 menunjukkan hasil uji *emulsifier* :

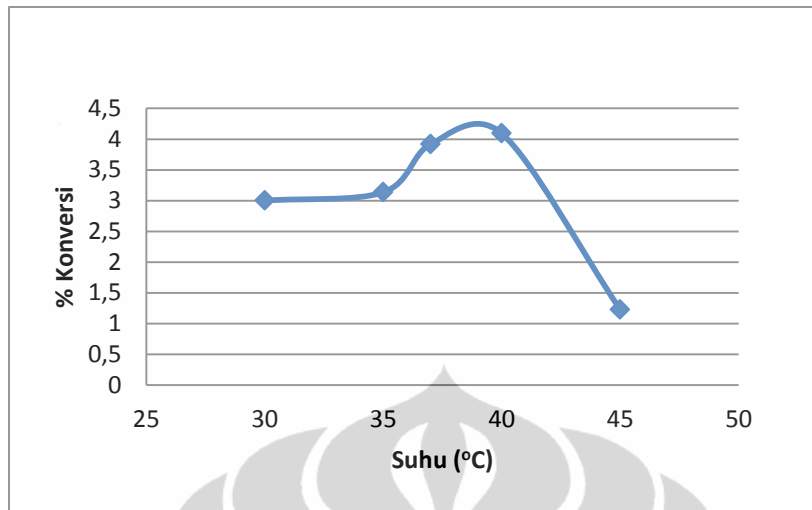


Gambar 4.16 Hasil emulsi minyak dan air menggunakan produk hasil esterifikasi dengan enzim terimmobilisasi

4.4 Optimasi Esterifikasi

4.4.1 Optimasi Suhu

Enzim membutuhkan suhu tertentu untuk mendapatkan kerja optimalnya, sehingga optimasi suhu dilakukan untuk meningkatkan konversi asam lemak menjadi ester. Variasi suhu yang digunakan adalah 30 , 35 , 37 , 40 , dan 45°C. Kondisi reaksi pada optimasi suhu ini adalah pada rasio substrat (glukosa : asam lemak) = 1:60 , waktu reaksi 4 jam, dan berat *molecular sieve* 0,2 g. Gambar 4.17 dan Tabel 4.5 menunjukkan hasil reaksi pada optimasi suhu :



Gambar 4.17 Grafik Hubungan Suhu Reaksi vs % Konversi Ester Glukosa

Tabel 4.5 Pengaruh Suhu terhadap % Rendemen Ester Glukosa

Suhu (°C)	% Konversi
30	3,001
35	3,137
37	3,918
40	4,092
45	1,228

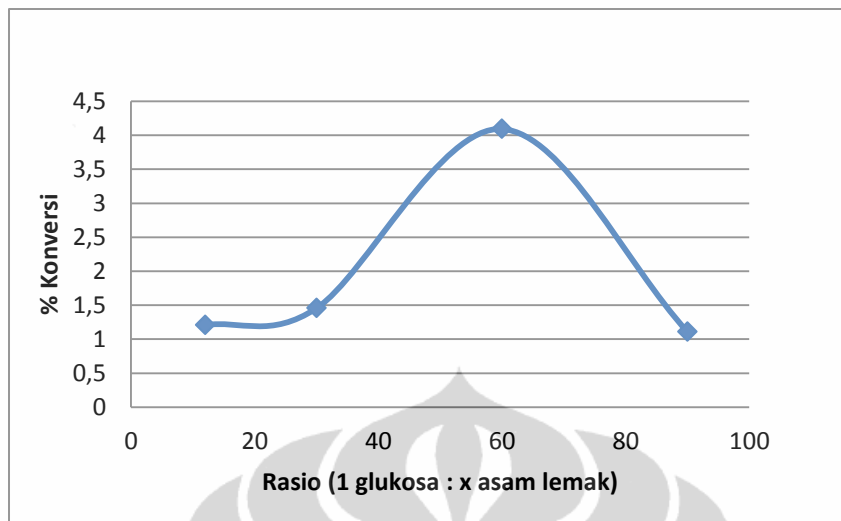
Pada Gambar 4.17 terlihat bahwa terjadi kecenderungan kenaikan % konversi ester pada kenaikan suhu dari 30°C - 40°C. Kenaikan % konversi ini terjadi karena semakin tinggi suhu reaksi, semakin besar energi kinetik dari substrat dan katalis yang ada dalam sistem reaksi. Namun, setelah melewati suhu 40°C terlihat adanya penurunan konversi. Hal ini terjadi karena di atas suhu optimum enzim menjadi inaktif akibat adanya perubahan struktur primer enzim karena kerusakan asam-asam amino tertentu (Klibanov, 1986). Rusak atau inaktifnya enzim, yang merupakan katalis reaksi, menyebabkan reaksi berjalan lebih lambat dan hasil produk menurun. Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan bahwa suhu optimum lipase *Candida rugosa* untuk esterifikasi adalah 30°C (Barkah, 2011). Suhu optimum reaksi kali ini,

dapat mencapai 40°C karena pada reaksi ini lipase sudah diimmobilisasi pada matriks zeolit, sehingga tahan pada suhu reaksi yang lebih tinggi.

4.4.2 Optimasi Rasio Substrat

Setelah mendapatkan suhu optimal reaksi, yakni pada suhu 40 °C, selanjutnya dilakukan optimasi rasio substrat untuk reaksi. Suhu optimum ini yang kemudian digunakan untuk optimasi-optimasi selanjutnya, agar hanya satu variabel saja yang berpengaruh terhadap konversi substrat. Esterfikasi merupakan reaksi kesetimbangan. Konsep mengenai kesetimbangan ini telah dikemukakan oleh *Le Chatelier*. Untuk menggeser kesetimbangan ke arah produk, maka dapat dilakukan dengan menambahkan reaktan sampai berlebih atau mengambil salah satu produk (Yoo, et. al, 2006).

