



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI ESTERIFIKASI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK KELAPA DENGAN GLUKOSA MENGGUNAKAN
LIPASE *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 TERIMOBILISASI PADA
MATRIKS Ca-ALGINAT**

SKRIPSI

SYARIFAH HASNA

0806326960

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI ESTERIFIKASI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK KELAPA DENGAN GLUKOSA MENGGUNAKAN
LIPASE *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 TERIMOBILISASI PADA
MATRIKS Ca-ALGINAT**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

SYARIFAH HASNA

0806326960

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

JULI 2012

i

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Syarifah Hasna

NPM : 0806326960

Tanda Tangan :



Tanggal : 3 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Syarifah Hasna
NPM : 0806326960
Program Studi : S1 Reguler Kimia
Judul Skripsi : Studi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis
Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan
Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimobilisasi
pada Matriks Ca-Alginat

Telah berhasil dipertahankan di hadapan 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 : Dra. Siswati Setiasih, Apt., M.Si (.....)

Pembimbing : Dra. Sri Handayani, M.Biomed (.....)

Penguji : Prof. Dr. Usman S.F. Tambunan (.....)

Penguji : Prof. Dr. Sumi Hudiyono P.W.S. (.....)

Penguji : Drs. Riswiyanto Siswoyo, M.Si (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 3 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala rahmat, kasih sayang, berkah dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Studi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3**

Terimobilisasi pada Matriks Ca-Alginat 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.

Keberhasilan penulis menyelesaikan tugas akhir ini adalah berkat bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Meskipun banyak hambatan dan rintangan yang dihadapi, namun penyelesaian tugas akhir ini dapat menjadi pelajaran dan pengalaman yang berarti kelak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dra. Siswati Setiasih, Apt., M.Si, terima kasih atas segala diskusi dan bimbingannya, atas segala kepedulian dan sikap keibuannya. Terima kasih telah membimbing dengan penuh senyuman setiap saat.
2. Ibu Dra. Sri Handayani, M.Biomed, terima kasih atas segala bimbingannya, waktunya untuk mendengarkan curhatan penulis dan suntikan semangatnya tiap kali bertemu.
3. Bapak Prof. Dr. Sumi Hudyono P.W.S. terima kasih atas segala bantuan diskusinya.
4. Bapak Dr. Ridla Bakri selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI dan Ibu Dra. Tresye Utari, M.Si selaku koordinator penelitian Departemen Kimia UI.
5. Bapak Dr. Jarnuzi Gunlazuardi selaku pembimbing akademis penulis selama penulis menimba ilmu di Departemen Kimia FMIPA UI. Terima kasih atas segala kemudahan dalam penyetujuan IRS serta arahannya.
6. Bapak dan Ibu dosen Departemen Kimia FMIPA UI, terutama dosen-dosen KBI Biokimia, terima kasih atas segala ilmu yang telah diajarkan kepada penulis.

7. Laboran Departemen Kimia, terutama Mba Tri atas prosedur untuk metode Lowry-nya, Mba Emma atas pinjaman enzimnya, Mba Ina dan Mba Cucu atas pinjaman pH meter dan piknometer, Mba Elva dan Mba Ati atas segala bantuannya selama penulis mengerjakan penelitian tugas akhir ini.
8. Dr. drg. Decky Jusiana Indrani, terima kasih atas pemberian Nalginatnya, dan Ibu Agustina dari PT. Sumi Asih, terima kasih atas pemberian asam lauratnya.
9. Ibunda tercinta, terima kasih untuk segala-galanya, dan Ayah tercinta, terima kasih atas segala kesabarannya mau mengantar jemput ke manapun penulis pergi. Terima kasih atas segala kasih sayang dan dukungan kalian baik moril maupun materiil yang kalian berikan selama ini kepada penulis.
10. Dian Nur Insani, sahabat seperjuangan, terima kasih atas segala *virtue* yang ditularkan kepada penulis, atas canda dan tawa yang telah menghibur kita dari segala kesulitan bersama, atas persahabatan kita sebelum dan saat penelitian, sukses untuk kita bersama!
11. Septiani Rahmawati Fadillah dan Tri Destiyanti, sahabat seperjuangan, terima kasih atas segala kebersamaan kita selama penelitian.
12. Ahmad Baihaqi, dan Bali Susilo, rekan-rekan seperjuangan, terima kasih atas segala tawa, canda, maupun kekesalan yang pernah kita lalui bersama.
13. Kak Firmansyah Wardani, terima kasih atas segala *support*, kesabaran dan kesediaan waktunya mendengarkan dan memberi solusi atas curhatan penulis selama penelitian.
14. Rasti Yunita, Amalia Hapsari, Lulu Restiana, dan Rina Utami atas persahabatan kita selama menimba ilmu di Kimia UI.
15. Kak Awaliatul Barkah, terima kasih atas segala bantuannya, maaf penulis selalu banyak bertanya.
16. Teman-teman seperjuangan, di KBI Biokimia: Vina, Putri, Daniel, Intan, Lilid, di lantai 4: Prili, Decil, Adi, Esti, Linyo, Bu Ugi, Hafiz, Ka Widi, Boy, Rahmat, di lantai 3: Rina, Resty, Andi, Nia, Disa, Dewi, Hadi, Reza, Asa, Chusnul, Asef, Ina, One, Pandu, Helen, maupun yang di lab kering: Bimo.

17. Kak Mitra Fany dan Kak Iman Abdullah, terima kasih atas pinjaman labu evaporator dan labu bulat leher tiganya.
18. Babeh perpus Pak Sutrisno, dan Pak Amin, atas segala bantuannya yang diberikan kepada penulis selama penulis melakukan penelitian.
19. Teman-teman Kimia UI 2008, terima kasih atas 4 tahun kebersamaan dan atas segala suka dan duka yang kita lalui bersama.
20. Kakak-kakak Kimia 2007, terutama kak Ikan, kak Widi dan kak Zetri, terima kasih atas segala bantuan diskusinya kepada penulis.
21. Teman-teman angkatan 2009 dan teman-teman angkatan 2010 lainnya yang tidak bisa disebut satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan tugas akhir ini 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 : Syarifah Hasna
NPM : 0806326960
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

“Studi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimobilisasi pada Matriks Ca-Alginat”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, 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 : 3 Juli 2012

Yang menyatakan



(Syarifah Hasna)

ABSTRAK

Nama : Syarifah Hasna

Program Studi : Kimia

Judul : Studi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Terimobilisasi pada Matriks Ca-Alginat

Sintesis ester asam lemak karbohidrat pada penelitian ini dilakukan melalui reaksi esterifikasi antara glukosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa. Reaksi esterifikasi dilakukan secara enzimatis menggunakan lipase *Candida rugosa* dengan pelarut organik (n-heksana) serta kandungan air yang relatif sedikit. Produk hasil sintesis diuji dengan uji emulsi dan diketahui memiliki sifat sebagai *emulsifier*. Hasil identifikasi produk menggunakan FT-IR menunjukkan serapan gugus ester pada bilangan gelombang 1737 cm^{-1} . Pada imobilisasi lipase dalam matriks gel Ca-alginat, diperoleh kondisi optimum pada konsentrasi alginat 1% dan menghasilkan efisiensi imobilisasi sebesar 61,66%. Optimasi kondisi esterifikasi dengan lipase imobil dilakukan pada beberapa parameter seperti variasi suhu inkubasi, rasio substrat, waktu inkubasi, dan berat *molecular sieve*. Kondisi optimum reaksi esterifikasi diperoleh pada suhu 35°C , rasio mol asam lemak dengan glukosa 60:1, waktu inkubasi 16 jam, dan tanpa penambahan *molecular sieve*, dengan persen konversi sebesar 4,10%.

Kata kunci : ester glukosa, lipase *Candida rugosa*, imobilisasi lipase, Ca-alginat, asam lemak minyak kelapa

xvi+88 halaman : 40 gambar; 13 lampiran; 13 tabel

Daftar pustaka : 56 (1951 – 2011)

ABSTRACT

Name : Syarifah Hasna
Study Program : Chemistry
Title : Study of Esterification between Coconut Oil Fatty Acid and Glucose by Using *Candida rugosa* Lipase EC 3.1.1.3 Immobilized on Ca-alginate

In this study, the synthesis of fatty acid – carbohydrate esters used glucose (G) and coconut oil fatty acid (FA). The esterification reaction was carried out enzymatically using *Candida rugosa* lipase in the present of organic solvent (n-hexane). The synthesized product was then examined by simple emulsion test and was proved to be an emulsifier. The characterization of synthesized product with FT-IR showed that product exhibit the absorbtion of ester functional group at 1737 cm^{-1} . Lipase immobilization on Ca-alginate gel beads was also carried out to ease the separation of the enzyme from the system. The optimum condition for immobilization is by using Na-alginate 1%, resulting 61,66% immobilization yield. Some parameters in the esterification reaction such as temperature, the molar ratio between glucose and fatty acid, time for incubation, and the weight of molecular sieve were also optimized. The optimum conditions for esterification using immobilized lipase on Ca-alginate were at 35°C , the molar ratio 1:60 (G/FA), 16 hours incubation time and 0 gr molecular sieve. The acid conversion at optimum conditions was up to 4,10%.

Keywords : glucose ester, *Candida rugosa* lipase, lipase immobilization, Ca-alginate, coconut oil fatty acid

xvi+88 pages : 40 pictures; 13 appendixes; 13 tables

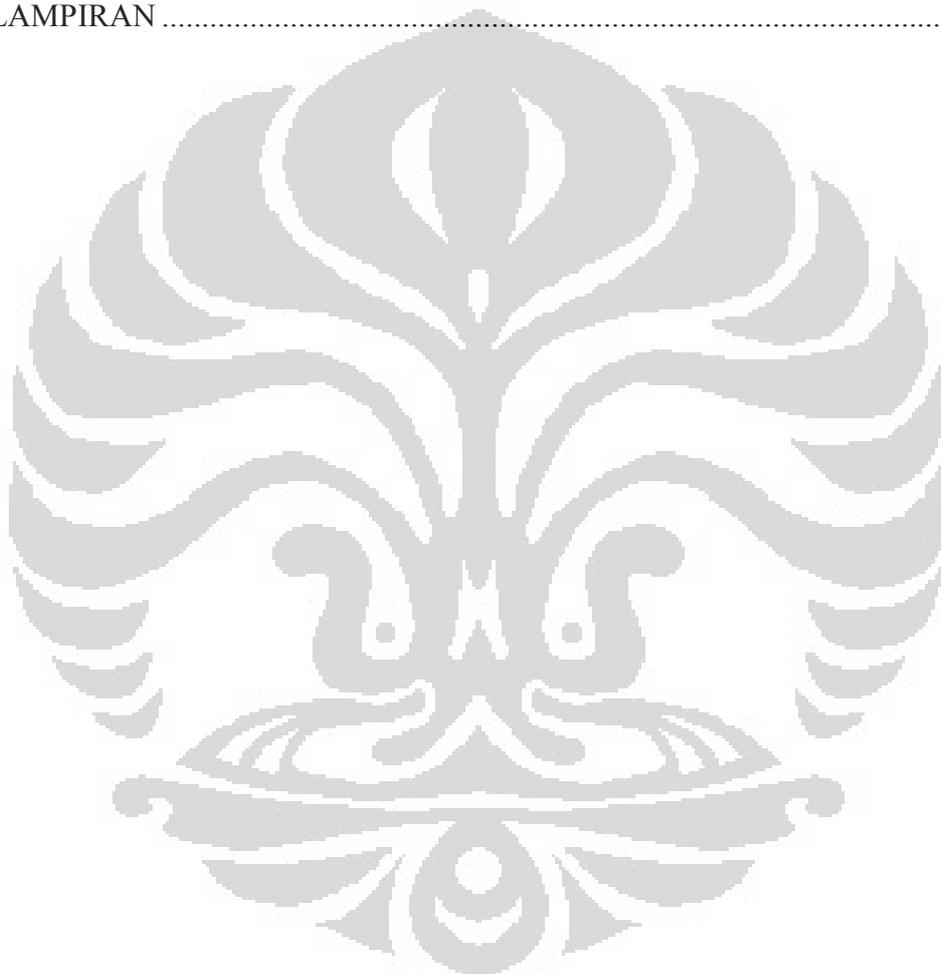
References : 56 (1951 – 2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Kelapa.....	4
2.2 Minyak Kelapa.....	4
2.3 Glukosa.....	7
2.4 Enzim.....	8
2.4.1 Struktur Enzim.....	8
2.4.2 Mekanisme Kerja Enzim.....	9
2.4.3 Spesifisitas Enzim.....	11
2.4.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	12
2.4.5 Klasifikasi dan Penamaan Enzim.....	14
2.5 Lipase.....	15
2.5.1 Sumber Lipase.....	16
2.5.2 Aplikasi Lipase.....	17
2.6 Lipase <i>Candida rugosa</i>	18
2.7 Imobilisasi Enzim.....	19
2.7.1 Material Matriks Imobilisasi.....	20

2.7.2	Teknik Imobilisasi	20
2.8	Alginat	24
2.9	<i>Molecular Sieve</i>	26
2.10	Reaksi Esterifikasi	28
2.11	Ester Glukosa	29
2.12	<i>Emulsifier</i>	29
2.13	Analisis Ester Glukosa	30
BAB 3 METODE PENELITIAN		31
3.1	Alat dan Bahan	31
3.1.1	Alat-Alat yang Digunakan	31
3.1.2	Bahan-Bahan yang Digunakan	31
3.2	Prosedur Kerja	32
3.2.1	Hidrolisis Trigliserida pada Minyak Kelapa	32
3.2.2	Pendahuluan Esterifikasi Asam Lemak-Glukosa Menggunakan Lipase <i>Candida rugosa</i>	32
3.2.2.1	Uji Produk Ester Glukosa Hasil Sintesis Sebagai <i>Emulsifier</i>	33
3.2.2.2	Penentuan Jenis Emulsi dengan Mikroskop	33
3.2.3	Optimasi Imobilisasi Lipase pada Matriks Ca-alginat	33
3.2.3.1	Penentuan Konsentrasi Protein Lipase Imobil Melalui Metode Lowry	34
3.2.3.2	Penentuan Aktivitas Hidrolisis Lipase Melalui Metode Titrimetri	35
3.2.4	Optimasi Esterifikasi Asam Lemak - Glukosa Menggunakan Lipase Imobil	36
3.2.5	Analisis Hasil Esterifikasi	36
3.2.6	Pemisahan dan Identifikasi Produk Hasil Esterifikasi	36
3.3	Bagan Kerja Secara Umum	38
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN		39
4.1	Hidrolisis Trigliserida	39
4.2	Sintesis Ester Glukosa Secara Enzimatis dengan Lipase <i>Candida rugosa</i>	42
4.3	Optimasi Imobilisasi Lipase <i>Candida rugosa</i> pada Matriks Ca- Alginat	52
4.4	Penggunaan Lipase Imobil pada Ca-alginat Sebagai Katalis Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Hidrolisat dengan Glukosa	58
4.5	Optimasi Kondisi Esterifikasi Menggunakan <i>Bead</i> Lipase Imobil pada Ca-alginat	59

4.5.1 Optimasi Suhu Reaksi.....	60
4.5.2 Optimasi Rasio Antara Asam Lemak dengan Glukosa.....	61
4.5.3 Optimasi Waktu Inkubasi Reaksi Esterifikasi	63
4.5.4 Optimasi Berat <i>Molecular Sieve</i>	64
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	67
5.1 Kesimpulan	67
5.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA.....	68
LAMPIRAN	72



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Pohon kelapa (<i>Cocos nucifera</i> L.) dan buah kelapa	4
Gambar 2.2. Minyak atau lemak sebagai bahan dasar industri oleokimia beserta produk turunannya	6
Gambar 2.3. Proyeksi Fischer dari D-Glukosa.....	7
Gambar 2.4. Kestimbangan bentuk rantai terbuka dan bentuk siklis dari D- Glukosa	7
Gambar 2.5. Fungsi kofaktor sebagai pengaktif apoenzim agar dapat mengkatalisis substrat (telah diolah kembali)	9
Gambar 2.6. Pengikatan substrat pada enzim di bagian sisi katalitik	10
Gambar 2.7. Diagram energi dari reaksi tanpa enzim dan reaksi dengan enzim (telah diolah kembali)	10
Gambar 2.8. Hipotesis kerja enzim	12
Gambar 2.9. Nomenklatur enzim	15
Gambar 2.10. Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh lipase	16
Gambar 2.11. Struktur tiga dimensi enzim lipase <i>Candida rugosa</i> (telah diolah kembali).....	19
Gambar 2.12. Penggolongan metode imobilisasi beserta beberapa ilustrasinya (telah diolah kembali)	21
Gambar 2.13. Ilustrasi dari metode <i>carrier binding</i> (telah diolah kembali)	21
Gambar 2.14. Ilustrasi metode <i>cross-linking</i> antar enzim.....	22
Gambar 2.15. Ilustrasi metode <i>entrapment</i> tipe kisi	23
Gambar 2.16. Ilustrasi metode <i>entrapment</i> tipe mikrokapsul	24
Gambar 2.17. Struktur asam manuronat dan asam guluronat serta ikatan yang terbentuk antara keduanya.....	25
Gambar 2.18. Selektivitas dari ukuran pori <i>molecular sieve</i> (telah diolah kembali).....	27
Gambar 2.19. Mekanisme reaksi esterifikasi menggunakan katalisis asam.....	28
Gambar 2.20. Ester glukosa.....	29
Gambar 3.1. Bagan kerja secara umum.....	38
Gambar 4.1. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan katalis basa (telah diolah kembali).....	40
Gambar 4.2. Konversi dari garam kalium-asam lemak menjadi asam lemak (telah diolah kembali)	41
Gambar 4.3. Asam lemak hasil reaksi hidrolisis minyak kelapa.....	42
Gambar 4.4. Campuran hasil reaksi sebelum dan sesudah proses demulsifikasi sederhana.....	46
Gambar 4.5. Spektrum FT-IR glukosa	47
Gambar 4.6. Spektrum FT-IR asam lemak hidrolisat	48
Gambar 4.7. Spektrum FT-IR produk hasil sintesis.....	49
Gambar 4.8. Hasil uji emulsi secara kualitatif	51
Gambar 4.9. Pengamatan uji kestabilan emulsi yang terbentuk.....	51
Gambar 4.10. Pengamatan emulsi yang terbentuk dengan mikroskop	52