Pemilihan rasio substrat kali ini adalah 1:12 , 1:30 , 1:60 , 1:90 mmol glukosa: mmol asam lemak. Pemilihan ini didasari penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa ada hubungan antara banyaknya gugus hidroksil yang ada pada glukosa dengan gugus alkil (R) yang ada pada asam lemak (Byun, 2007). Pada penelitian itu, didapat hasil optimal pada jumlah gugus hidroksil alkohol dua kali lipat jumlah gugus substratnya, sehingga perbandingan mmol ini dimulai dari 1:12. Hal ini berarti ada 12 gugus alkil (R) asam lemak yang menyerang 6 gugus OH pada glukosa (1 mmol glukosa memiliki 6 gugus OH). Kondisi optimasi rasio substrat dilakukan pada suhu 40 °C, waktu reaksi 4 jam, dan berat *molecular sieve* 0,2 g. Gambar 4.14 dan Tabel 4.6 adalah hasil reaksi pada optimasi rasio.



Gambar 4.18 Grafik Hubungan Rasio Substrat vs % Konversi Ester Glukosa

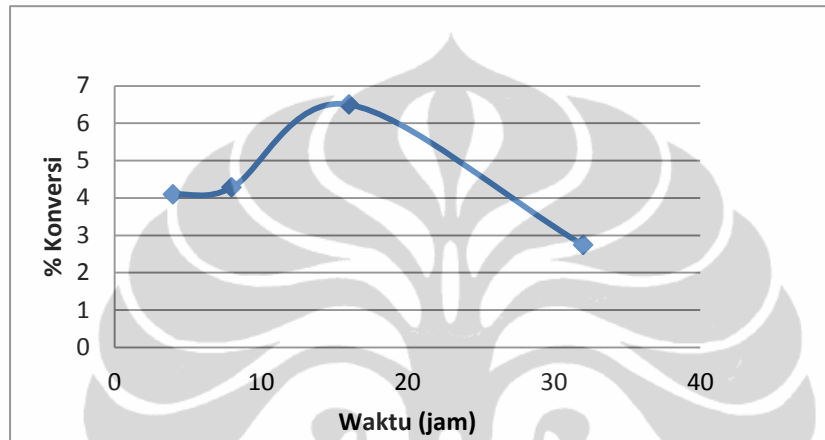
Tabel 4.6 Pengaruh Rasio Glukosa : Asam Lemak terhadap % Konversi

Rasio Glukosa : Asam Lemak (mmol)	% Konversi
1:12	1,208
1:30	1,457
1:60	4,092
1:90	1,109

Terlihat pada hasil di atas bahwa kenaikan jumlah substrat (dalam hal ini penambahan asam lemak) akan menambah % konversi esterifikasi. Hal ini sesuai dengan teori bahwa penambahan konsentrasi substrat meningkatkan aktivitas enzim hingga pada batas jenuh enzimnya. Namun, setelah titik optimum tercapai, kecepatan reaksi akan cenderung tetap atau bahkan terjadi penurunan % konversi. Hal ini terjadi karena substrat yang berlebih dapat bertindak sebagai inhibitor yang mengakibatkan penurunan aktivitas dari enzim (Reed, 2010).

4.4.3 Optimasi Waktu Inkubasi

Esterifikasi membutuhkan waktu yang optimal untuk mencapai kesetimbangannya dan menghasilkan % konversi yang lebih tinggi. Oleh karena itu dilakukan optimasi waktu reaksi dengan variasi 4, 8, 16, 32, dan 64 jam. Kondisi reaksi adalah suhu 40 °C, rasio substrat 1:60, dan *molecular sieve* 0,2 g.



Gambar 4.19 Grafik Hubungan Waktu Inkubasi vs % Konversi Ester Glukosa

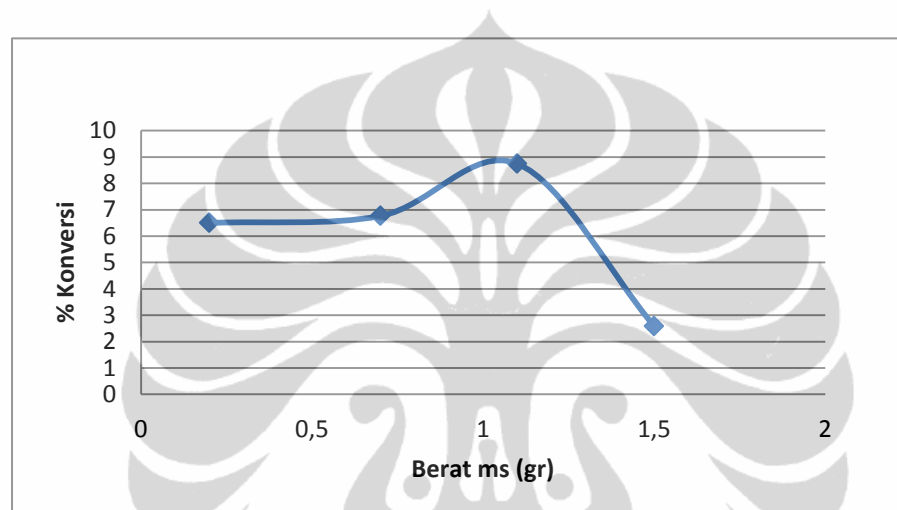
Tabel 4.7 Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap % Konversi Ester Glukosa

waktu (jam)	% konversi
4	4,092
8	4,278
16	6,500
32	2,737

Dari Gambar 4.19 dan Tabel 4.7 dapat disimpulkan bahwa esterifikasi asam lemak minyak kelapa dengan glukosa optimal pada waktu inkubasi 16 jam, yaitu pada saat reaksi tersebut masih cenderung berjalan ke arah produk dan punya % konversi yang terbesar. Semakin lama reaksi ini berlangsung, produk samping esterifikasi -yaitu air- semakin bertambah. Bertambahnya produk samping ini, selain menggeser kesetimbangan kembali ke arah reaktan dan dapat menyebabkan enzim cenderung bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis ester yang terbentuk.

4.4.4 Optimasi *Molecular Sieve*

Penggunaan *molecular sieve* sebagai penarik air dimaksudkan untuk menarik produk samping esterifikasi, yaitu air. Pada penelitian ini, divariasikan berat *molecular sieve* sebesar 0,2 , 0,7 , 1,1 , dan 1,5 gram. Kondisi reaksinya menggunakan hasil optimasi terdahulu yang sudah optimal yakni suhu di 40 °C, rasio substrat 1:60 , dan waktu reaksi 16 jam.



Gambar 4.20 Grafik Hubungan Berat *Molecular Sieve* vs % Konversi Ester Glukosa

Tabel 4.8 Pengaruh Berat *Molecular Sieve* terhadap % Konversi Ester Glukosa

Berat ms (g)	% konversi
0.2	6.500
0.7	6.765
1.1	8.745
1.5	2.585

Dari Gambar 4.20 dan Tabel 4.8 terlihat bahwa kenaikan berat *molecular sieve* berpengaruh terhadap % konversi produk ester. Air yang diserap oleh *molecular sieve* membuat kesetimbangan digeser lebih jauh ke arah produk ester dan konversinya optimal pada berat 1,1 g. Namun, pada variasi berat 1,5 g, terlihat butiran *molecular sieve* ini cenderung terlalu padat dan rapat, sehingga menghalangi

pergerakan substrat yang diinkubasi dalam *horizontal incubator shaker*. Terlalu banyaknya substrat dapat membuat reaksi terinhibisi setelah melewati keadaan optimalnya. Bila kontak yang terjadi menurun akibat kurangnya pergerakan, maka % konversi produknya juga akan menurun.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Immobilisasi enzim pada matriks zeolit telah berhasil dilakukan dan menunjukkan adanya aktivitas enzim yang terimmobilisasi.
2. Pada kondisi optimumnya, % aktivitas efisiensi immobilisasi adalah 35,27 % dibandingkan aktivitas lipase bebas.
3. Kondisi optimum immobilisasi enzim adalah pada suhu 37°C dan perbandingan rasio enzim : zeolit = 1 : 3 (w/w) dengan % *loading efficiency* 74,81 %.
4. Lipase terimmobilisasi dapat berfungsi sebagai katalis dalam esterifikasi antara asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan glukosa dengan kondisi optimum pada suhu 40 °C, rasio substrat glukosa : asam lemak 1:60 , waktu inkubasi 16 jam ,dan berat *molecular sieve* 1,1 g dengan % konversi produk maksimal 8,745 %.

4.2 Saran

1. Aktivasi zeolit sebagai media immobilisasi dapat ditambahkan dengan aktivasi secara kimia, yakni perlakuan dengan asam dan basa sehingga zeolit lebih bersih dari pengotor yang tersisa pada aktivasi sebelumnya.
2. Melakukan optimasi jumlah enzim yang digunakan untuk esterifikasi

3. Mencari metode isolasi produk yang baik, karena banyaknya fasa yang terbentuk setelah hasil reaksi dan pemisahan secara fisika yang kurang sempurna
4. Melakukan uji *emulsifier* sederhana setelah melakukan isolasi produk
5. Melakukan uji keberulangan pada esterifikasi untuk mengetahui ketahanan pakai enzim immobil dalam aplikasi kedepannya sebagai katalis industri.
6. Melakukan uji kestabilan enzim immobil terhadap variasi lama penyimpanan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adamopoulos, Lambrini. (2006). *Understanding the formation of sugar fatty acid esters*. Faculty of North Carolina State University.
- Barkah, Awaliatul. 2011. *Studi Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Sukrosa Menggunakan Lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3*. Universitas Indonesia. Depok
- Bruschweller dan Hautenne. 1990. Determination of The Ester-Emulsifier Components Content After Hydrolysis Silylation By Gas Chromatography. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 62, No. 4, pp. 781-793.
- Byun, Hee Guk et.al. 2007. *Lipase Catalyzed Production of Monoacylglycerol by The Esterification of Fish Oil Fatty Acid with Glycerol*. Pukyong National University: Busan, Korea
- Campbell, Reece, Mitchell. 2000. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1*. Jakarta: Erlangga
- Fessenden & Fessenden. 1986. *Kimia Organik Jilid 2 Edisi Ketiga*. Jakarta: Erlangga
- Ghanem, Ashraf. 2006. *Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds*. King Faisal Specialist Hospital and Research Centre : Saudi Arabia
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Coconut> (akses tanggal 26 Januari 2012 pukul 21:22)
- http://www.chem.kindai.ac.jp/class/reaction/enzymatic_reaction.htm (akses tanggal 25 Mei 2012 pukul 06.45)
- <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf> (akses tanggal 27 Januari 2012 pukul 21:25)
- <http://material-sciences.blogspot.com> (akses tanggal 27 Januari 2012 pukul 20:15)

<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CONU> (akses tanggal 26 Januari 2012 pukul 21:35)

<http://www.molecularsieve.org/> (akses tanggal 27 Januari 2012 pukul 21:12)

In Sang Yoo, Sang Joon Park, and Hyon Hee Yoon. 2007. Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters. *J. Ind. Eng. Chem.*, Vol. 13, No. 1, 1-6