Gambar 4.11. <i>Bead</i> Ca-alginat yang terbentuk saat larutan alginat ditetaskan ke dalam larutan CaCl_2	54
Gambar 4.12. Alginat dengan rasio M/G yang berbeda saat membentuk ikatan silang dengan ion divalen (telah diolah kembali)	54
Gambar 4.13. Grafik % <i>loading</i> dan efisiensi imobilisasi vs % alginat yang digunakan	55
Gambar 4.14. <i>Bead</i> lipase imobil Ca-alginat yang dihasilkan dari larutan alginat dengan konsentrasi 1 – 2%.....	56
Gambar 4.15. Hasil inkubasi sampel (kiri) dan blanko (kanan).....	59
Gambar 4.16. Grafik hubungan suhu dengan persen konversi asam lemak.....	60
Gambar 4.17. Grafik hubungan rasio glukosa/asam lemak dengan persen konversi asam lemak	62
Gambar 4.18. Grafik hubungan waktu dengan persen konversi asam lemak	64
Gambar 4.19. Grafik hubungan berat <i>molecular sieve</i> dengan persen konversi asam lemak.....	65



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Sifat-sifat minyak kelapa.....	5
Tabel 2.2. Hubungan antara nilai log P dengan aktivitas enzim	13
Tabel 2.3. Sumber lipase dari mikroorganisme.....	17
Tabel 2.4. Aplikasi lipase di berbagai bidang	18
Tabel 2.5. <i>Molecular Sieve</i>	27
Tabel 4.1. Identifikasi gugus fungsi spektrum IR glukosa.....	47
Tabel 4.2. Identifikasi gugus fungsi spektrum IR asam lemak hidrolisat	48
Tabel 4.3. Identifikasi gugus fungsi spektrum IR produk esterifikasi	49
Tabel 4.4. Hubungan konsentrasi alginat dengan % <i>loading</i> dan efisiensi imobilisasi.....	55
Tabel 4.5. Data persen konversi asam lemak variasi suhu inkubasi	60
Tabel 4.6. Data persen konversi asam lemak variasi rasio mol substrat	62
Tabel 4.7. Data persen konversi asam lemak variasi waktu inkubasi	63
Tabel 4.8. Data persen konversi asam lemak variasi berat <i>molecular sieve</i>	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan BM asam lemak hidrolisat minyak kelapa	72
Lampiran 2. Perhitungan penentuan rasio bahan	74
Lampiran 3. Data penentuan konsentrasi protein dengan metode Lowry	76
Lampiran 4. Data penentuan aktivitas lipase bebas dan lipase imobil Ca- alginat dengan metode titrimetri	78
Lampiran 5. Data titrasi asam lemak sisa variasi suhu inkubasi	79
Lampiran 6. Data titrasi asam lemak sisa variasi rasio glukosa/asam lemak	80
Lampiran 7. Data titrasi asam lemak sisa variasi waktu inkubasi	81
Lampiran 8. Data titrasi asam lemak sisa variasi berat <i>molecular sieve</i>	82
Lampiran 9. Data spesifikasi lipase <i>Candida rugosa</i>	83
Lampiran 10. Data analisis kandungan asam lemak minyak kelapa	84
Lampiran 11. Spektrum FT-IR asam lemak minyak kelapa	86
Lampiran 12. Spektrum FT-IR glukosa	87
Lampiran 13. Spektrum FT-IR ester glukosa hasil sintesis menggunakan lipase <i>Candida rugosa</i>	88

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ester asam lemak dengan karbohidrat sederhana merupakan suatu substitusi lemak non kalori yang tidak tercerna serta tidak terabsorpsi dalam tubuh. Salah satu aplikasi ester asam lemak karbohidrat adalah sebagai pengganti lemak (*fat replacer*) dalam bahan makanan (Sakidja, 1998). Selain sebagai pengganti lemak, ester asam lemak karbohidrat ini juga memiliki fungsi lain. Bergantung pada derajat esterifikasinya, ester asam lemak karbohidrat dapat berfungsi sebagai *emulsifier* untuk makanan atau sebagai *fat replacer* (Akoh, 1998; Youchun, 2001).

Emulsifier merupakan suatu senyawa aktif penurun tegangan permukaan yang sekaligus memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu struktur molekul yang sama. *Emulsifier* banyak diaplikasikan secara luas dalam bidang industri, seperti industri pangan, farmasi, detergen, kosmetik, dan lain-lain. Seiring dengan meningkatnya kesadaran akan kesehatan dan lingkungan yang baik, permintaan akan *emulsifier* yang ramah lingkungan dan mudah terdegradasi semakin meningkat. Salah satu *emulsifier* yang memenuhi kriteria tersebut adalah ester asam lemak karbohidrat (Adelhorst, *et al.*, 1990; Arcos, *et al.*, 1998).

Ester asam lemak karbohidrat ini dapat diperoleh melalui reaksi esterifikasi antara gula sederhana seperti glukosa dengan asam lemak yang berasal dari minyak kelapa, baik secara kimiawi maupun enzimatis. Sebagian besar produksi ester asam lemak karbohidrat dilakukan secara kimiawi. Namun, reaksi secara kimiawi umumnya memerlukan kondisi reaksi yang cukup ekstrim. Alternatif untuk produksi ester asam lemak karbohidrat ialah melalui reaksi enzimatis. Salah satu reaksi yang saat ini telah dipelajari ialah esterifikasi asam oleat dan berbagai gula dengan bantuan enzim lipase (Yoo, *et al.*, 2007). Pada penelitian sebelumnya dilakukan juga esterifikasi antara asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan sukrosa menggunakan enzim lipase (Barkah, 2011).

Reaksi kimia dengan bantuan enzim sebagai katalis umumnya relatif tidak ekonomis terutama apabila enzim yang digunakan tidak diregenerasi kembali. Kelemahan dari reaksi secara enzimatis – selain karena biaya – juga disebabkan tidak stabil terhadap kondisi yang berubah-ubah, ketersediaannya dalam jumlah yang kecil, dan juga kesulitan untuk memperoleh kembali enzim tersebut dari larutan di akhir proses katalisis. Selain itu, reaksi esterifikasi enzimatis merupakan reaksi kesetimbangan dan menghasilkan air sebagai hasil samping yang dapat mempengaruhi kerja enzim lipase sehingga mengganggu efisiensi pembentukan produk pada reaksi selanjutnya (Yu, *et al.*, 2008; Poerwanto, *et al.*, 2010).

Modifikasi enzim dengan cara imobilisasi belakang ini cukup menjadi perhatian untuk industri yang menggunakan enzim sebagai katalis dalam reaksi kimia. Imobilisasi enzim pada suatu matriks yang *inert* dan tidak larut diketahui memiliki beberapa keuntungan, di antaranya cenderung menstabilkan struktur enzim yang digunakan sehingga meningkatkan ketahanan enzim terhadap kondisi pH, suhu, dan pelarut organik (Matsumoto & Ohashi, 2003). Studi imobilisasi lipase diketahui juga meningkatkan aktivitas katalitik untuk reaksi esterifikasi dan mampu mempertahankan aktivitas katalitik tersebut sampai beberapa hari setelah penyimpanan (da Silva, *et al.*, 2008).

Salah satu contoh matriks yang dapat dipakai pada proses imobilisasi ialah alginat, karena alginat memiliki kemampuan membentuk gel saat bereaksi dengan kation divalen. Aplikasi alginat sebagai matriks imobilisasi di antaranya ialah pada imobilisasi mikroba maupun enzim (Kierstan & Bucke, 1977). Metode imobilisasi dengan menggunakan alginat dapat dilakukan pada suhu ruang, lebih mudah dan ekonomis dalam pengerjaannya.

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Barkah, 2011), dengan pengembangan yaitu imobilisasi lipase dalam matriks Ca-alginat sebagai katalis untuk reaksi esterifikasi asam lemak minyak kelapa dengan glukosa. Dalam penelitian ini juga digunakan *molecular sieve* sebagai penarik molekul air yang diharapkan dapat menggeser kesetimbangan reaksi esterifikasi ke arah pembentukan produk.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dapat digunakan sebagai substrat pada reaksi sintesis ester glukosa menggunakan lipase *Candida rugosa*?
2. Apakah lipase *Candida rugosa* imobil pada Ca-alginat dapat digunakan sebagai biokatalis reaksi esterifikasi antara glukosa dengan asam lemak hidrolisat minyak kelapa?
3. Apakah penggunaan *molecular sieve* pada reaksi esterifikasi enzimatik menggunakan lipase imobil Ca-alginat antara glukosa dengan asam lemak minyak kelapa dapat meningkatkan persen konversi?

1.3 Hipotesis

1. Asam lemak hidrolisat minyak kelapa dapat digunakan sebagai substrat pada sintesis ester glukosa menggunakan lipase *Candida rugosa*.
2. Ester glukosa hasil sintesis dapat digunakan sebagai *emulsifier*.
3. Penggunaan *molecular sieve* akan menarik molekul air dan mendorong kesetimbangan pada reaksi esterifikasi ke arah pembentukan produk sehingga dapat diperoleh persentase produk yang lebih besar.
4. Lipase imobil pada Ca-alginat dapat digunakan sebagai biokatalis reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak kelapa dengan glukosa.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Melakukan sintesis ester glukosa dari asam lemak hidrolisat minyak kelapa dengan bantuan lipase *Candida rugosa*.
2. Melakukan imobilisasi lipase *Candida rugosa* pada matriks Ca-alginat serta mencari optimasinya.
3. Mendapatkan kondisi optimum dari reaksi esterifikasi asam lemak – glukosa dengan menggunakan lipase imobil pada Ca-alginat.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kelapa

Tanaman kelapa (*Cocos nucifera* L.) adalah satu jenis tumbuhan dari suku aren-arenan atau Arecaceae dan merupakan anggota tunggal dalam marga *Cocos*. Tumbuhan ini dimanfaatkan hampir semua bagiannya oleh manusia, sehingga dianggap sebagai tumbuhan serba guna, khususnya bagi masyarakat pesisir. Kelapa merupakan sebutan untuk buah yang dihasilkan tumbuhan ini. Berikut adalah ilustrasi dari pohon dan buah kelapa (Gambar 2.1).



<i>Kingdom</i>	: Plantae
<i>Subkingdom</i>	: Tracheobionta
<i>Superdivision</i>	: Spermatophyta
<i>Division</i>	: Magnoliophyta
<i>Class</i>	: Liliopsida
<i>Subclass</i>	: Arecidae
<i>Order</i>	: Arecales
<i>Family</i>	: Arecaceae
<i>Genus</i>	: <i>Cocos</i>
<i>Species</i>	: <i>C. nucifera</i>
<i>Binomial name</i>	: <i>Cocos nucifera</i> L.

Gambar 2.1. Pohon kelapa (*Cocos nucifera* L.) dan buah kelapa

2.2 Minyak Kelapa

Minyak kelapa merupakan minyak yang diperoleh dari kopra (daging buah kelapa yang dikeringkan) atau dari perasan santannya. Kandungan minyak pada daging buah kelapa tua diperkirakan mencapai 30 – 35%, sedangkan kandungan minyak dalam kopra mencapai 63 – 72%. 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 (0,060 - 0.080%), tokoferol (0,003%), dan asam lemak bebas (kurang dari 5%) serta sedikit protein dan karoten. Sterol berfungsi sebagai penstabil dalam minyak dan tokoferol sebagai antioksidan (Ketaren, 1986). Pada Tabel 2.1 berikut tertera sifat-sifat yang dimiliki minyak kelapa.

Tabel 2.1. Sifat-sifat minyak kelapa

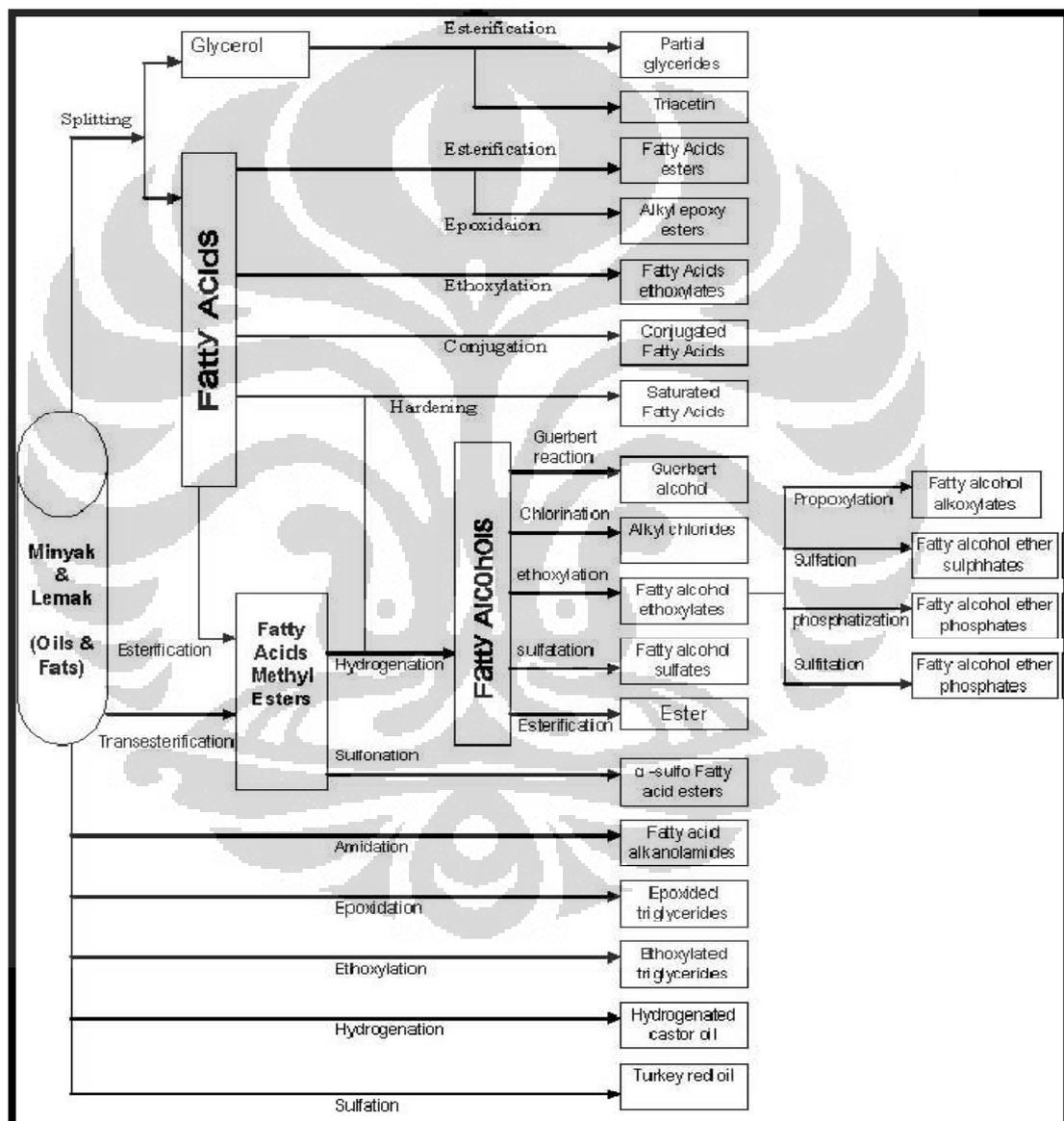
Sifat-sifat	Nilai pengukuran
Indeks refraksi pada 40° C	1448 – 1450
Bilangan penyabunan	250 – 264
Bilangan Iod	6,3 – 10,6
Titik lebur (°C)	23 – 26
Indeks lemak padat (%)	
pada 10,0 °C	54,5
pada 21,1 °C	26,6
pada 26,7 °C	0,3
Komposisi asam lemak	
Kaprilat	7,6
Kaprat	7,3
Laurat	48,2
Miristat	16,6
Palmitat	8,0
Palmitoleat	1,0
Stearat	3,8
Oleat	5,0
Linoleat	2,5

[Sumber: O'Brien, 1998]

Minyak kelapa merupakan salah satu minyak nabati yang diperdagangkan di dunia, baik untuk kebutuhan rumah tangga maupun industri. Kontribusi minyak kelapa dalam perdagangan dunia hanya sebesar 2,98%, jauh lebih kecil dibanding minyak sawit dan minyak kedelai yang masing-masing hampir mencapai 30%.

Meskipun persentasenya relatif kecil, namun minyak kelapa merupakan bahan baku yang sangat penting bagi industri oleokimia.

Minyak kelapa merupakan sumber utama asam lemak (terutama asam laurat) dan berbagai turunannya, yang selanjutnya akan diproses lebih lanjut untuk menghasilkan produk yang bernilai ekonomis tinggi. Gambar 2.2 berikut memperlihatkan berbagai proses untuk menghasilkan berbagai turunan produk asam lemak.

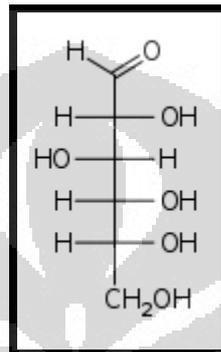


[Sumber: Anonim, Peran Minyak Kelapa dalam Industri Oleokimia]

Gambar 2.2. Minyak atau lemak sebagai bahan dasar industri oleokimia beserta produk turunannya

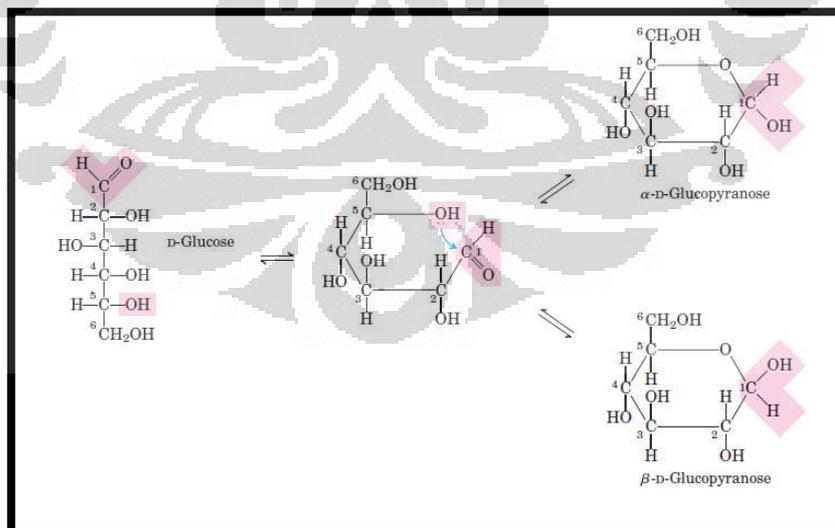
2.3 Glukosa

Glukosa, sebuah monosakarida dengan rumus molekul $C_6H_{12}O_6$, merupakan karbohidrat golongan aldohexosa. Glukosa secara spesifik dicirikan dengan konfigurasi absolut monosakarida aldohexosa, yaitu $2R, 3S, 4R, 5R$ yang menggambarkan konfigurasi absolut isomer D-glukosa. Struktur molekul glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.3 berikut.



Gambar 2.3. Proyeksi Fischer dari D-Glukosa

Dalam larutan, 99% glukosa merupakan gula piranosa, 0,25% bentuk rantai terbuka, dan sedikit sekali bentuk gula furanosa. Ilustrasi dari kesetimbangan struktur siklis glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.4.



[Sumber: Nelson & Cox, 2004]

Gambar 2.4. Kesetimbangan bentuk rantai terbuka dan bentuk siklis dari D-Glukosa

2.4 Enzim

Enzim merupakan suatu biomolekul yang memiliki aktivitas katalitik terhadap suatu reaksi kimia (biokatalis). Pada suatu reaksi enzimatik, molekul reaktan yang berikatan dengan enzim disebut sebagai substrat. Pada umumnya, enzim bersifat spesifik terhadap substrat yang dikatalisis, baik spesifik secara gugus fungsi, maupun secara stereokimia. Spesifisitas enzim didefinisikan sebagai kemampuan suatu enzim untuk mendiskriminasikan substratnya berdasarkan pada perbedaan afinitas substrat-substrat untuk mencapai sisi aktif enzim (Nelson & Cox, 2004).

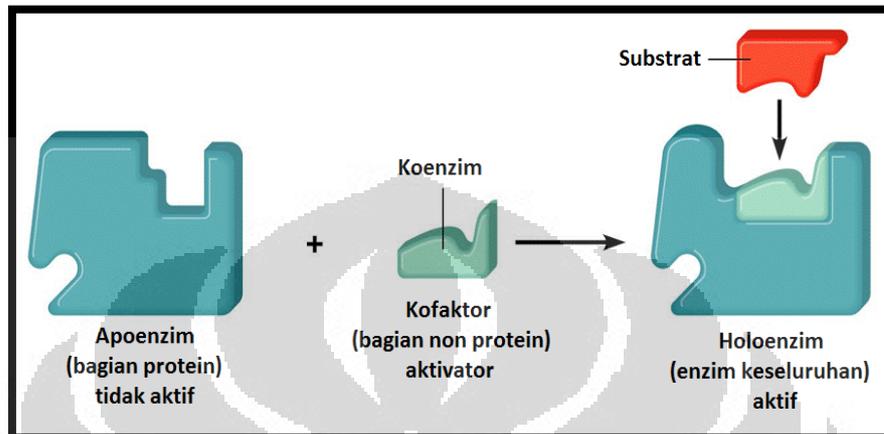
Aktivitas katalitik dari suatu enzim bergantung pada konformasi tiga dimensi dari protein-protein penyusunnya. Gangguan terhadap konformasi tersebut, baik denaturasi maupun disosiasi menjadi subunitnya, akan mengakibatkan hilangnya aktivitas katalitik dari suatu enzim. Jika suatu enzim terpecah menjadi komponen asam aminonya, maka aktivitas katalitiknya juga akan hilang. Struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener dari protein-protein penyusun enzim memiliki peran esensial terhadap aktivitas katalitiknya (Nelson & Cox, 2004).

Jumlah enzim, yang dinyatakan dengan unit enzim, biasa dipakai untuk menentukan aktivitas enzim. Satu unit enzim adalah jumlah enzim yang mampu mengkatalisis 1 μmol substrat per menit pada kondisi tertentu. Aktivitas spesifik enzim adalah unit enzim per mg preparat enzim. Aktivitas spesifik enzim digunakan untuk menentukan kemurnian enzim dalam preparat yang apabila nilainya besar menandakan enzim tersebut semakin murni.

2.4.1 Struktur Enzim

Umumnya enzim adalah suatu protein, kecuali ribozim (molekul RNA yang juga memiliki aktivitas biokatalitik) (Nelson & Cox, 2004). Pada mulanya enzim dianggap hanya terdiri atas protein, misalnya pepsin dan tripsin. Tetapi ada juga enzim-enzim yang selain protein juga memerlukan komponen bukan protein. Komponen bukan protein pada enzim dinamakan kofaktor. Kofaktor dapat berupa ion logam atau molekul organik yang dinamakan koenzim. Enzim yang tidak memiliki kofaktor dan tidak aktif disebut apoenzim, sedangkan apoenzim bersama dengan kofaktor disebut holoenzim (Nelson & Cox, 2004). Bila kofaktor terikat

kuat bersama enzim melalui ikatan kovalen, maka kofaktor tersebut dinamakan gugus prostetik. Enzim yang memiliki gugus prostetik sulit untuk dipisahkan dengan kofaktornya tanpa merusak aktivitasnya. Berikut ini adalah ilustrasi peranan kofaktor bagi enzim (Gambar 2.5).

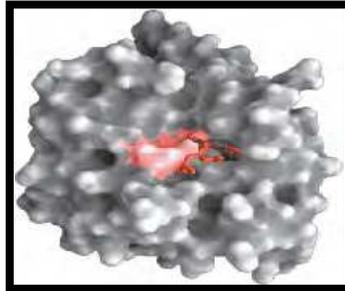


[Sumber: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap05/lecture2.htm>]

Gambar 2.5. Fungsi kofaktor sebagai pengaktif apoenzim agar dapat mengkatalisis substrat (telah diolah kembali)

2.4.2 Mekanisme Kerja Enzim

Enzim bekerja dengan mengubah substrat menjadi produk dengan jalan menurunkan energi aktivasi. Enzim tersebut akan bergabung sementara dengan substrat, sehingga tercapai keadaan transisi dengan energi aktivasi yang lebih rendah daripada energi aktivasi yang diperlukan untuk mencapai keadaan transisi tanpa bantuan katalisator atau enzim. Substrat bergabung dengan enzim pada bagian yang disebut sisi katalitik. Permukaan sisi katalitik enzim ialah residu asam amino dengan gugus fungsi yang mengikat substrat dan mengkatalisis transformasi kimianya (Nelson & Cox, 2004). Sering kali sisi katalitik juga mengelilingi substrat dan memisahkannya dari larutan. Ilustrasi dari hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.6.



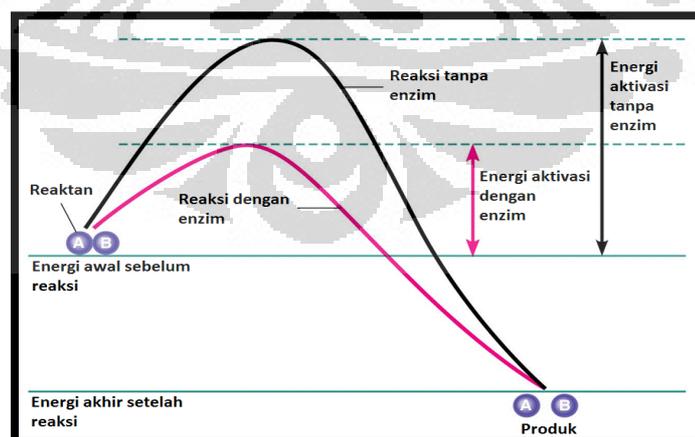
[Sumber: Nelson & Cox, 2004]

Gambar 2.6. Pengikatan substrat pada enzim di bagian sisi katalitik

Secara sederhana reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat dituliskan dengan persamaan reaksi sebagai berikut.



E, S, dan P menggambarkan enzim, substrat, dan produk. ES dan EP merupakan kompleks enzim dengan substrat dan produk yang bersifat sementara. Berdasarkan reaksi di atas, dapat dilihat bahwa pada akhir reaksi enzim akan diperoleh kembali. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi dan mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan energi aktivasi yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Berikut adalah ilustrasi yang menggambarkan fenomena tersebut (Gambar 2.7).



[Sumber: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap05/lecture2.htm>]

Gambar 2.7. Diagram energi dari reaksi tanpa enzim dan reaksi dengan enzim (telah diolah kembali)

2.4.3 Spesifisitas Enzim

Tidak semua substrat atau reaksi dapat dikatalisis oleh enzim menjadi produk. Beberapa enzim menunjukkan sifat spesifik absolut, yaitu hanya akan mengkatalisis satu jenis reaksi, sedangkan enzim lainnya bersifat spesifik terhadap suatu tipe ikatan kimia ataupun gugus fungsi tertentu. Pada umumnya, terdapat empat tipe spesifisitas enzim, yaitu:

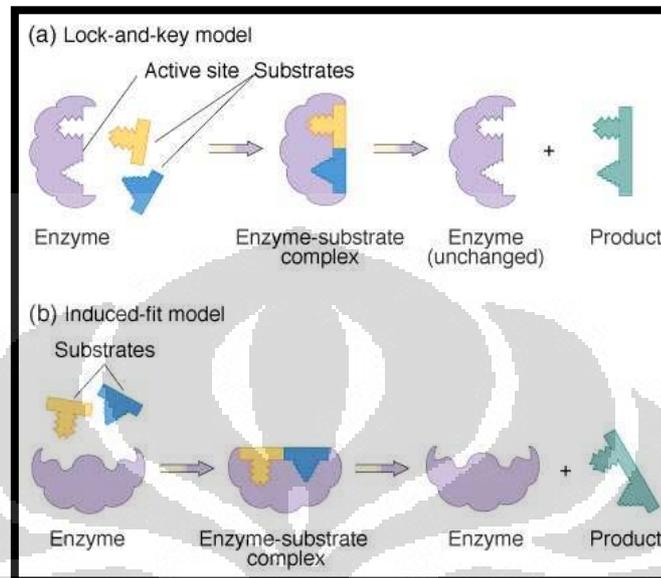
- Spesifik absolut: hanya akan mengkatalisis satu jenis reaksi saja
- Spesifik terhadap gugus fungsi: enzim hanya akan mengkatalisis/bereaksi terhadap molekul dengan gugus fungsi tertentu
- Spesifik terhadap ikatan-ikatan kimia tertentu tanpa menghiraukan struktur molekulnya.
- Spesifik terhadap stereokimia tertentu

Pada tahun 1958, seorang ilmuwan berkebangsaan Jerman bernama Emil Fisher menyatakan bahwa spesifisitas enzim berkaitan dengan struktur komplementer dari enzim dan substratnya. Substrat akan terikat pada bagian komplementer dari enzim seperti kunci dan gembok. Teori ini dikenal dengan hipotesis *lock and key*. Substrat berperan sebagai kunci yang masuk ke dalam sisi aktif enzim yang berperan sebagai gemboknya, sehingga terbentuklah kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepaskan dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Berdasarkan teori ini, dapat dikatakan bahwa sisi aktif enzim cenderung bersifat kaku dan hanya dapat berikatan dengan substrat yang sesuai.

Hipotesis *lock and key* hanya dapat menerangkan spesifisitas enzim tetapi tidak memperhatikan fleksibilitas molekul protein dari enzimnya. Data sinar-x dan spektroskopi lainnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konformasi antara enzim bebas dengan enzim yang mengikat substrat. Perubahan ini terjadi pada struktur tiga dimensi, tetapi tidak pada struktur primernya.

Pada tahun 1958, Kohsland menyempurnakan model yang dibuat oleh Fisher, dengan hipotesisnya yaitu hipotesis *induced fit*. Hipotesis ini menjelaskan bahwa struktur dari substrat merupakan komplemen dari sisi aktif suatu kompleks enzim-substrat, tetapi bukan pada enzim bebas. Perubahan konformasi akan terjadi pada enzim selama mengikat substrat sehingga terbentuk struktur yang

sesuai. Hipotesis ini membutuhkan sisi aktif enzim yang bersifat fleksibel sedang substratnya dianggap *rigid*. Berikut adalah gambaran dari kedua hipotesis di atas (Gambar 2.8):



[Sumber: <http://lc.brooklyn.cuny.edu/smardtutor/corc1321/energy.html>]

Gambar 2.8. Hipotesis kerja enzim

2.4.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Dalam melakukan aktivitasnya sebagai katalis, enzim harus berada pada kondisi yang sesuai yang dibutuhkannya, sehingga kerja enzim menjadi optimal. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas katalisis enzim, di antaranya (Nelson & Cox, 2004):

1. Suhu

Seperti kebanyakan reaksi kimia, reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan meningkat seiring dengan meningkatnya suhu, karena kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul. Namun jika dikaitkan dengan struktur enzim yang berupa protein, ada batas suhu yang memungkinkan struktur enzim tetap terjaga yaitu pada suhu optimumnya. Di atas suhu optimumnya, struktur enzim akan terganggu bahkan dapat rusak (terdenaturasi), sehingga enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya. Enzim yang berbeda memiliki suhu optimum yang berbeda pula.

2. Pelarut

Pelarut memainkan peranan penting terhadap aktivitas enzim. Pelarut enzim, terutama air, berperan secara langsung maupun tidak langsung terhadap seluruh interaksi non kovalen seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatik yang mempertahankan konformasi katalitik suatu enzim (Klibanov, 1986). Pelarut enzim dikelompokkan berdasarkan tingkat kepolarannya. Parameter hidrofobisitas pelarut biasa ditentukan dengan nilai log P. Fungsi log P adalah untuk mengetahui kecenderungan proporsional antara aktivitas katalitik yang tinggi dengan hidrofobisitas yang tinggi pula (Laane, *et al.*, 1987). Hubungan nilai log P dengan aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Hubungan antara nilai log P dengan aktivitas enzim

Aktivitas	Nilai log P	Contoh pelarut
Tinggi	> 4	dekanol, heksadekana, heptana, oktana
Sedang	$2 < \log P < 4$	heptanol, toluena, oktanol, heksana
Rendah	< 2	Alkohol rantai pendek serta pelarut organik larut air (etanol, metanol, aseton)

[Sumber: Laane, *et al.*, 1987]

Walaupun pelarut dengan nilai log P > 4 dapat membuat enzim bekerja secara optimal, namun dalam pemilihan pelarut perlu diperhatikan juga karakteristik keseluruhan dari reaksi terutama mengenai polaritas substrat dan produk yang terbentuk dan kemungkinan interaksinya dengan pelarut yang digunakan (Yang, *et al.*, 1994).

3. pH (Tingkat Keasaman)

Kerja suatu enzim juga dipengaruhi oleh pH. Nilai pH optimum suatu enzim ialah pH pada saat aktivitas enzim tersebut paling optimal. Di atas maupun di bawah pH optimumnya, aktivitas enzim akan lebih rendah. Kondisi pH yang ekstrim, terlalu asam atau terlalu basa biasanya akan menyebabkan kebanyakan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Setiap enzim memiliki pH optimum yang berbeda-beda.

4. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator adalah suatu zat yang memiliki kemampuan untuk mengaktifkan dan meningkatkan kerja enzim, sedangkan inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim.

5. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi enzimatik juga akan meningkat.

6. Konsentrasi Substrat

Jika konsentrasi enzim dibuat tetap dan konsentrasi substrat secara perlahan ditingkatkan, maka kecepatan reaksi akan meningkat sampai tercapainya titik maksimum. Setelah titik ini tercapai, peningkatan konsentrasi substrat tidak akan lagi meningkatkan kecepatan reaksi. Hal ini disebabkan semua sisi aktif enzim sudah berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat (ES) sehingga penambahan substrat tidak akan mempengaruhi kecepatan reaksi.

2.4.5 Klasifikasi dan Penamaan Enzim

Nama sistematis dari enzim didasarkan pada sistem klasifikasi menurut *Enzyme Commission* dari *International Union of Biochemistry*. Pada penamaan sistematis, setiap enzim dilengkapi dengan angka EC sebanyak empat digit yang dipisahkan dengan titik. Keterangan dari digit-digit tersebut adalah sebagai berikut: digit ke-1 menunjukkan kelas enzim; digit ke-2 dan ke-3 merupakan subkelas yang menerangkan lebih rinci dari kelas enzim; digit ke-4 merupakan nomor *entry* yang diberikan oleh *Enzyme Commission*. Berikut ini ilustrasi lengkap mengenai nomenklatur enzim (Gambar 2.9).

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Amino transferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A-B ⇌ A + B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>X = A, G, U, C</p> <p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP + P_i</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

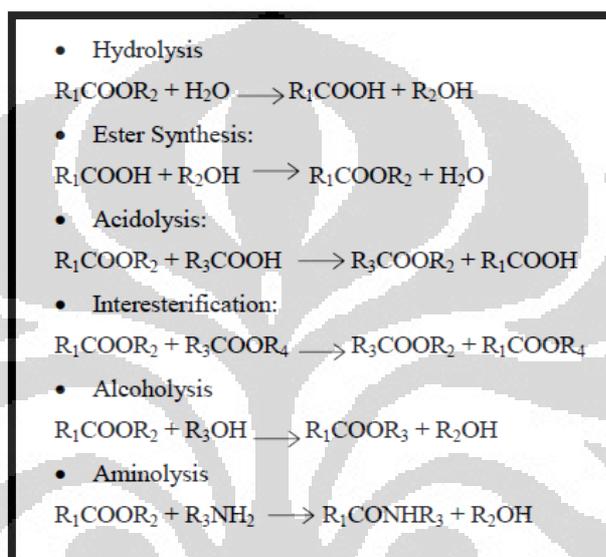
[Sumber: Koolman & Roehm, 2005]

Gambar 2.9. Nomenklatur enzim

2.5 Lipase

Lipase termasuk salah satu kelompok hidrolase, dengan subkelas esterase dan nama sistematik triasilgliserol asil hidrolase (EC 3.1.1.3). Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya – triasilgliserol – ialah senyawa nonpolar, sehingga lipase bekerja pada bagian antar muka (*interface*) fasa air dan fasa minyak. Secara umum, struktur lipase merupakan lipatan rantai polipeptida yang menghalangi sisi katalitik, dengan terowongan hidrofobik yang dapat mengakomodasi rantai asam lemak, sehingga memungkinkan pergerakan substrat untuk dapat berinteraksi dengan sisi katalitik. Sisi katalitik lipase biasanya dicirikan oleh tiga residu asam amino serin, histidin, dan aspartat/ glutamat (Akoh & Min, 1998).