Jakob H. Waterborg , 2002. *The Lowry Method for Protein Quantitation*. Springerlink

Kasori, Y. , dan Taktabagai, T. 1997. *Preparation of Fatty Acid Sucrose Esters for Food*. Mithsubishi Chemichal Industries Ltd : Japan

Klibanov, A. M. 1986. *Enzyme That Works in Organic Solvents*. *Chemtech*. 16: 354-144

Knezevic, Zorica, et.al. 1998. *Palm oil hydrolysis by lipase from Candida cyhdracea immobilized on zeolite type Y*. University of Belgrade : Yugoslavia

Lehninger, Albert L. 2004. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga : Jakarta

Marina, A.M., et.al. 2009. *Virgin coconut oil: emerging functional food oil*. Department of Food Technology, Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia : Malaysia

Matsumoto, Michiaki, dan Kunihiro Ohashi. 2003. *Effect of immobilization on thermostability of lipase from Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal* 14, 75–77

Minovska, Vilma, et.al. 2004. *Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis*. University Sts. Cyril and Methodius : Republic of Macedonia

- Murty, V. Ramachandra, et.al. 2002. *Hydrolysis of Oil Using Immobilized Lipase Enzyme : A Review. Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002, 7: 57-66
- Nadykto, Alexey B., dan Fangqun Yu. 2003. *Uptake of neutral polar vapor molecules by charged clusters//particles: Enhancement due to dipole-charge interaction.* Atmospheric Science Research Center : New York, United States
- Nelson & Cox. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition.* W. H. Freeman
- Novianingsih, Ika. 2011. *Studi Reaksi Sintesis Ester Sukrosa secara Enzimatis Menggunakan Lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3 antara Sukrosa dengan Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Sawit.* Universitas Indonesia : Depok
- Nugraha, Agung. 2006. *Sintesis Ester Glukosa Oleat dari Glukosa Pentaasetat dan Metil Oleat.* Institut Pertanian Bogor : Bogor
- Orphadt, EC. 2003. *Enzyme.* Virtual e-book
<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/570enzymes.html>. Akses 15 Juni 2012
- Öztürk, Banu. 2001. *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports.* Izmir Institute of Technology. Turkey
- Reed, Michael C. et.al. 2010. *The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions.* Department of Mathematics and Department of Biology, Duke University: Durham, USA.
- Refaat, A.A. , et.al. 2008. *Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil.* Int. J. Environ. Sci. Tech., 5 (1), 75-82

- Rosdiana, Tina. 2006. *Pencirian dan Uji Aktivitas Katalitik Zeolit Alam Teraktivasi*. Institut Pertanian Bogor : Bogor
- Sakidja. 1998. *Sintesis Poliester Asam Lemak Sukrosa dari Minyak Kelapa Sebagai Bahan Pengganti Lemak Untuk Makanan Rendah Kalori*. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sari, Ika. 2006. *Sintesis Ester Glukosa Stearat Melalui Metode Interesterifikasi Dengan Metode Bebas Pelarut*. Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Setiaji, Bambang. 2000. *Pemanfaatan Zeolit untuk Adsorpsi Benzopiren sebagai Senyawa Racun dalam Asap Cair*. Majalah Iptek Vo. 11, No. 4, November 2000.
- Shaw, Jei-fu , dan Alexander M. Klibanov.1986. *Preparation of Various Glucose Esters via Lipase-Catalyzed Hydrolysis of GlucosePentaacetate*. Massachusetts Institute of Technology : Cambridge
- Singh RB, et.al. 1996. *Recommendations for the prevention of coronary artery disease in Asians: a scientific statement of the International College of Nutrition*. Medical Hospital and Research Centre: Moradabad, India
- Sujarwadi. 1997. *Sekilas tentang Zeolit*. Pusat Pengembangan Teknologi Mineral. Bandung
- Tobi,Dror, dan Ivett Bahar. 2005. *Structural changes involved in protein binding correlate with intrinsic motions of proteins in the unbound state*. Department of Computational Biology, School of Medicine: Pittsburgh , United States
- Yagiz, Funda, et.al.2007. *Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites*. Kocaeli University : Turki.
- Yamamoto, T. and K. Kimani. 1986. *Production of Sucrose Fatty Acid Polyester*. Dai-chi Kogyo Seiyaku Co.,Ltd. : Kyoto Japan.

Yan, Yongchun. 2001. *Enzymatic Production of Sugar Fatty Acid Ester*. Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart : Jerman

Yu, Jiugao, et.al. 2007. *Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from Candida sp.* School of Science, Tianjin University : China.



LAMPIRAN

Lampiran 1:

Perhitungan Rasio Reagen dan Pelarut Esterifikasi

1. Perhitungan Massa Jenis Asam Lemak

Perhitungan massa jenis asam lemak menggunakan piknometer 10 ml.

$$\text{Massa asam lemak} = 8,380 \text{ gr}$$

$$\text{Massa jenis asam lemak} = \frac{8,380 \text{ gr}}{10 \text{ ml}} = 0,838 \text{ g/ml}$$

2. Perhitungan Massa dan Volum Asam Lemak

$$\text{Massa} = \text{mmol} \times \text{Mr}$$

$$= 6,0 \text{ mmol} \times 207,89 \text{ mg/mmol}$$

$$= 1,247 \text{ g}$$

$$\text{Volum} = \frac{1,247 \text{ g}}{0,838 \text{ g/ml}} = 1,488 \text{ ml}$$

3. Perhitungan Massa Glukosa Monohidrat

$$1 \text{ ml glukosa } 0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mmol}$$

$$\text{Massa} = \text{mmol glukosa} \times \text{Mr glukosa}$$

$$= 0,1 \text{ mmol} \times 198,18 \text{ mg/mmol}$$

$$= 19,818 \text{ mg}$$

4. Perhitungan Volume Pelarut n-heksana

$$\text{Volum n-heksana} = \text{volume total substrat (1 : 1) v/v}$$

$$= \text{vol. asam lemak} + \text{glukosa}$$

$$= 1,488 \text{ ml} + 1 \text{ ml}$$

$$= 2,488 \text{ ml}$$

Lampiran 2 :**Perhitungan %Loading dan Aktivitas Enzim Immobil**1. % *Loading Efficiency* (Enzim yang masuk)