Lipase mampu mengkatalisis berbagai reaksi di antaranya reaksi hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi (asidolisis, interesterifikasi, serta alkoholisis), dan aminolisis (Öztürk, 2001). Dalam medium air (*aqueous medium*), lipase akan bertindak sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis. Namun dalam medium pelarut organik, lipase cenderung bekerja dalam reaksi esterifikasi dan transesterifikasi daripada reaksi hidrolisis (Adamopoulos, 2006). Berbagai reaksi yang dikatalisis oleh lipase dapat dilihat pada Gambar 2.10 berikut.



[Sumber: Öztürk, 2001]

Gambar 2.10. Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh lipase

2.5.1 Sumber Lipase

Enzim lipase dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Lipase hewan di antaranya ialah lipase pankreas, dapat diekstrak dari pankreas babi maupun pankreas manusia. Enzim ini memotong trigliserida, minyak, lemak, dan ester asam lemak sederhana. Jenis lipase lainnya biasanya berasal dari kambing, domba, dan sapi (Öztürk, 2001).

Sumber kedua dari lipase adalah tumbuhan. Ekstrak lipase kasar dapat diisolasi dari tumbuhan *Brassica napus*, *Sinapis alba*, *Ricinus communis*, dan *Lupinus albus* dengan aseton atau larutan buffer. Masing-masing enzim dari tumbuhan tersebut menunjukkan kespesifikan untuk posisi 1,3 dari triasilgliserol dengan aktivitas maksimum di antara pH 8 dan 9 (Antonian, 1988).

Sumber lain dari lipase ialah mikroorganisme, biasanya diproduksi melalui fermentasi dari bakteri maupun fungi yang berbeda. Bakteri seperti *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Achromobacter* sp., dan *Alcaligenes* sp., biasa digunakan untuk memproduksi lipase (Öztürk, 2001). Berbagai mikroorganisme yang dapat menghasilkan lipase dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Sumber lipase dari mikroorganisme

Bakteri	Kapang	Khamir
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida curvata</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Geotrichum cyclopium</i>	<i>Candida deformans</i>
<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Penicillium camemberti</i>	<i>Candida quillermondi</i>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	<i>Penicillium crysogenum</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	<i>mucilaginosa</i>
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	<i>cerevisiae</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Williopsis californica</i>

[Sumber: Helen Treichel, *et al.*, 2009]

2.5.2 Aplikasi Lipase

Lipase merupakan salah satu enzim yang mudah diperoleh karena terdapat dimana-mana, baik hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme (Öztürk, 2001). Kemampuan lipase yang dapat mengkatalisis berbagai substrat dengan selektifitas yang tinggi menyebabkan reaksi yang dikatalisisnya memiliki produk sampingan yang sedikit sehingga biaya pengolahan limbah lebih kecil. Lipase juga merupakan enzim yang memiliki kestabilan yang tinggi terhadap suhu dan berbagai pelarut organik, sehingga ketertarikan akan penelitian mengenai lipase terus berkembang. Berikut ini merupakan beberapa aplikasi lipase di bidang industri (Tabel 2.4).

Tabel 2.4. Aplikasi lipase di berbagai bidang

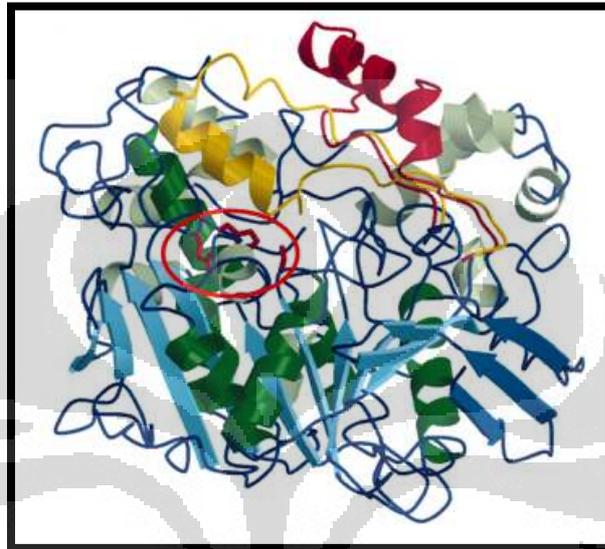
Bidang Industri	Kegunaan	Produk
A. Pangan		
1. Industri produk susu	Hidrolisis lemak susu - <i>Flavor enhancement</i> dalam produksi keju - Mempercepat kematangan keju	Berbagai tipe keju
2. Industri Kue	Meningkatkan <i>flavor</i> , mencegah <i>stalling</i>	Produk kue
3. Industri minuman beralkohol	Meningkatkan aroma dan mempercepat fermentasi	Produk alkohol, seperti <i>wine</i> dan sake
4. Industri gelatin	Hidrolisis lemak dalam proses <i>defatting</i> tulang	Gelatin
B. Non Pangan		
1. Industri oleokimia	Hidrolisis minyak/lemak Gliserolisis Alkoholisis	Asam lemak bebas, diasilgliserol, monoasilgliserol, dan gliserol
2. Industri detergen	Menghilangkan spot minyak/lemak	Detergen
3. Industri kosmetik	Mengubah lemak	Kosmetik secara umum
4. Industri kulit	Menghilangkan lemak dari kulit	Produk-produk kulit
5. Penggunaan terpadu	Dekomposisi dan pengubahan substansi minyak	Pembersih untuk pipa, penanganan limbah

[Sumber: Kotting & Eibl, 1994]

2.6 Lipase *Candida rugosa*

Pada penelitian ini digunakan lipase yang berasal dari mikroorganisme *Candida rugosa*. Lipase *Candida rugosa* memiliki berat molekul 56 kDa (Fadiloğlu & Söylemez, 1997), pH isoelektrik pada 4,5, dan aktivitas optimum di

antara pH 6,5 dan 7,5 (Petersen, *et al.*, 2001). Struktur dari lipase *Candida rugosa* dapat dilihat pada Gambar 2.11. Lipase yang diisolasi dari *Candida rugosa* termasuk kelompok lipase yang menghidrolisis triasilgliserol secara acak terhadap posisi asam lemak pada triasilgliserol menjadi asam lemak (Kurashige, *et al.*, 1989).



Keterangan: Heliks merah adalah saat enzim dalam konformasi terbuka dan heliks kuning saat konformasi tertutup, sisi aktif adalah yang dilingkari
[Sumber: Cygler & Schrag, 1999]

Gambar 2.11. Struktur tiga dimensi enzim lipase *Candida rugosa* (telah diolah kembali)

2.7 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai pengurangan atau lokalisasi enzim secara fisik dalam suatu ruang pada matriks dengan tetap mempertahankan aktivitas katalitiknya. Imobilisasi enzim merupakan suatu cara untuk menghemat biaya dalam penggunaan enzim, karena enzim yang terimobilisasi dapat digunakan berulang kali dan secara kontinyu (Katchalski-Katzir, *et al.*, 2000). Umumnya imobilisasi enzim dilakukan dengan membuat persilangan yang kuat di antara asam amino penyusun enzim sehingga tercapai struktur yang stabil. Hal ini

menyebabkan sistem imobilisasi menjadi tidak larut dalam air, sehingga mudah dipisahkan dari larutan pereaksi.

Selain dapat digunakan berulang kali dan secara kontinyu, imobilisasi enzim memiliki beberapa keuntungan lainnya, yaitu:

- pemisahan produk dengan enzimnya mudah,
- enzim memiliki stabilitas termal dan pH yang baik,
- menghasilkan produk dengan kemurnian yang tinggi,
- dalam beberapa kasus, imobilisasi memberikan aktivitas dan stabilitas enzim yang lebih baik.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi proses preparasi imobilisasi enzim, di antaranya ialah pemilihan matriks dan pemilihan metode imobilisasinya (Öztürk, 2001).

2.7.1 Material Matriks Imobilisasi

Jenis matriks untuk imobilisasi enzim sangat beragam. Pemilihan matriks yang optimal adalah parameter terbesar yang mempengaruhi kerja imobilisasi. Berikut ini adalah karakteristik yang harus dimiliki oleh matriks imobilisasi enzim (Öztürk, 2001):

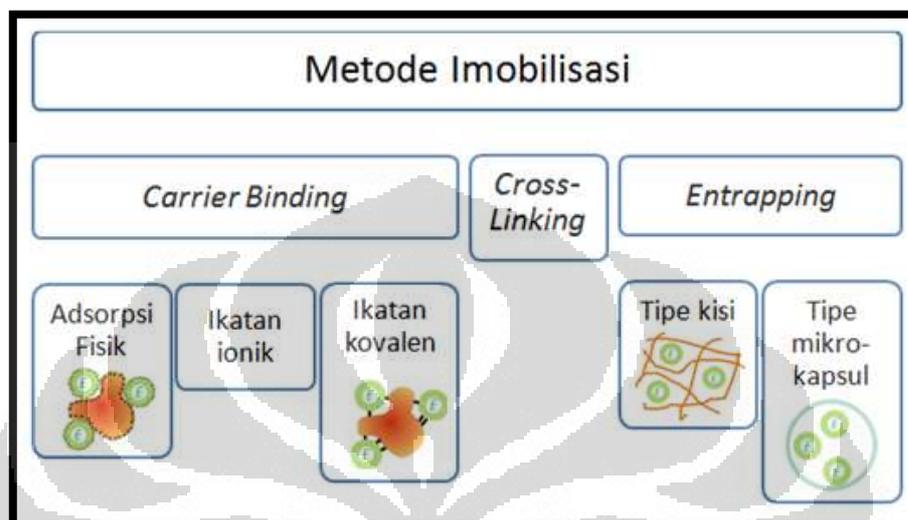
- luas permukaan yang besar,
- permeabilitas baik,
- tidak larut dalam air,
- stabil secara kimiawi, termal, dan mekanik,
- memiliki kekakuan yang tinggi (*rigid*),
- memiliki bentuk dan ukuran partikel yang sesuai,
- dapat diregenerasi.

Kondisi percobaan, sifat fisik produk dan reaktan, serta desain prosesnya membuat imobilisasi enzim harus dilakukan dengan matriks yang sesuai.

2.7.2 Teknik Imobilisasi

Pemilihan metode imobilisasi didasarkan pada spesifikasi katalis yang diinginkan yaitu aktivitas enzim, efektifitas penggunaannya, karakteristik deaktivasi dan regenerasi, biaya proses imobilisasi, toksisitas reagen imobilisasi, dan karakteristik akhir dari enzim terimobilisasi yang diinginkan. Metode kimiawi

melibatkan pembentukan ikatan kovalen di antara enzim dan matriks, sementara metode secara fisik melibatkan interaksi yang lemah antara enzim dengan matriks atau pengurungan secara mekanik enzim dalam matriks. Metode immobilisasi secara umum dibagi menjadi tiga, seperti yang tertera pada Gambar 2.12 berikut.

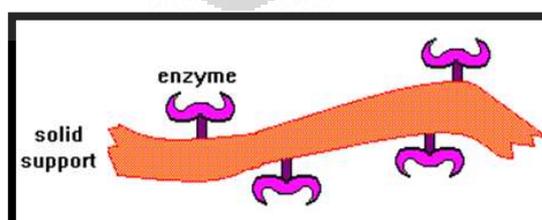


[Sumber: Öztürk, 2001]

Gambar 2.12. Penggolongan metode immobilisasi beserta beberapa ilustrasinya (telah diolah kembali)

2.7.2.1 *Carrier Binding*

Metode ini merupakan metode tertua dalam immobilisasi enzim. Dalam metode ini, enzim berikatan dengan matriksnya yang tidak larut air. Jumlah enzim yang terikat pada matriks dan aktivitasnya setelah immobilisasi bergantung pada keadaan awal dari matriksnya. Gambar 2.13 berikut mengilustrasikan teknik immobilisasi secara *carrier binding*.



[Sumber: Öztürk, 2001]

Gambar 2.13. Ilustrasi dari metode *carrier binding* (telah diolah kembali)

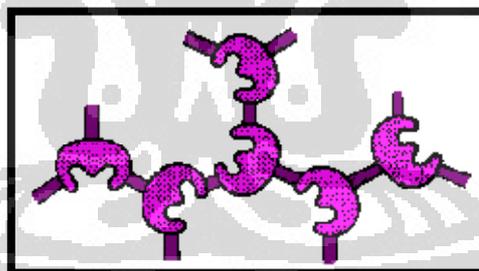
Pemilihan matriks didasarkan pada bentuk asal dari enzim itu sendiri, yaitu:

- ukuran partikel,
- luas area,
- rasio molar antara gugus hidrofobik dengan hidrofilik,
- komposisi kimiawi.

Matriks yang umumnya digunakan untuk metode adsorpsi fisik ialah turunan polisakarida seperti selulosa, dekstran, agarosa, dan gel poliakrilamid.

2.7.2.2 *Cross-Linking*

Metode ini merupakan ikat silang intermolekular antar enzim dan dalam metode ini tidak digunakan matriks yang tak larut air. Imobilisasi dilakukan dengan pembentukan sambung silang intermolekular antar molekul enzim oleh reagen *cross-linker* seperti glutaraldehid atau formaldehid. Kondisi percobaan untuk metode ini cukup ekstrim. Kondisi yang ekstrim ini dapat menyebabkan perubahan konformasi sisi aktif enzim sehingga dapat berakibat pada hilangnya aktivitas enzim (Öztürk, 2001). Berikut ini merupakan ilustrasi enzim yang saling berikatan silang (Gambar 2.14).



[Sumber: Öztürk, 2001]

Gambar 2.14. Ilustrasi metode *cross-linking* antar enzim

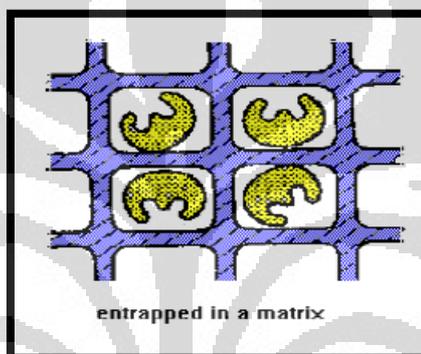
2.7.2.3 *Entrapping*

Metode *entrapment* biasanya ialah dengan menggabungkan enzim ke dalam kisi dari gel semipermeabel atau menjebak enzim dalam membran polimer semipermeabel. Penjebakannya didasarkan pada lokalisasi enzim dalam kisi matriks polimer atau membran namun tetap mempertahankan kemampuan enzim

untuk menerima substrat (Öztürk, 2001). Metode *entrapment* dikelompokkan lagi menjadi dua, yaitu tipe kisi dan mikrokapsul.

- **Tipe Kisi**

Tipe ini melibatkan penjebakan molekul enzim dalam material polimer ikat silang yang tidak larut air. Beberapa polimer sintetik biasa digunakan dalam metode ini, seperti poliakrilamid dan poli(vinil alkohol), sedangkan untuk polimer alami beberapa yang digunakan di antaranya adalah pati dan alginat. Berikut ini merupakan ilustrasi metode *entrapment* tipe kisi (Gambar 2.15).

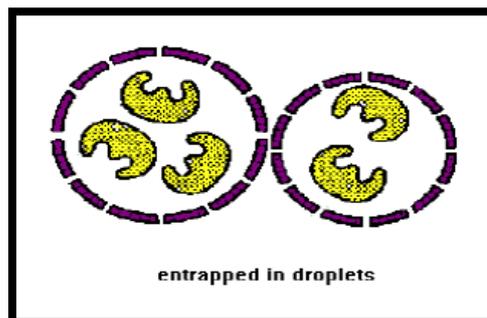


[Sumber: Öztürk, 2001]

Gambar 2.15. Ilustrasi metode *entrapment* tipe kisi

- **Tipe Mikrokapsul**

Tipe ini melibatkan penjebakan molekul enzim dengan cara memasukkannya ke dalam membran polimer semipermeabel. Mikroenkapsulasi membentuk sebuah sel buatan yang dibatasi oleh membran. Molekul besar seperti enzim tidak akan mampu berdifusi melewati membrannya namun molekul kecil seperti substrat dan produk mampu berdifusi melewati membrannya (Villeneuve, *et al.*, 2000). Ilustrasi metode *entrapment* tipe mikrokapsul dapat dilihat pada Gambar 2.16.



[Sumber: Öztürk, 2001]

Gambar 2.16. Ilustrasi metode *entrapment* tipe mikrokapsul

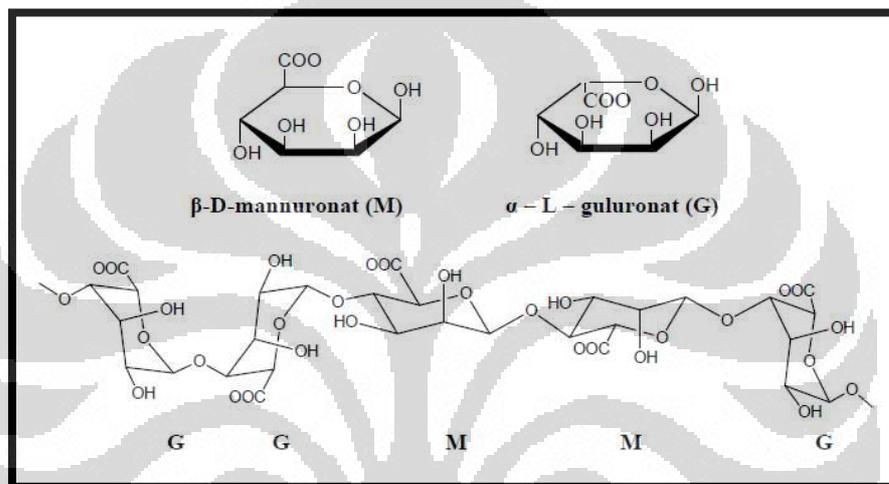
Preparasi untuk proses mikroenkapsulasi memerlukan kondisi yang terkontrol dengan sangat baik, dan prosedur untuk mikroenkapsulasinya meliputi pengeringan cair, pemisahan fasa, dan metode polimerisasi antar muka. Keuntungan metode ini ialah enzimnya tidak berinteraksi secara kimiawi dengan matriks polimer. Oleh karena itu biasanya jarang terjadi denaturasi. Namun proses difusi ke dalam membrannya cukup sulit. Laju difusi substrat dan produk melintasi membran sering kali menjadi parameter pembatas. Umumnya, konsentrasi substrat yang tinggi dibutuhkan untuk memudahkan proses tersebut. Pada akhirnya, penjebakan enzim dengan metode ini hanya cocok untuk substrat berukuran kecil karena molekul besar sulit melewati membrannya dan mencapai sisi katalitik enzim (Villeneuve, *et al.*, 2000; Öztürk, 2001).