Perhitungan % enzim masuk pada enzim yang terimmobilisasi dapat ditentukan

ditentukan dengan persamaan: $\frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100 \%$

Dimana: C_i = konsentrasi awal

V_i = volume awal

C_f = konsentrasi akhir

V_f = volume akhir

C_i dan C_f ditentukan dengan menggunakan kurva standar metode Lowry.

2. % Efisiensi Immobilisasi

% Efisiensi immobilisasi dapat dihitung dengan membandingkan aktivitas spesifik enzim terimmobilisasi dengan aktivitas spesifik enzim bebas.

$$= \frac{\text{aktivitas spesifik enzim terimmobilisasi (U/mg)}}{\text{aktivitas spesifik enzim bebas (U/mg)}} \times 100\%$$

Dimana rumus aktivitas spesifik enzim

$$= \frac{\text{Aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{berat enzim (mg)}}$$

Lampiran 3 :

Perhitungan Hasil Reaksi

1. Perhitungan Aktivitas Enzim (U/ml) melalui reaksi hidrolisis

$$= \frac{(volum\ NaOH\ sampel - Volum\ NaOH\ blanko) \times N\ NaOH \times 1000}{massa\ minyak\ (g) \times waktu\ (menit)}$$

2. Perhitungan Aktivitas Enzim Bebas

= *perhitungan aktivitas enzim untuk hidrolisis*

3. Perhitungan % Konversi Asam Lemak

$$= \frac{(volum\ blanko - volum\ sampel) \times N\ NaOH \times 100\%}{mol\ asam\ lemak\ awal}$$

Lampiran 4 :

Perhitungan Berat Molekul Asam Lemak Hasil Hidrolisis

Asam Lemak	BM	Persentase	Jumlah
Kaprilat	144	7,2	10,368
Kaprat	172	8,02	13,7944
Laurat	200	54,1	108,2
Miristat	228	17,4	39,672
Palmitat	256	6,64	16,9984
Stearat	284	1,86	5,2824
Oleat	282	3,99	11,2518
Linolet	280	0,81	2,268
Linolenat	278	0,02	0,0556
		BM	207,8906

[Sumber : Laboratorium Analisis Balai Besar Industri Argo (BBIA)]

Lampiran 5 :

Perhitungan Angka Asam dan % Yield Hidrolisis

Angka Asam

N NaOH = 0.09525 N

V titrasi blanko = 0.2 ml

V titrasi sampel :

V₁=18.8 mlV₂=19.3ml

V rata-rata = (18.8 + 19.3) / 2
19.05 ml

Angka Asam

$$\begin{aligned}
 &= \frac{(\text{volum sampel} - \text{volum blanko}) \times N \text{ NaOH} \times BE \text{ NaOH}}{\text{massa sampel (g)}} \\
 &= \frac{(19,05 - 0,2) \text{ ml} \times 0,09525 \text{ N} \times 40 \text{ g/ml}}{0,5 \text{ g}} \\
 &= 144 \text{ mg NaOH /g sampel}
 \end{aligned}$$

% Yield Hidrolisis

Massa minyak awal = 20 g

Massa setelah reaksi hidrolisis dan penguapan pelarut = 18,56 g

$$\% \text{ Yield} = \frac{18,56 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 100\% = 92,80 \%$$

Lampiran 6 :**Absorbansi Standar BSA dan Sampel**

Standar BSA

konsentrasi std (ppm)	Absorbansi standard	Absorbansi blanko
6.67	0.246	0.117
13.33	0.363	0.117
20	0.454	0.117
26.67	0.597	0.117
33.33	0.691	0.117

Absorbansi sampel *free* lipase dan immobil

	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
<i>free</i> lipase 1:5	0.162	866.19
<i>free</i> lipase 1:4	0.181	978.89
<i>free</i> lipase 1:3	0.213	1168.68
faktor pengenceran imm.lipase = 10x		
imm.lipase 1:5	0.353	119.905
imm.lipase 1:4	0.435	248.54
imm.lipase 1:3	0.544	313.191

Lampiran 7 :

Variasi Suhu Immobilisasi

Variasi suhu immobilisasi
faktor pengenceran untuk Lowry = 10x

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	aktivitas (U/ml)
45			1.0715
27	0.355	201.0913405	1.3446
32	0.314	176.7734282	3.2655
37	0.273	152.455516	3.6497

Aktivitas pada variasi suhu inkubasi
waktu inkubasi = 63 menit

	OPTIMASI TEMPERATUR INKUBASI			
Variasi Suhu inkubasi	45	27	32	37
[NaOH]	0.1	0.04706	0.04706	0.04706
V Blanko	3.9	8.6	8.6	8.6
V Sampel	4.15	9.3	10.3	10.5
Aktivitas (U/ml)	1.071466838	1.3446	3.2655	3.6497

Lampiran 8:

Variasi Rasio Immobilisasi

%Loading di Suhu 37°C

faktor pengenceran imm.lipase = 10x	% Enzim yang masuk	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas (U/mg)	%Efisiensi Immobilisasi
imm.lipase 1:5	78.31%	2.3122	0.196851667	27.966%
imm.lipase 1:4	76.13%	2.5715	0.225174934	31.990%
imm.lipase 1:3	74.81%	2.7858	0.248255581	35.269%