2.8 Alginat

Alginat merupakan kelompok polisakarida yang termasuk polimer alami, yakni kopolimer dari β (1-4) D – Mannuronat dan α (1-4) L – Guluronat. Polimer ini tidak bersifat toksik, tidak memberi reaksi alergi, dan dapat terurai dalam tubuh.

Secara kimia, komposisi alginat terdiri atas dua jenis asam uronat, yaitu asam guluronat (G) dan mannuronat (M) (Gambar 2.17). Struktur asam guluronat berbeda dengan asam mannuronat. Residu asam guluronat mempunyai ikatan C 1 – 4 di-aksial sehingga struktur pita dari polimer ini melengkung, berlawanan

dengan bentuk merata dari asam manuronat. Terdapat tiga jenis pengelompokan monomer yaitu blok asam guluronat (GGGGG...), blok asam manuronat (MMMM...) dan residu manuronat dan guluronat yang berseling (MGMGMG...). Asam guluronat dan manuronat dalam rantai alginat dapat ditemukan berselang-seling tetapi umumnya membentuk struktur blok kopolimer dengan daerah yang hanya mengandung asam guluronat dan daerah lain yang mengandung asam manuronat. Rantai ujung biasanya tersusun oleh bidang manuronat atau guluronat murni dengan beberapa daerah yang bercampur.



Gambar 2.17. Struktur asam manuronat dan asam guluronat serta ikatan yang terbentuk antara keduanya

Alginat biasa terdapat pada ganggang cokelat atau rumput laut dan berperan sebagai komponen penguat pada dinding selnya. Kandungan alginat dan komposisi penyusun alginat dari masing-masing rumput laut sangat beragam dan dipengaruhi beberapa faktor seperti spesies daerah dan iklim asal rumput laut, umur, bagian tanaman, dan kondisi lingkungan di mana rumput laut tumbuh (Álvarez & Carmona, 2007). Perbandingan antara manuronat dan guluronat (rasio M/G) dalam alginat umumnya 1,5, dengan beberapa variasi tergantung jenis rumput laut sebagai sumbernya. Jumlah relatif dan keberadaan kedua monomer serta susunan sekuen dalam rantai polimer alginat berhubungan dengan sumber alginat baik secara genetik maupun lingkungan (Álvarez & Carmona, 2007).

Secara komersil, alginat banyak dipasarkan dalam bentuk garamnya, yaitu natrium alginat atau kalium alginat. Natrium alginat adalah bubuk berwarna krem,

larut dalam air dengan membentuk larutan koloid, kental, tidak larut dalam alkohol, kloroform, eter dan larutan asam jika pH dibawah 3.

Alginat tidak stabil terhadap panas, oksigen, dan ion logam. Dalam keadaan demikian, alginat akan mengalami degradasi. Selama penyimpanan alginat cepat mengalami degradasi dengan adanya oksigen terutama dengan naiknya kelembaban udara. Semua larutan alginat akan mengalami depolimerisasi dengan kenaikan suhu.

Alginat akan membentuk gel dengan ion-ion divalen pada konsentrasi tinggi. Struktur gel alginat disebabkan oleh pengikatan ion divalen oleh monomer guluronat membentuk suatu struktur *egg box*. Kekakuan struktur gel alginat akan bertambah secara umum seiring dengan afinitasnya terhadap ion berdasarkan urutan sebagai berikut, Mn>Co>Zn>Cd>Ni>Cu>Pb>Ca>Sr>Ba. Aplikasi pembentukan gel dalam larutan ion divalen ini membuat alginat banyak digunakan sebagai matriks imobilisasi. Namun, tidak semua ion-ion ini dapat digunakan untuk imobilisasi. Ion Ca^{2+} adalah ion yang paling umum digunakan untuk tujuan imobilisasi karena toksisitasnya paling rendah.

2.9 *Molecular Sieve*

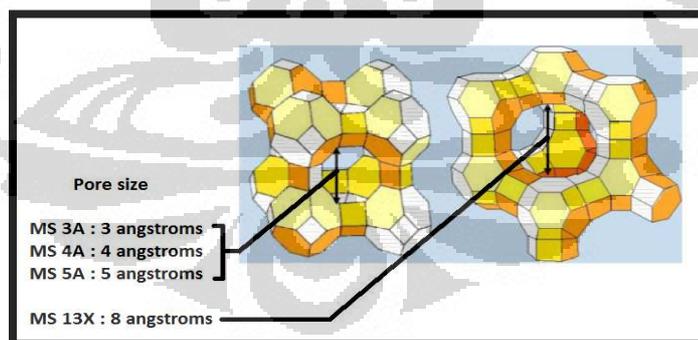
Molecular sieve merupakan material sintesis berbentuk bulat berasal dari golongan alumino-silika yang mengandung pori-pori yang sangat kecil dengan ukuran yang seragam. *Molecular sieve* digunakan sebagai absorben untuk gas dan cairan dengan kemampuan menyerap sampai 22% dari berat asalnya. *Molecular sieve* secara umum dapat dibagi atas dua tipe yakni tipe A (AlO_4) dan tipe X (SiO_4) kemudian berdasarkan kemampuan absorpsinya, *molecular sieve* dibagi menjadi 5 jenis seperti yang tertera pada Tabel 2.5 berikut.

Tabel 2.5. Molecular Sieve

Tipe <i>molecular sieve</i>	Ukuran pori	Aplikasi
3A	3Å	Untuk menyerap H ₂ O, baik untuk pengeringan pelarut polar
4A	4Å	Untuk menyerap H ₂ O, CO ₂ , SO ₂ , H ₂ S, baik untuk mengeringkan pelarut pelarut non-polar
5A	5Å	Untuk menyerap senyawa hidrokarbon rantai lurus
10X	8Å	Untuk menyerap senyawa hidrokarbon rantai cabang
13X	10Å	Untuk menyerap di-n-butil

[Sumber: Fieser, L.F. dan Fieser, M. 1967]

Pada proses absorpsi dengan *molecular sieve*, molekul yang cukup kecil akan masuk ke dalam pori-pori dan terserap sementara molekul yang besar akan lolos. Ukuran pori *molecular sieve* bersifat selektif terhadap materi yang akan diserap. Berikut ini ilustrasi ukuran pori berbagai tipe *molecular sieve* (Gambar 2.18).



Gambar 2.18. Selektivitas dari ukuran pori *molecular sieve*

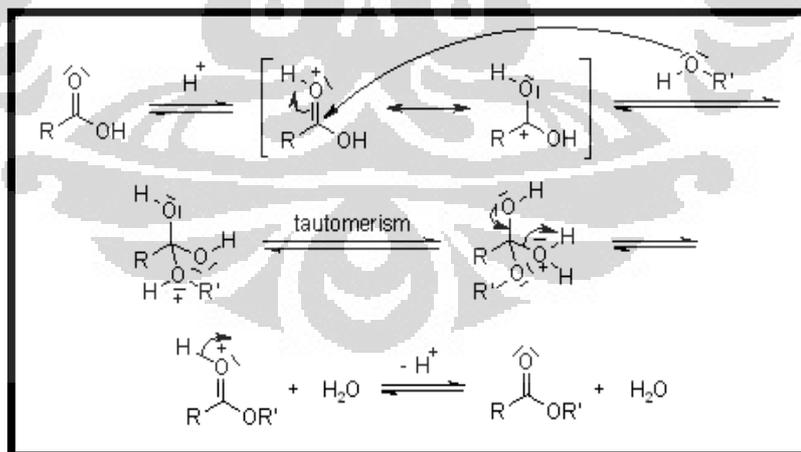
Molecular sieve dapat digunakan berulang kali. Metode untuk meregenerasi *molecular sieve* antara lain dengan menggunakan perubahan tekanan, pemanasan, dan pembersihan dengan *carrier gas*, atau pemanasan dibawah tekanan vakum. Suhu yang biasa digunakan untuk meregenerasi *molecular sieve* yang mengabsorpsi air ialah antara 130° – 250° C.

2.10 Reaksi Esterifikasi

Reaksi esterifikasi ialah reaksi antara suatu asam karboksilat dan suatu alkohol, menghasilkan suatu senyawa yang disebut ester. Reaksi esterifikasi kimiawi biasanya menggunakan katalis asam anorganik (HCl atau H₂SO₄) dan bersifat reversibel. 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.

Reaksi esterifikasi bersifat reversibel, sehingga agar kesetimbangan selalu bergeser ke arah pembentukan produk, dapat dilakukan penarikan molekul air yang terbentuk sebagai produk sampingan. Air dapat dipisahkan dengan cara menambahkan pelarut yang bersifat nonpolar seperti benzena dan kloroform, sehingga ester yang terbentuk akan segera tertarik pada pelarut yang digunakan. Selain hal tersebut, produk ester juga dapat ditingkatkan dengan penambahan konsentrasi salah satu reaktannya sehingga kesetimbangan bergeser ke arah pembentukan produk.

Mekanisme reaksi esterifikasi terdiri atas beberapa tahapan. Ilustrasi mekanisme esterifikasi dengan menggunakan katalis asam dapat dilihat pada Gambar 2.19.

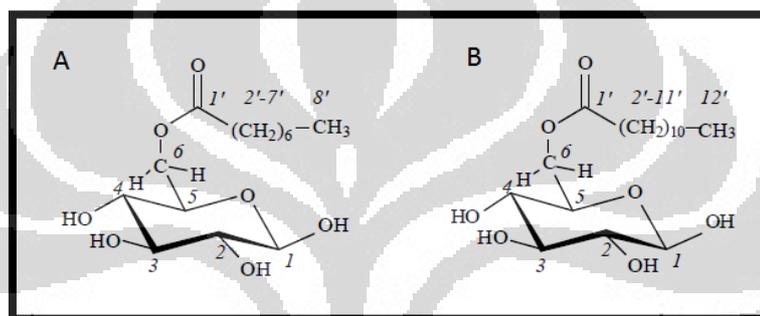


[Sumber: <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fischer-esterification.shtml>]

Gambar 2.19. Mekanisme reaksi esterifikasi menggunakan katalisis asam

2.11 Ester Glukosa

Salah satu contoh ester asam lemak karbohidrat adalah ester dari asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan karbohidrat sederhana yaitu glukosa. Ester asam lemak glukosa dengan derajat substitusi rendah merupakan surfaktan non ionik dan merupakan *emulsifier* yang baik, karena memiliki sifat amfilik, yaitu memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik dalam satu molekul. Ester asam lemak glukosa diketahui memiliki aplikasi yang luas secara komersial, meliputi industri farmasi, industri kosmetik dan industri makanan. Gambar 2.20 merupakan ilustrasi dari ester glukosa.



Keterangan: A. 6-O-octanoyl-β-D-glucose
B. 6-O-lauroyl-β-D-glucose

[Sumber: Youchun, 2001]

Gambar 2.20. Ester glukosa

2.12 Emulsifier

Emulsi merupakan salah satu jenis koloid, yaitu suatu sistem dispersi cairan dalam cairan. Ada dua macam sistem emulsi, yaitu emulsi air dalam minyak (w/o), dan emulsi minyak dalam air (o/w). Emulsi biasanya tidak stabil dan untuk menstabilkan sistem emulsi biasanya ditambahkan *emulsifier*.

Emulsifier adalah suatu senyawa yang memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu struktur molekul yang sama. Senyawa ini dapat menurunkan tegangan antar muka antara dua fasa cairan yang berbeda kepolarannya seperti minyak dengan air. Sifat yang unik tersebut menyebabkan

emulsifier sangat potensial digunakan sebagai komponen bahan adhesif, penggumpal, pembasah, pembusa, dan pengemulsi. Bahan ini telah diaplikasikan secara luas pada berbagai bidang industri proses yang menggunakan sistem multi fasa seperti pada industri makanan, farmasi, kosmetik, tekstil, polimer, cat, detergen, dan agrokimia.

Daya kerja *emulsifier* disebabkan oleh bentuk molekulnya yang dapat terikat baik pada minyak maupun pada air. Bila *emulsifier* tersebut lebih terikat pada air atau lebih larut dalam air maka dapat lebih membantu terjadinya dispersi minyak dalam air sehingga terjadilah emulsi minyak dalam air. Contoh dari emulsi minyak dalam air (o/w) adalah susu. Namun, bila *emulsifier* lebih larut dalam minyak terjadilah emulsi air dalam minyak (w/o), contohnya adalah mentega.

2.13 Analisis Ester Glukosa

Untuk analisis ester glukosa hasil sintesis dapat digunakan analisis dengan spektroskopi infra merah (IR) dan uji emulsi sederhana.

Spektroskopi infra merah adalah suatu metode analisis yang dipergunakan untuk mengidentifikasi suatu sampel senyawa berdasarkan vektor elektrik radiasi elektromagnetik dan perbedaan elektrik dipol molekul senyawa sampel tersebut. Analisis IR didasarkan pada serapan gelombang infra merah oleh molekul dalam vibrasi ulur maupun vibrasi tekuk. Metode spektroskopi infra merah mengidentifikasi suatu senyawa sampel dengan menganalisis gugus-gugus fungsi yang dimiliki oleh senyawa tersebut. Beberapa gugus fungsi yang lazim diidentifikasi oleh spektrofotometri infra merah dari suatu senyawa adalah gugus hidroksil, karbonil, karboksilat dan hidrokarbon. Dalam analisis IR, dapat diketahui apakah produk hasil reaksi memiliki gugus fungsi yang mencirikan senyawa yang diinginkan atau tidak.

Uji emulsi sederhana berfungsi untuk mengetahui kestabilan emulsi serta jenis emulsi yang didapat dari produk yang dihasilkan.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat-Alat yang Digunakan

Pada penelitian ini, alat-alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas seperti *beaker glass*, labu ukur, batang pengaduk, spatula, *bulb*, botol timbang, corong Buchner, corong pisah, gelas ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipet gondok, erlenmeyer, buret, labu bulat leher tiga, termometer, *syringe* dengan jarum ukuran 0,4 mm, piknometer, tabung reaksi, dan tabung *centrifuge*. Selain itu juga digunakan neraca analitis, pH meter, *hot plate stirrer*, oven, serta *horizontal incubator shaker*, sedangkan instrumentasi yang digunakan adalah FT-IR Shimadzu.

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 μmol asam oleat dari triolein sebagai substrat per menit pada suhu 40° C dan pH 8)

- Na-alginat

Na-alginat yang digunakan adalah garam natrium dari asam alginat yang diekstrak dari alga cokelat (Sigma-Aldrich).

- Minyak Kelapa

Minyak kelapa yang digunakan diperoleh dari salah satu supermarket yang ada di Kota Depok.

- **Bahan Kimia**

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Laboratorium Biokimia Departemen Kimia FMIPA UI. Bahan kimia yang digunakan adalah glukosa, KOH, etanol 95%, HCl, akuades, n-heksana, CaCl₂, Tris, *molecular sieve*, Na₂SO₄ anhidrat, KHP, NaOH, Na₂CO₃, CuSO₄, Na-K Tartrat, reagen Folin Ciocalteu, serta indikator fenoltalein.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Hidrolisis Trigliserida pada Minyak Kelapa

Hidrolisis trigliserida dilakukan untuk memperoleh asam lemak yang terdapat pada minyak kelapa. Sebanyak 20 g minyak kelapa dimasukkan 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 dan 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 Na₂SO₄ anhidrat lalu dilakukan dekantasi untuk memisahkan padatan Na₂SO₄. Selanjutnya pelarut n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotatory evaporator* sampai filtrat yang dihasilkan pekat. Filtrat yang diperoleh merupakan asam lemak hidrolisat yang akan digunakan pada percobaan selanjutnya.

3.2.2 Pendahuluan Esterifikasi Asam Lemak-Glukosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa*

Reaksi esterifikasi dilakukan dengan cara mencampurkan glukosa (G) dan asam lemak (A) yang terlarut dalam n-heksana dengan komposisi:

A:G = 1,5:1 (v/v) setara dengan perbandingan mol A/G 60:1
 enzim = 5% berat substrat (w/w substrat)
 pelarut = 1:1 (v/v substrat)

Ke dalam campuran kemudian ditambahkan enzim lipase *Candida rugosa* yang telah dilarutkan dalam 1,50 mL buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,2 . Selanjutnya campuran diinkubasi dalam *horizontal incubator shaker* dengan suhu 30° C selama 14 jam. Reaksi selanjutnya dihentikan dengan pemanasan pada suhu 60° C untuk menginaktifkan enzim lipase, kemudian dilakukan sentrifugasi. Fasa tengah pada tabung *centrifuge* yang merupakan ester glukosa kemudian diambil dan diuji secara kualitatif dengan uji emulsi (Barkah, 2011).

3.2.2.1 Uji Produk Ester Glukosa Hasil Sintesis Sebagai *Emulsifier*

Uji ini dilakukan dengan mencampurkan sekitar 1 mL air dengan 10 tetes minyak, lalu dilakukan penambahan ester glukosa hasil sintesis sambil terus dikocok dan dilihat perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk emulsi, dilakukan pengamatan terhadap kestabilan emulsi selama 24 jam.

3.2.2.2 Penentuan Jenis Emulsi dengan Mikroskop

Uji ini dilakukan dengan meneteskan satu tetes emulsi pada kaca preparat, lalu dilakukan penambahan eosin sebagai zat pewarna. Pengujian dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop untuk mengetahui apakah emulsi yang terbentuk merupakan emulsi minyak dalam air (o/w) atau air dalam minyak (w/o).

3.2.3 Optimasi Imobilisasi Lipase pada Matriks Ca-alginat

Metode imobilisasi yang dipakai adalah secara *direct entrapment* (Won, et al., 2005). Sebanyak 2 mL larutan lipase dicampurkan dengan 8 mL larutan Na-alginat untuk menghasilkan rasio enzim/alginat (w/w) sebesar 0,125. Setelah itu dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* agar campuran merata. Kemudian larutan tersebut diteteskan dengan menggunakan *syringe* ke dalam 10 mL larutan CaCl₂ 50mM. *Bead* Ca-alginat yang terbentuk didiamkan selama 20 menit lalu dipisahkan dari larutan dengan penyaringan secara vakum. *Bead* tersebut dicuci pada penyaring sebanyak dua kali dengan 50 mM larutan buffer Tris – HCl pH

7,2. CaCl₂ dan filtrat hasil pencucian dikumpulkan untuk memperoleh nilai % *loading* atau persentase enzim yang terperangkap. Nilai ini dipakai untuk menentukan jumlah mg protein dalam *bead* Ca-alginat. Nilai % *loading* ditentukan dengan persamaan berikut

$$\% \text{ Loading (\%)} = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100 \quad (3.1)$$

dengan C_i merupakan konsentrasi protein awal dan C_f merupakan konsentrasi protein dalam filtrat total (ditentukan dengan metode Lowry), sedangkan V_i merupakan volume awal protein dan V_f merupakan volume filtrat total.

Optimasi kondisi percobaan dilakukan dengan membuat variasi terhadap konsentrasi Na-alginat yaitu 1%, 1,5%, dan 2%. Kondisi optimum ditentukan oleh efisiensi imobilisasi terbesar dari enzim imobil pada saat mengkatalisis reaksi hidrolisis minyak kelapa. Nilai efisiensi imobilisasi diperoleh dengan menggunakan persamaan berikut

$$\text{efisiensi imobilisasi (\%)} = \frac{a_{\text{immo}}}{a_{\text{free}}} \times 100 \quad (3.2)$$

dengan a_{free} adalah aktivitas spesifik dari lipase bebas, dan a_{immo} adalah aktivitas spesifik dari lipase imobil. Aktivitas spesifik lipase imobil didefinisikan sebagai aktivitas lipase per mg protein. Aktivitas dari lipase bebas maupun lipase imobil ditentukan melalui metode titrimetri. Banyaknya mg protein dalam lipase imobil ditentukan dari nilai % *loading*.

3.2.3.1 Penentuan Konsentrasi Protein Lipase Imobil Melalui Metode Lowry

Pereaksi Lowry dibuat dengan komposisi berikut (Lowry, *et al.*, 1951).

Larutan A = 2 g Na₂CO₃ dalam 100 mL NaOH 0,1 N

Larutan B₁ = 0,250 g CuSO₄ dalam 25 mL akuades

Larutan B₂ = 0,675 g K.Na Tartrat dalam 25 mL akuades

Pereaksi Lowry = 1 mL larutan B₁ + 1 mL larutan B₂ + 98 mL larutan A

Dilakukan penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry terhadap sampel, dengan komposisi sesuai pada tabel L.3.1 (lampiran). Sampel terdiri atas kontrol Tris-HCl buffer, kontrol CaCl₂, kontrol alginat 1%, kontrol alginat 1,5%, kontrol alginat 2%, larutan alginat dan enzim masing-masing pada konsentrasi alginat 1%, 1,5%, dan 2%, serta filtrat hasil penyaringan dan pencucian enzim imobil dari larutan alginat konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2%. Pembacaan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 700 nm. Konsentrasi protein pada tiap sampel dihitung dari alur kurva absorbansi terhadap konsentrasi standar protein. Standar protein yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bovin Serum Albumin* (BSA).

3.2.3.2 Penentuan Aktivitas Hidrolisis Lipase Melalui Metode Titrimetri

Sebanyak 1,50 mL larutan enzim (10mg/mL) ditambahkan ke dalam campuran emulsi yang terdiri atas 0,43 mL minyak kelapa, 7,65 mL buffer Tris – HCl pH 7,2, dan 0,5 g *gum* Arab. Campuran kemudian diinkubasi pada *horizontal incubator shaker* dengan suhu 30° C dan kecepatan 100 rpm selama 1 jam. Setelah selesai, reaksi ditambahkan campuran aseton : alkohol 1:1 (v/v) untuk terminasi reaksi. Campuran kemudian dititrasi dengan NaOH dengan indikator fenolftalein, untuk ditentukan aktivitas katalitik enzimnya (Sugiharni, 2010). Aktivitas enzim didapat dengan persamaan berikut.

$$\text{aktivitas lipolitik lipase} = \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{w \times t} \quad (3.3)$$

- A = mL NaOH untuk titrasi sampel
 B = mL NaOH untuk titrasi blanko
 N NaOH = normalitas NaOH untuk titrasi
 w = berat minyak kelapa yang digunakan
 1000 = konversi dari mmol ke μmol
 t = waktu inkubasi dalam menit

Aktivitas lipolitik satu unit (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1 μmol produk per menit dibawah kondisi percobaan. Penentuan aktivitas ini diterapkan pada lipase bebas maupun lipase imobil.

3.2.4 Optimasi Esterifikasi Asam Lemak - Glukosa Menggunakan Lipase Imobil

Reaksi esterifikasi dilakukan dalam wadah berukuran 100 mL. 0,1 mmol glukosa direaksikan dengan asam lemak hidrolisat minyak kelapa (1 – 9 mmol), dengan n-heksana sebagai pelarut non polar sebanyak 1:1 v/v substrat. Kemudian ditambahkan 1 g *bead* lipase – Ca-alginat dan *molecular sieve* (0 – 0,7 g) yang sudah diaktivasi dengan pemanasan suhu 400° C selama 3 jam. Campuran kemudian dikocok dengan *horizontal incubator shaker* pada kecepatan 200 rpm pada suhu dan waktu yang diinginkan (Yu, *et al.*, 2008; Barkah, 2011). Selanjutnya penghentian reaksi dilakukan dengan pemanasan untuk mendenaturasi enzim yang bocor dari matriks.

Reaksi dilakukan secara triplo dengan melakukan variasi pada suhu, perbandingan molar rasio antara glukosa dan asam lemak, waktu inkubasi, serta berat *molecular sieve* yang digunakan. Variasi waktu inkubasi yang dilakukan adalah 4, 8, 16, dan 32 jam. Variasi suhu reaksi yang digunakan adalah 30°, 35°, 40°, dan 45° C. Variasi perbandingan molar rasio antara glukosa dan asam lemak yang digunakan adalah 1:10, 1:30, 1:60, 1:90. Variasi berat *molecular sieve* yang digunakan adalah 0,0; 0,1; 0,4; dan 0,7 g.

3.2.5 Analisis Hasil Esterifikasi

Hasil reaksi esterifikasi dianalisis dengan metode titrasi guna penentuan persen konversi asam lemak dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Titrasi dilakukan dengan menggunakan larutan NaOH dengan fenolftalein sebagai indikator titik akhir titrasi. Persen konversi asam lemak ditentukan dengan persamaan berikut (Yu, *et al.*, 2008).

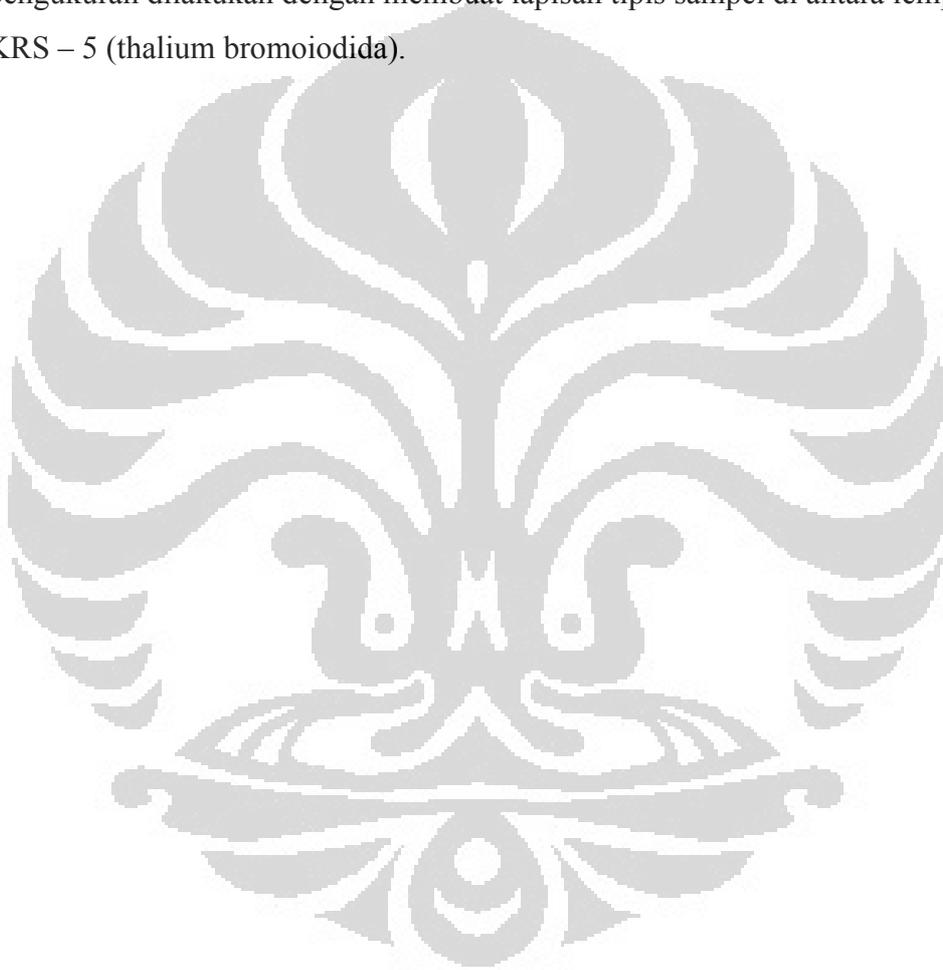
$$\% \text{ konversi} = \frac{(V_{\text{blanko}} - V_{\text{sampel}}) \times [\text{NaOH}]}{\text{mol asam lemak}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.6 Pemisahan dan Identifikasi Produk Hasil Esterifikasi

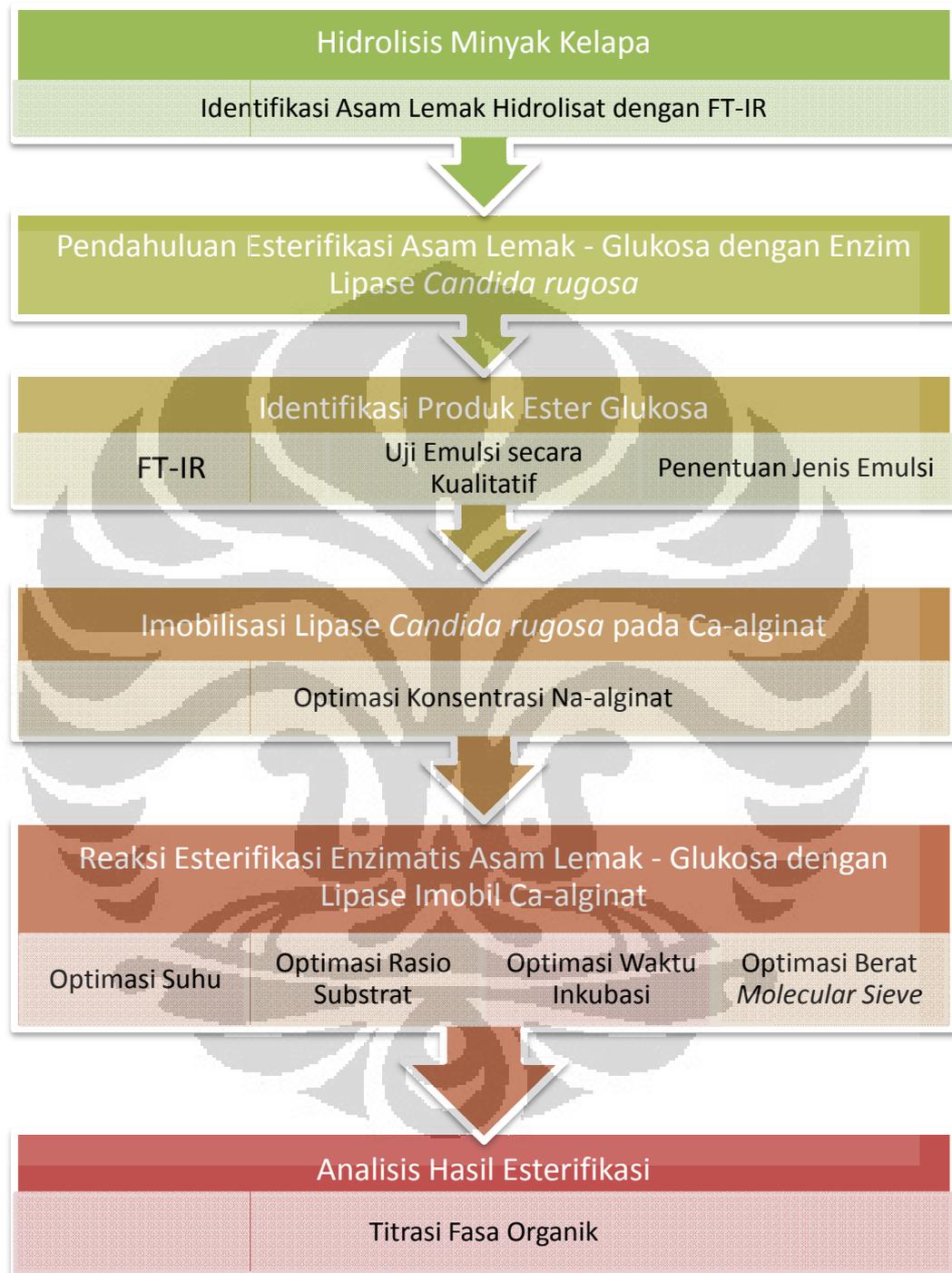
Pemisahan hasil esterifikasi dilakukan dengan cara sentrifugasi terhadap hasil reaksi. Proses ini dilakukan dengan kecepatan 3400 rpm selama 15 menit. Setelah dilakukan proses sentrifugasi, hasil reaksi terpisah menjadi beberapa fasa.

Identifikasi produk dilakukan terhadap fasa-fasa yang terpisah dengan menggunakan instrumentasi FT-IR.

Selain pada produk hasil reaksi, identifikasi dengan menggunakan FT-IR juga dilakukan terhadap glukosa dan asam lemak hidrolisat. Glukosa yang berwujud padat pada suhu ruang dibuat menjadi pelet dengan cara mencampurkannya dengan padatan KBr, lalu dilakukan pengukuran FT-IR. Untuk sampel yang berwujud cair seperti asam lemak dan produk hasil reaksi, pengukuran dilakukan dengan membuat lapisan tipis sampel di antara lempeng KRS – 5 (thallium bromoiodida).



3.3 Bagan Kerja Secara Umum



Gambar 3.1. Bagan kerja secara umum

BAB 4

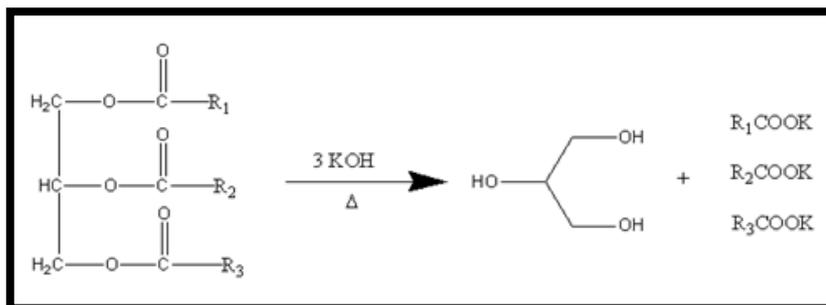
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hidrolisis Trigliserida

Komponen utama penyusun minyak atau lemak adalah trigliserida atau triasilgliserol. Trigliserida terdiri atas ester gliserol dan asam lemak. Hidrolisis trigliserida minyak kelapa dilakukan untuk mendapatkan asam lemak yang berasal dari minyak kelapa, yang selanjutnya akan digunakan sebagai substrat untuk reaksi esterifikasi.

Proses hidrolisis trigliserida dilakukan secara kimiawi dengan bantuan katalis. Prosesnya dapat menggunakan katalis asam maupun katalis basa. Pada penelitian ini dilakukan hidrolisis dengan bantuan katalis basa. Reaksi hidrolisis berkatalis basa lebih menguntungkan dibandingkan reaksi hidrolisis berkatalis asam. Hal ini karena pada reaksi hidrolisis berkatalis asam, dihasilkan reaksi yang bersifat reversibel, sedangkan pada reaksi hidrolisis berkatalis basa, reaksi yang dihasilkan bersifat ireversibel sehingga produk yang didapat lebih menguntungkan.

Reaksi hidrolisis menggunakan basa biasa disebut sebagai reaksi saponifikasi atau reaksi penyabunan, karena pada prosesnya akan dihasilkan sabun atau ester asam lemak. Reaksinya dapat dilakukan dengan menggunakan KOH maupun NaOH. Katalis basa yang digunakan pada penelitian kali ini adalah KOH, yang dilarutkan dalam alkohol 95%. Berikut ini adalah reaksi yang terjadi (Gambar 4.1).