Aktivitas *Free* enzim ditentukan dari reaksi hidrolisis

V sampel = 20,22 ml

V sampel = 10,0 ml

N NaOH = 0,045 N

Massa minyak = 0,388 g

Waktu inkubasi = 112 menit

Aktivitas = 10,559 U/ml

Aktivitas spesifik = 0,7039 U/mg

Lampiran 9 :

Optimasi Suhu Esterifikasi

Suhu (°C)	Sampel	Volum NaOH (ml)	Molaritas NaOH (mol/L)	% Yield
30	1	8.45	0,491	3,001

	2	8.5		
	3	8.5		
	Blanko	8.85		
35	1	8.4		3,137
	2	8.4		
	3	8.45		
	Blanko	8.8		
37	1	41.3	0,0966	3,918
	2	41.3		
	3	41.5		
	Blanko	43.8		
40	1	8.7	0,491	4,092
	2	8.6		
	3	8.65		
	Blanko	9.15		
45	1	8.9		1,228
	2	8.8		
	3	8.85		
	Blanko	9		

Lampiran 10 :

Optimasi Rasio Esterifikasi

Rasio (mmol)	Sampel	VolumNaOH (ml)	Molaritas NaOH (mol/L)	% Yield
12	1	8.6	0.0966	1,208
	2	8.5		
	3	8.55		
	Blanko	8.7		
30	1	21.4	0.0971	1,467
	2	21.3		
	3	21.35		
	Blanko	21.8		
60	1	8.7	0.491	4,092
	2	8.6		
	3	8.65		
	Blanko	9.15		
90	1	63.2	0.0966	1,111
	2	62.9		
	3	62.8		
	Blanko	64		

Lampiran 11 :

Optimasi Waktu Esterifikasi

Waktu (jam)	Sampel	Volum NaOH (ml)	Molaritas NaOH (mol/L)	% Yield
4	1	8.7	0,491	4,092
	2	8.6		
	3	8.65		
	Blanko	9.15		
8	1	41.3	0,1	4,278
	2	41.5		
	3	41.2		
	Blanko	43.9		
16	1	39.7	0,1	6,500
	2	39.5		
	3	39.3		
	Blanko	43.4		
32	1	40.2	0,0966	2,737
	2	40.4		
	3	39.7		
	Blanko	41.8		

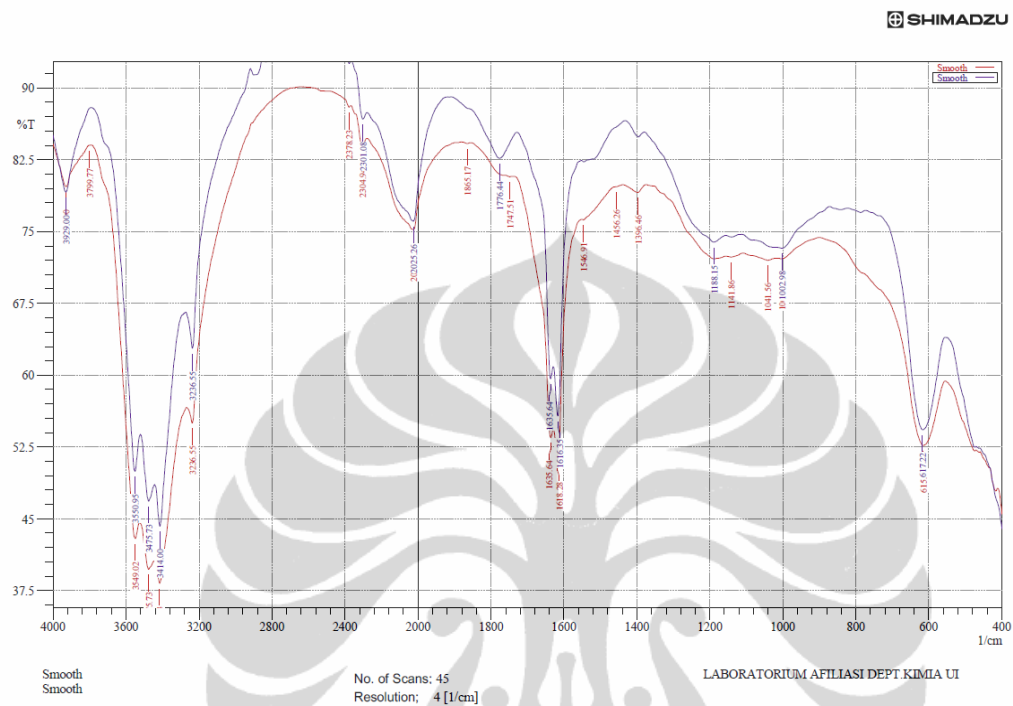
Lampiran 12 :

Optimasi Berat *Molecular Sieve*

Berat <i>Molecular Sieve</i> (gram)	Sampel	Volum NaOH (ml)	Molaritas NaOH (mol/L)	% Yield
0,2	1	8.7	0.491	6,500
	2	8.6		
	3	8.65		
	Blanko	9.15		
0,7	1	36.1	0,099	4,278
	2	36		
	3	36.2		
	Blanko	40.2		
1,1	1	35.6	0,099	6,500
	2	35.7		
	3	35.8		
	Blanko	41		
1,5	1	35.6	0,099	2,737
	2	35.3		
	3	35.4		
	Blanko	37		

Lampiran 13 :

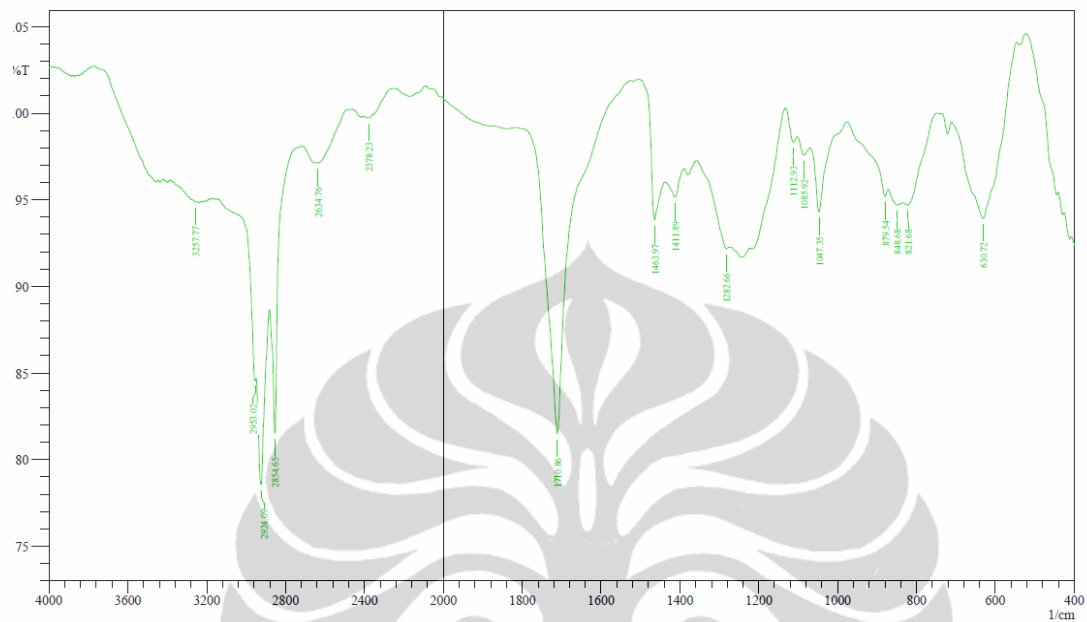
Spektra IR Zeolit



Lampiran 14 :

Spektra IR Asam Lemak Kelapa

SHIMADZU



asam lemak kelapa

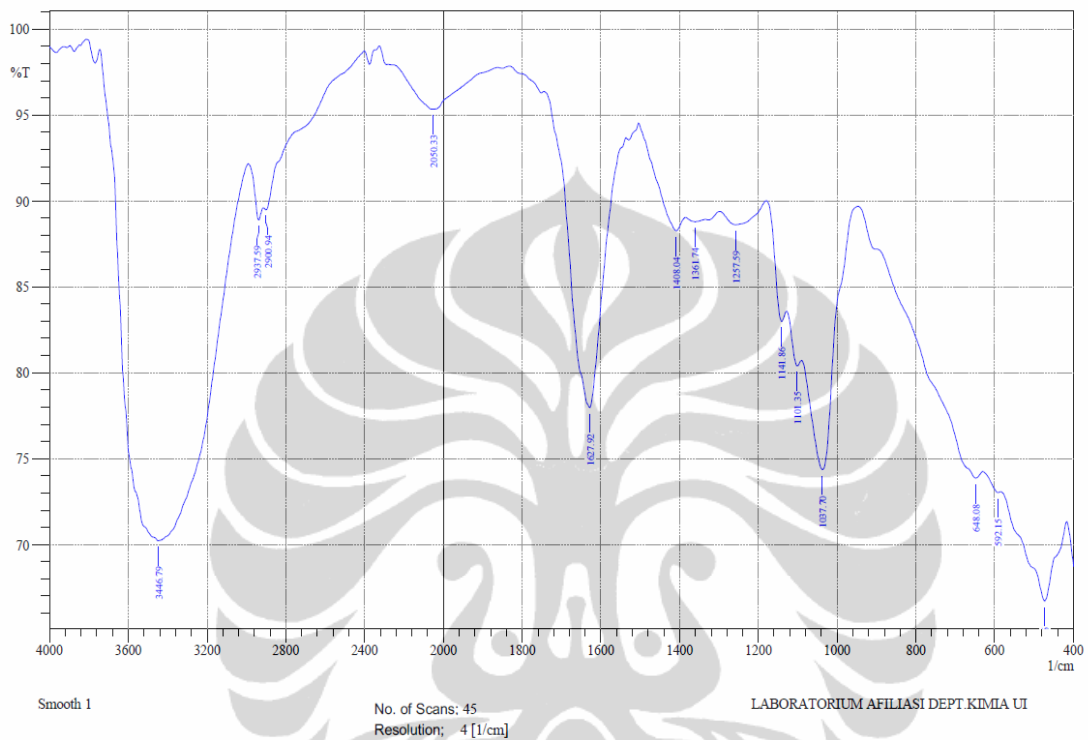
No. of Scans: 45
Resolution: 4 [1/cm]