[Sumber: Hasnisa, 2008]

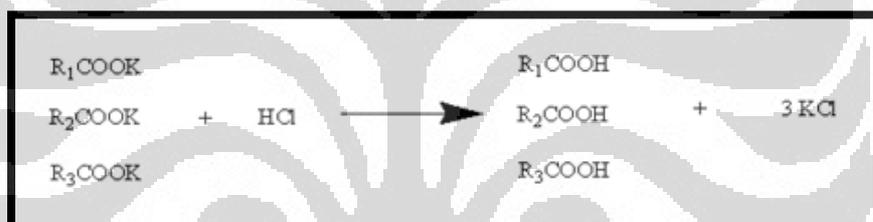
Gambar 4.1. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan katalis basa (telah diolah kembali)

Bila dibandingkan, penggunaan KOH sebagai katalis basa lebih baik daripada NaOH. Hal ini karena KOH memiliki kestabilan yang baik dan dapat membentuk sabun yang lebih lembut daripada NaOH (Hasnisa, 2008). Kalium dan natrium merupakan unsur-unsur yang berada pada satu golongan yaitu golongan alkali. Sebagai senyawa hidroksida, kebasaan unsur-unsur golongan alkali semakin bertambah dari atas ke bawah sehingga sifat basa KOH lebih kuat daripada NaOH. Selain itu, dibandingkan dengan natrium, reaktivitas dan sifat elektropositif kalium juga lebih besar, karena kalium memiliki jari-jari yang lebih besar. Dalam satu golongan, semakin ke bawah jari-jari atom semakin besar. Bila jari-jari atom besar, letak elektron valensi akan semakin jauh, sehingga semakin mudah untuk lepas dan membentuk ion positif. Hal ini juga dapat dilihat dari nilai energi ionisasi (EI) pertamanya. Apabila nilai EI kecil, artinya unsur tersebut mudah melepaskan elektron valensinya. Nilai EI untuk unsur kalium adalah 419 kJ/mol sedangkan nilai EI unsur natrium adalah 496 kJ/mol. Kalium memiliki kereaktifan yang lebih besar dibandingkan dengan natrium, sehingga kalium lebih mudah membentuk garam asam lemak. Selain itu, garam kalium-asam karboksilat umumnya lebih larut dalam air daripada garam natrium.

Pada reaksi hidrolisis, KOH dilarutkan dalam etanol 95%. Etanol memiliki kepolaran yang berada di antara trigliserida dan KOH, sehingga dapat difungsikan sebagai medium perantara yang menjembatani trigliserida yang bersifat non polar dengan KOH yang bersifat polar agar dapat terjadi kontak antara keduanya. Selain itu, basa alkali yang dilarutkan dalam etanol dapat memutus ikatan-ikatan

trigliserida dan membentuk asam lemak dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan jika dilarutkan dalam air (Hasnisa, 2008). KOH yang dilarutkan dalam air hanya akan membentuk ion K^+ dan OH^- yang akan berada pada fasa yang berbeda dengan minyak. Namun bila dilarutkan dalam etanol, KOH akan membentuk kalium etoksida yang dapat berfungsi sebagai katalis. Hasil dari reaksi hidrolisis ialah garam asam lemak serta gliserol, yang berada dalam satu fasa.

Penambahan air ke dalam campuran hasil reaksi berfungsi untuk memisahkan lipid yang tersabunkan dengan yang tidak tersabunkan. Pada hasil yang diamati, setelah penambahan air campuran tetap berupa satu fasa. Campuran hasil reaksi yang merupakan garam kalium-asam lemak kemudian dikonversi ke bentuk asamnya dengan penambahan asam klorida berlebih. Reaksi yang terjadi ialah sebagai berikut (Gambar 4.2).



[Sumber: Hasnisa, 2008]

Gambar 4.2. Konversi dari garam kalium-asam lemak menjadi asam lemak (telah diolah kembali)

Penambahan HCl menyebabkan campuran berubah menjadi dua fasa. Fasa organik yang non polar dan berada di atas merupakan asam lemak, sedangkan fasa air yang polar dan berada di bawah mengandung garam KCl dan etanol. Untuk memisahkan asam lemak dari fasa air selanjutnya dilakukan proses ekstraksi dengan pelarut n-heksana.

Untuk mengisolasi asam lemak murni dari pelarut n-heksana, dilakukan pemanasan dengan *rotatory evaporator*, sampai dihasilkan asam lemak yang pekat. Asam lemak hasil reaksi hidrolisis minyak kelapa berwarna bening dan berbentuk cair pada suhu kamar (Gambar 4.3). Hal ini disebabkan kandungan asam lemak dalam minyak kelapa sebagian besar merupakan asam lemak rantai

sedang (*middle chain fatty acid*), yaitu asam laurat dan asam miristat. Pada penelitian ini, berhasil didapatkan persentase hasil asam lemak sebesar 92,80%.



Gambar 4.3. Asam lemak hasil reaksi hidrolisis minyak kelapa

Berdasarkan analisis sebelumnya yang dilakukan oleh Balai Besar Industri Agro, kandungan asam lemak tertinggi dalam minyak kelapa yang digunakan adalah asam laurat yaitu sebesar 54,1%. Hasil analisis untuk mengetahui komposisi minyak kelapa yang dilakukan oleh Laboratorium Analisis dan Kalibrasi Balai Besar Industri Agro (BBIA) dapat dilihat pada Tabel L.1.2 (lampiran).

4.2 Sintesis Ester Glukosa Secara Enzimatis dengan Lipase *Candida rugosa*

Keseimbangan antara reaksi hidrolisis dan reaksi esterifikasi yang dikatalisis oleh lipase bergantung pada banyaknya air dalam campuran reaksi. Apabila dalam reaksi digunakan pelarut yang non polar atau memiliki kandungan air yang relatif lebih sedikit, maka lipase cenderung mengkatalisis reaksi esterifikasi (Adamopoulos, 2006). Sebagaimana kebanyakan reaksi enzimatis lainnya, reaksi esterifikasi enzimatis dengan lipase juga merupakan reaksi yang reversibel. Air yang merupakan produk samping reaksi ini dapat berperan sebagai inhibitor yang akan menghambat jalannya reaksi esterifikasi selanjutnya. Pada sistem reaksi dengan kandungan air yang tinggi, lipase cenderung akan bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis. Untuk mengatasi hal tersebut, perlu dilakukan minimalisasi air pada sistem reaksi.

Dalam reaksi esterifikasi enzimatis, perlu juga diperhatikan beberapa hal yang mempengaruhi jalannya reaksi. Faktor-faktor tersebut di antaranya adalah pelarut yang digunakan, perbandingan rasio substrat yaitu asam lemak dengan glukosa, suhu, serta pH buffer yang digunakan. Faktor pelarut, suhu, serta pH buffer yang digunakan berpengaruh terhadap aktivitas lipase mengkatalisis reaksi esterifikasi sedangkan perbandingan rasio substrat berpengaruh terhadap kesetimbangan reaksi esterifikasi.

Salah satu korelasi terbaik antara aktivitas lipase dalam reaksi esterifikasi adalah hidrofobisitas pelarut (Laane, *et al.*, 1987). Hidrofobisitas pelarut secara langsung berpengaruh terhadap air esensial pada enzim. Air esensial adalah jumlah air yang dibutuhkan oleh enzim untuk tetap dapat melakukan aktivitas katalitiknya. Air yang dibutuhkan untuk mempertahankan konformasi katalitik enzim ini hanya dibutuhkan dalam jumlah sedikit. Jika air esensial tetap melapisi molekul enzim maka pergantian sisa-sisa air lain dengan pelarut organik tidak akan mengganggu aktivitas katalitik enzim. Pelarut dengan hidrofobisitas yang tinggi cenderung membuat air berpartisipasi ke dalam molekul enzim sedangkan pelarut dengan hidrofobisitas yang rendah cenderung menarik sebagian air esensial pada enzim sehingga aktivitas katalitik menjadi terganggu (Klibanov, 1986; Zaks & Klibanov, 1988; Hariyadi, 1996). Pada penggunaan pelarut yang hidrofilik, perlu ditambahkan banyak air untuk menjenuhkan pelarut hidrofilik tersebut agar aktivitas enzim tidak terganggu.

Pada reaksi esterifikasi enzimatis kali ini digunakan glukosa dan asam lemak hidrolisat minyak kelapa sebagai substrat yang mana glukosa bersifat polar sedangkan asam lemak bersifat non polar. Penggunaan pelarut dengan nilai $\log P > 4$ dapat menimbulkan perbedaan kepolaran yang besar antara pelarut dengan substrat yang bersifat polar. Apabila digunakan pelarut dengan nilai $\log P > 4$, perbedaan kepolaran antara pelarut dengan glukosa akan semakin jauh sehingga kontak antara glukosa dengan asam lemak pun akan semakin kecil (Novianingsih, 2011). Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan pelarut dengan nilai $\log P$ di antara 2 sampai 4.

Berdasarkan beberapa penelitian mengenai reaksi esterifikasi enzimatis dengan lipase (Lozano, *et al.*, 2004; Ozyilmaz & Gezer, 2010; Syamsul, *et al.*,

2010), diketahui bahwa pelarut organik yang memberikan persentase konversi tertinggi adalah heksana. Heksana merupakan salah satu pelarut dengan nilai log P berada di rentang antara 2 sampai 4 (nilai log P = 3,5). Penelitian sebelumnya mengenai esterifikasi enzimatis antara sukrosa dengan asam lemak juga menggunakan heksana sebagai pelarut (Barkah, 2011; Novianingsih, 2011). Atas dasar hal tersebut, pada penelitian ini digunakan heksana sebagai pelarut non polar dengan perbandingan volume terhadap substrat 1:1 (v/v). Bila digunakan volume heksana yang terlalu banyak, dapat menyebabkan air esensial berkurang sehingga enzim akan mengalami dehidrasi dan menurun aktivitasnya.

Aktivitas katalitik lipase juga sangat dipengaruhi suhu lingkungannya. Adanya perubahan suhu yang ekstrim/tinggi dapat mengubah konformasi tiga dimensi suatu protein enzim sehingga enzim akan terdenaturasi. Pada penelitian ini, suhu inkubasi reaksi esterifikasi enzimatis dengan lipase *Candida rugosa* ialah 30° C. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang memperoleh suhu optimum pada suhu 30° C untuk reaksi esterifikasi enzimatis antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa menggunakan lipase *Candida rugosa* (Barkah, 2011). Dari percobaan reaksi esterifikasi tersebut, aktivitas katalitik lipase menurun pada suhu di atas 30° C, yang ditunjukkan dengan turunnya nilai persen konversi asam lemaknya.

Umumnya, seiring dengan meningkatnya konsentrasi enzim, laju reaksi pun semakin meningkat. Pada penelitian ini, enzim yang digunakan ialah sebesar 5% dari berat substrat (w/w). Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya mengenai esterifikasi sukrosa dengan asam lemak menggunakan lipase sebanyak 5% dari berat substrat dan didapatkan hasil yang cukup baik (Barkah, 2011; Novianingsih 2011). Enzim lipase tersebut dilarutkan sebelumnya dalam buffer Tris – HCl pH 7,2 karena pada pH tersebut lipase dapat bekerja secara optimal (Petersen, *et al.*, 2001; Won, *et al.*, 2005).

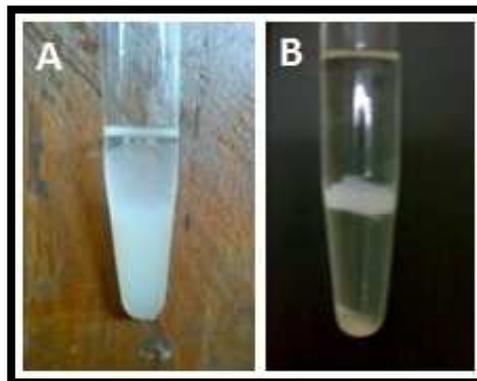
Faktor lain yang juga mempengaruhi reaksi esterifikasi enzimatis menggunakan lipase ialah rasio substrat, yaitu asam lemak dan glukosa. Pada penelitian ini, digunakan substrat yang berlebih agar kesetimbangan reaksi esterifikasi dapat bergeser ke arah pembentukan produk. Rasio mol antara asam lemak dan glukosa yaitu 1:60 (glukosa/asam lemak). Rasio substrat ini dipilih

untuk meminimalisir air dalam sistem reaksi, karena dengan rasio asam lemak yang lebih besar membuat sistem bersifat non polar (Novianingsih, 2011).

Setelah reaksi esterifikasi dihentikan dengan pemanasan pada suhu $\pm 70^{\circ}$ C, diperoleh hasil reaksi berupa emulsi yang membentuk suatu campuran berwarna putih, berbeda dengan campuran awal sebelum reaksi yang hanya membentuk dua fasa. Hal tersebut menandakan produk telah terbentuk, namun perlu dilakukan identifikasi selanjutnya. Untuk melakukan identifikasi produk, terlebih dahulu dilakukan pemisahan produk yang diperkirakan ester glukosa dari campuran reaksi.

Ester asam lemak karbohidrat yang disintesis secara enzimatik sulit menghasilkan produk dengan derajat substitusi yang tinggi (Youchun, 2001). Halangan sterik dari karbohidrat yang digunakan (glukosa) cukup tinggi. Hal ini dapat dilihat dari jumlah gugus $-OH$ primernya yang hanya satu buah, sehingga reaksi esterifikasi untuk menghasilkan produk dengan derajat substitusi yang tinggi menjadi sulit. Hal ini disebabkan reaksi esterifikasi sangat dipengaruhi oleh halangan sterik substratnya.

Produk yang terbentuk diperkirakan memiliki derajat substitusi yang rendah dan dapat bersifat sebagai *emulsifier*. Hal ini didukung dengan pengamatan hasil reaksi yang menunjukkan campuran membentuk sistem yang menyerupai emulsi. Untuk memastikan apakah hasil reaksi memang membentuk sistem emulsi, dilakukan proses demulsifikasi sederhana yaitu dengan cara sentrifugasi. Apabila campuran memang merupakan emulsi, maka setelah proses demulsifikasi, campuran akan terpisah menjadi tiga fasa, yaitu fasa polar, fasa non polar, dan zat pengemulsi. Berikut ini ialah pengamatan hasil reaksi (Gambar 4.4).

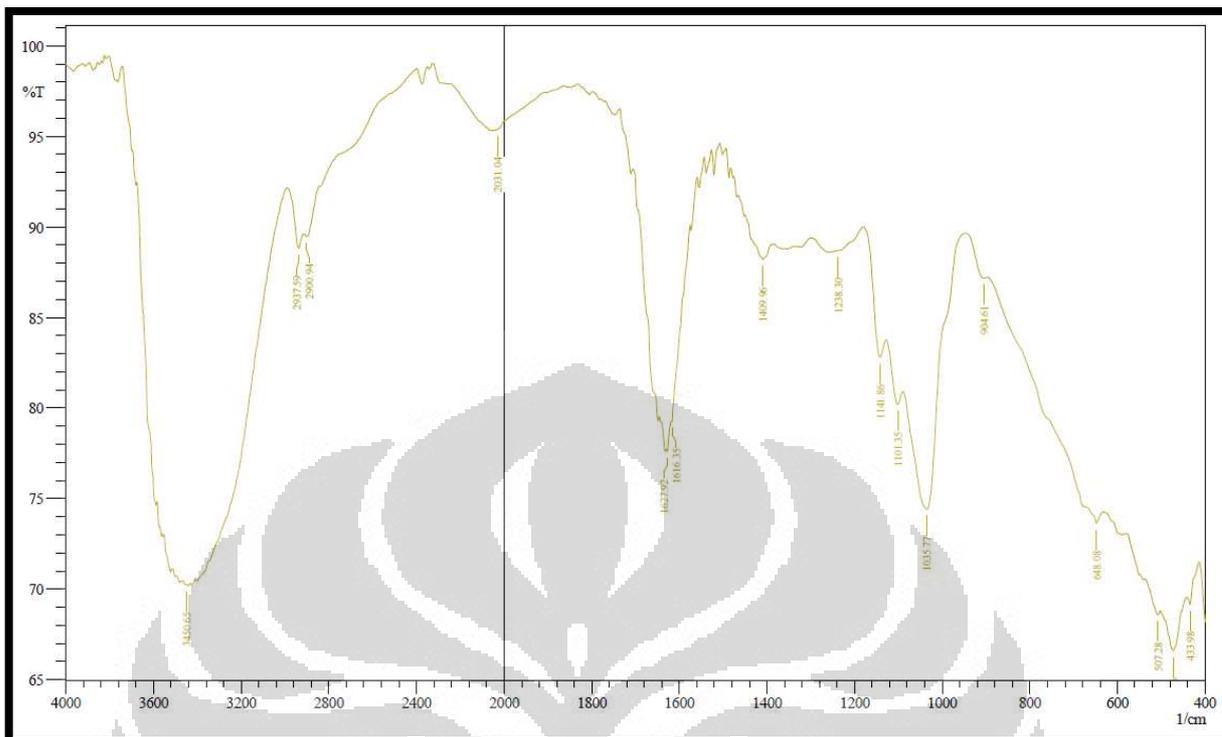


Keterangan: A. Sebelum sentrifugasi
B. Setelah sentrifugasi

Gambar 4.4. Campuran hasil reaksi sebelum dan sesudah proses demulsifikasi sederhana

Setelah dilakukan sentrifugasi, didapatkan campuran terpisah menjadi tiga fasa. Fasa atas merupakan fasa non polar, yaitu asam lemak yang terlarut dalam n-heksana dan fasa bawah merupakan fasa polar yaitu air. Fasa tengah diperkirakan merupakan produk reaksi, yaitu ester glukosa yang dapat berfungsi sebagai *emulsifier*. Senyawa yang berada di antara fasa polar dan fasa non polar kemudian diambil dan dilakukan identifikasi menggunakan FT-IR. Identifikasi dengan FT-IR bertujuan untuk melihat secara kualitatif gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa tersebut.

Pengukuran dengan FT-IR juga dilakukan terhadap glukosa dan asam lemak minyak kelapa. Hal ini dilakukan untuk membandingkan pita-pita serapan yang muncul pada produk hasil sintesis. Hasil pengukuran FT-IR glukosa dapat dilihat pada Gambar 4.5, sedangkan tabel korelasi spektrum dengan gugus fungsinya dapat dilihat pada Tabel 4.1.