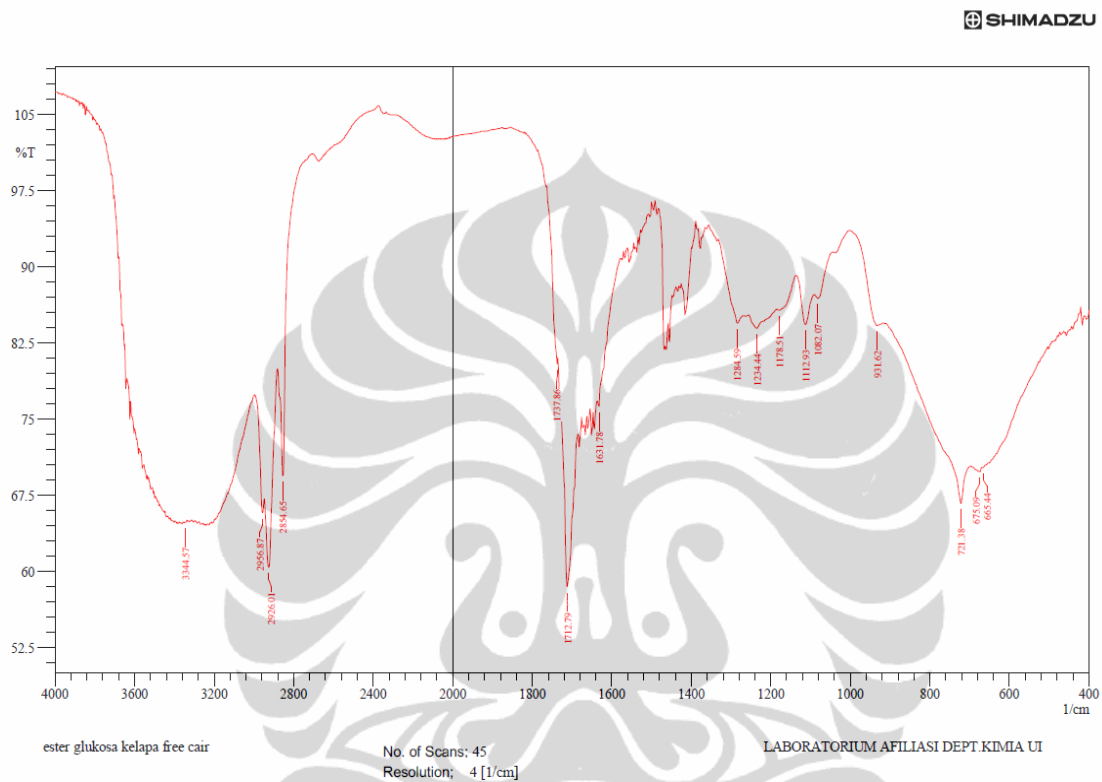
LABORATORIUM AFILIASI DEPT. KIMIA UI

Lampiran 15 :



Spektra IR Glukosa

SHIMADZU



Lampiran 16 :**Spektra IR ester Glukosa *Free* enzim****Lampiran 17 :**

Analisis Komponen Minyak Kelapa

	KEMENTERIAN PERINDUSTRIAN RI BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN INDUSTRI BALAI BESAR INDUSTRI AGRO LABORATORIUM ANALISIS DAN KALIBRASI BALAI BESAR INDUSTRI AGRO ANALYTICAL AND CALIBRATION LABORATORIES CENTER FOR AGRO-BASED INDUSTRY Jalan Ir. H. Juanda 11, Bogor 16122 Telp. : (0251) 8324088, 8323339 Fax : (0251) 8323339	 Komite Akreditasi Nasional Laboratorium Penguji LP-057-10N
<p>Kepada : To : DEPARTEMEN KIMIA UI KAMPUS UI DEPOK</p>		
<h3>LAPORAN HASIL UJI</h3> <h4>TEST REPORT</h4>		
Balasan surat/ Permintaan tanggal : Reply to your letter/ request dated	Nomor / Number : 11528/LHU/04/ABICAL.1 / XI / 2010 Nomor Analisis Analysis Number : 12653 dan 12654 Nomor Seri Serial Number : 11525 Halaman : 1 dari / of 2 Tanggal penerbitan : 19 Nopember 2010 date of issue	
Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian The undersigned attests that the testing of		
Contoh : Sample (s) :	Minyak Goreng Kode : A & B	
Untuk analisis for analysis :	Kimia	
Keterangan contoh Description of sample :	Dikemas dalam botol	
Diambil dari Taken from :	-	
Oleh By :	-	
Tanggal penerimaan contoh Date of sample :	25 Oktober 2010	
Tanggal pelaksanaan analisis Date of analysis :	26 Oktober 2010	
Pengambilan contoh Sampling :	-	
adalah sebagai berikut The result is as follows :	-	
* FAD.04a	HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH TERSEBUT DIATAS. PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.	

Lanjutan

H A S I L TEST RESULT

Nomor Seri : 11528
Serial Number

Nomor / Number : 11528/LHU/Bd/ABICAL. 1/ XI / 2010

Nomor Analisis : 12663 dan 12664
Analysis Number

Halaman / Page : 2 Dari / of 2

No. Analisis		12663	12664	Metoda Uji/Teknik
Kode contoh		A	B	
Parameter	Satuan	Hasil		
Komposisi asam lemak :				
Asam lemak jenuh				GC
Kaprilat (C8)	%	0,09	7,20	
Kaprat (C10)	%	0,13	8,02	
Laurat (C12)	%	0,51	54,1	
Minstat (C14)	%	1,24	17,4	
Palmitat (C16-0)	%	35,5	6,64	
Stearat (C18-0)	%	2,82	1,86	
Asam lemak tidak jenuh :				GC
Oleat (C18-1)	%	41,1	3,99	
Linoleat (C18-2)	%	17,8	0,81	
Linolenat (C18-3)	%	0,78	0,02	

ASLI
ORIGINAL

Laboratorium Analisis dan Kalibrasi
Balai Besar Industri Agro

Analytical and Calibration Laboratories
Center for Agro-Based Industry

Manajer Teknis Pengujian

(Mulhaquddin S, M.Si)

es/ef

HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS.
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.

FAD.04a

Lanjutan

Komposisi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa (diperjelas dari hasil diatas)

Asam Lemak	Persentase Asam Lemak (%)
Kaprilat (C8)	7,2
Kaprat (C10)	8,02
Laurat (C12)	54,1
Miristat (C14)	17,4
Palmitat (C16:0)	6,64
Stearat (C18:0)	1,86
Oleat (C18:1)	3,99
Linoleat (C18:2)	0,81
Linolenat (C18:3)	0,02