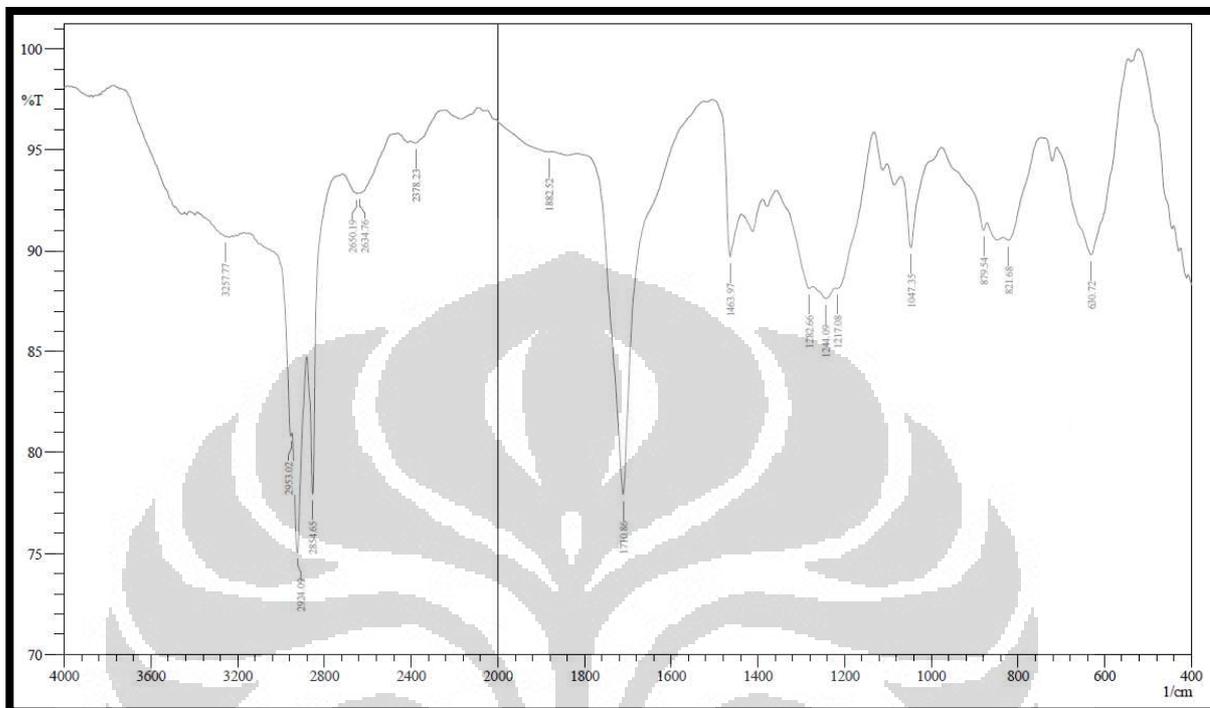
Gambar 4.5. Spektrum FT-IR glukosa

Tabel 4.1. Identifikasi gugus fungsi spektrum IR glukosa

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Identifikasi Gugus Fungsi
1	3446,79	O-H
2	2937,59 – 2900	C-H ulur

Serapan lebar pada daerah 3500 – 3200 cm⁻¹ merupakan serapan khas pita –OH alkohol yang terdapat pada glukosa. Glukosa merupakan monosakarida dengan lima gugus hidroksil, sehingga pita serapan –OH alkohol akan muncul pada spektrum. Selanjutnya pita serapan 3000 – 2800 cm⁻¹ merupakan pita serapan ulur C-H dalam –CH₂ dan –CH.

Pengukuran selanjutnya dilakukan pada asam lemak hidrolisat. Hasil pengukuran FT-IR asam lemak hidrolisat dapat dilihat pada Gambar 4.6. Korelasi spektrum dan gugus fungsi asam lemak hidrolisat dapat dilihat pada Tabel 4.2.



Gambar 4.6. Spektrum FT-IR asam lemak hidrolisat

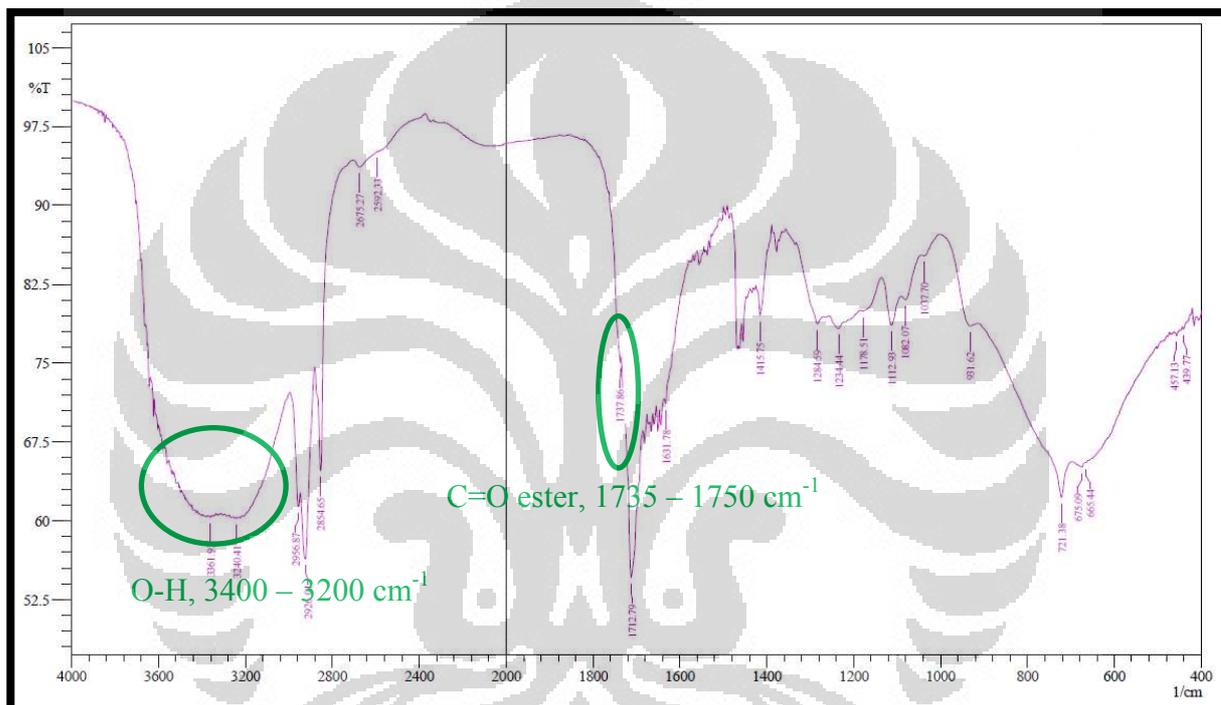
Tabel 4.2. Identifikasi gugus fungsi spektrum IR asam lemak hidrolisat

No	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Identifikasi Gugus Fungsi
1	3257,77	O-H asam karboksilat
2	2953,02	C-H ulur
	2924,09 2854,65	
3	1710,86	C=O asam karboksilat

Pada pengukuran spektrum IR asam lemak hidrolisat, didapatkan gugus fungsi C=O asam karboksilat pada daerah $1725 - 1700 \text{ cm}^{-1}$. Selain itu terdapat juga pita serapan tajam pada daerah $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$. Pita serapan ini menandakan uluran C-H pada $-\text{CH}_2$ dan $-\text{CH}$ yaitu rantai karbon dari asam lemak. Sesuai hasil analisis, asam lemak hidrolisat minyak kelapa sebagian besar terdiri dari asam lemak rantai sedang, sehingga serapan uluran C-H dalam $-\text{CH}_2$

dan -CH memiliki serapan yang tinggi. Pada spektrum IR juga tidak ditemukan pita serapan di atas 3000 cm^{-1} untuk serapan uluran C-H dalam ikatan tidak jenuh. Hal ini sesuai dengan hasil analisis, bahwa asam lemak dalam minyak kelapa didominasi oleh asam lemak jenuh, sehingga tidak ditemukan pita serapan uluran C-H untuk ikatan tidak jenuh.

Selanjutnya, untuk spektrum FT-IR dari produk hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 4.7. Adapun identifikasi gugus fungsi dari pita-pita serapannya dapat dilihat pada Tabel 4.3.



Gambar 4.7. Spektrum FT-IR produk hasil sintesis

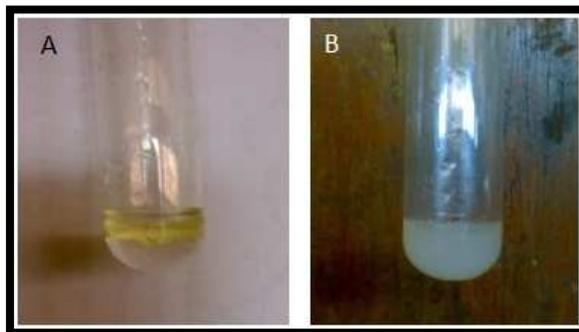
Tabel 4.3. Identifikasi gugus fungsi spektrum IR produk esterifikasi

No	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Identifikasi Gugus Fungsi
1	3344,57	O-H alkohol yang masih ada
2	2956,87 2926,01 2854,65	C-H
3	1737,86	C=O ester
4	1712,79	C=O asam karboksilat

Pada spektrum FT-IR yang didapat, terlihat adanya pita serapan untuk gugus ester, yaitu pada daerah $1750 - 1735 \text{ cm}^{-1}$, yang tidak terdapat pada spektrum IR glukosa maupun asam lemak hidrolisat. Puncak serapan lainnya ialah pada daerah $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan pita serapan gugus $-\text{OH}$ alkohol. Hal ini menandakan masih terdapatnya gugus hidroksil yang tidak teresterifikasi, sesuai dengan perkiraan bahwa ester glukosa hasil sintesis memiliki derajat substitusi rendah sehingga dapat berfungsi sebagai *emulsifier*. Pita serapan lainnya yang muncul ialah pita serapan C-H pada daerah $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ dan pita serapan C=O asam karboksilat pada daerah $1725 - 1700 \text{ cm}^{-1}$. Serapan ini mirip dengan pita serapan pada asam lemak hidrolisat.

Berdasarkan hasil pengamatan secara kasar terhadap produk hasil reaksi setelah campuran diinkubasi dan juga spektrum IR yang diperoleh, kemungkinan besar produk hasil sintesis adalah ester glukosa yang merupakan suatu senyawa amfifilik, yaitu memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu molekul. Gugus hidrofiliknya ialah gugus hidroksil ($-\text{OH}$) yang berasal dari molekul glukosa sedangkan gugus hidrofobiknya ialah rantai karbon dari asam lemak. Karena hal tersebut, ester glukosa hasil sintesis mampu menurunkan tegangan permukaan dan bersifat sebagai *emulsifier*.

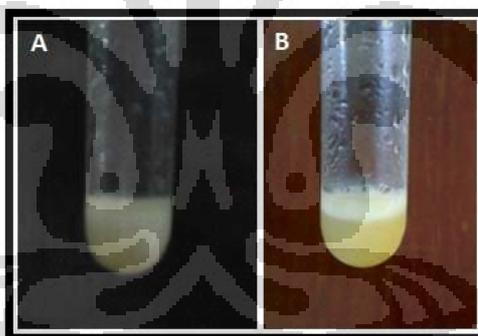
Untuk membuktikan hal tersebut, dilakukan uji emulsi sederhana. Uji ini dilakukan dengan cara menambahkan produk hasil sintesis (ester glukosa) ke dalam campuran air dan minyak. Berdasarkan perbedaan kepolarannya, campuran air dengan minyak tidak dapat bercampur melainkan akan terpisah menjadi dua fasa. Fasa atas ialah minyak dan fasa bawah ialah air (berat jenis minyak lebih kecil daripada air). Pada uji emulsi ini, setelah ester glukosa hasil sintesis ditambahkan ke dalam campuran minyak dan air, terlihat tidak ada lagi perbedaan fasa dalam campuran. Hal ini menandakan bahwa ester glukosa hasil sintesis dapat bertindak sebagai *emulsifier*. Berikut ini ialah pengamatan uji emulsi sederhana ester glukosa hasil sintesis (Gambar 4.8).



Keterangan: A. Sebelum penambahan ester glukosa hasil sintesis
B. Setelah penambahan ester glukosa hasil sintesis

Gambar 4.8. Hasil uji emulsi secara kualitatif

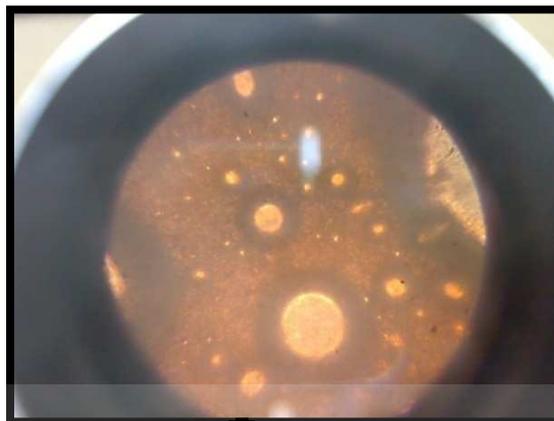
Pengamatan uji emulsi dilakukan selama 24 jam untuk mengetahui kestabilan emulsi yang terbentuk. Dari hasil pengamatan, diperoleh sistem emulsi yang stabil dan emulsi tetap membentuk satu fasa yang homogen. Namun setelah 68 jam, campuran berubah dan terpisah menjadi dua fasa. Hasil pengamatan uji kestabilan emulsi dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Keterangan: A. Setelah 24 jam
B. Setelah 68 Jam

Gambar 4.9. Pengamatan uji kestabilan emulsi yang terbentuk

Untuk mengetahui jenis emulsi yang terbentuk, dilakukan pengamatan sistem emulsi dengan mikroskop. Setetes emulsi diteteskan di atas kaca preparat kemudian ditambahkan satu tetes zat pewarna eosin. Zat warna eosin yang larut dalam air akan memberikan warna merah pada fasa air, sehingga pengamatan dapat dibedakan antara fasa air dengan fasa minyak. Hasil pengamatan emulsi menggunakan mikroskop dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10. Pengamatan emulsi yang terbentuk dengan mikroskop

Dari hasil pengamatan, terlihat *droplet-droplet* bening di sekitar lingkungan yang berwarna kemerahan. Lingkungan yang berwarna kemerahan merupakan air dengan zat warna eosin yang terlarut di dalamnya. Ini menandakan bahwa emulsi yang terbentuk merupakan emulsi minyak dalam air (o/w). Hal tersebut sesuai bila melihat derajat substitusi ester glukosa yang rendah, karena derajat substitusi yang rendah berarti hanya sedikit gugus hidroksil yang teresterifikasi. Gugus hidroksil lainnya yang tidak tersubstitusi merupakan gugus yang polar dan lebih larut dalam air daripada minyak.

4.3 Optimasi Imobilisasi Lipase *Candida rugosa* pada Matriks Ca-Alginat

Alasan teknik imobilisasi enzim banyak digunakan adalah karena beberapa keuntungan yang bisa didapatkan, antara lain enzim dapat digunakan kembali dan aplikasinya mudah pada sistem *batch* maupun sistem kontinyu. Kelebihan yang paling utama dari teknik imobilisasi ialah mudah dilakukan pemisahan antara enzim dengan produk maupun dengan reaktan yang tidak bereaksi. Hal ini karena pada metode imobilisasi, enzim dihubungkan dengan matriks yang tidak larut dalam air. Namun, dalam melakukan imobilisasi enzim perlu ditentukan sejauh mana imobilisasi tersebut berhasil, sebelum langsung diaplikasikan pada reaksi yang diinginkan.

Keberhasilan metode imobilisasi diukur dari nilai efisiensi imobilisasi, yang menggambarkan seberapa banyak enzim yang terperangkap dalam matriks

masih memiliki aktivitas katalitik. Untuk mendapatkan nilai efisiensi imobilisasi, diperlukan nilai % *loading*, yaitu persentase enzim yang masuk ke dalam matriks. Efisiensi imobilisasi ialah rasio aktivitas spesifik antara enzim imobil dengan enzim bebas. Untuk mengetahui nilai aktivitas spesifik enzim imobil, perlu diketahui terlebih dahulu kadar protein dalam enzim imobil tersebut dan % *loading* ialah penentuan kadar protein dalam enzim imobil.

Penentuan nilai % *loading* pada penelitian kali ini dilakukan dengan metode Lowry untuk penentuan kadar konsentrasi protein. Nilai % *loading* didapat dengan cara mencari selisih antara banyaknya mg protein yang terdapat pada larutan enzim awal sebelum diimobilisasi dengan banyaknya mg protein yang terdapat pada filtrat hasil penyaringan enzim terimobilisasi. Selisih antara keduanya merupakan protein yang terdapat dalam enzim imobil.

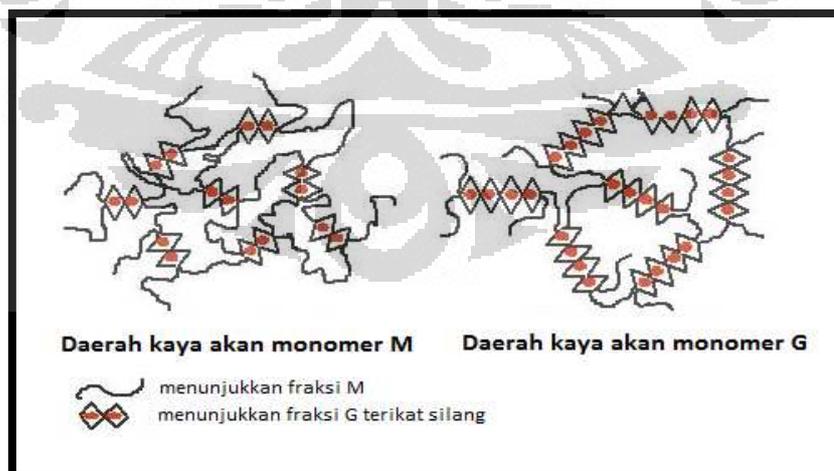
Nilai efisiensi imobilisasi didapat dengan cara membandingkan aktivitas spesifik enzim imobil dengan aktivitas spesifik enzim bebas pada reaksi hidrolisis. Pencarian aktivitas lipase imobil dilakukan dengan metode titrimetri pada reaksi hidrolisis. Hal ini karena reaksi tersebut adalah reaksi yang paling mudah dikatalisis oleh enzim lipase.

Pada penelitian ini dilakukan imobilisasi enzim yang digunakan sebagai biokatalis ke dalam matriks *bead* Ca-alginat. Metode imobilisasi ini termasuk ke dalam jenis metode *entrapping*, yaitu penjeratan molekul enzim dalam rongga-rongga matriks alginat. *Bead* Ca-alginat terbentuk saat larutan natrium alginat diteteskan ke dalam larutan CaCl_2 (Gambar 4.11). Hal ini disebabkan oleh adanya ikatan silang antara kation divalen Ca^{2+} dengan anion karboksilat ($-\text{COO}^-$) dari monomer asam guluronat (G) dalam molekul alginat, membentuk suatu jaringan tiga dimensi dalam bentuk gel (Fraser, 1997). Zona pengikatan kation divalen dengan monomer blok G sering kali disebut dengan struktur *egg box*.



Gambar 4.11. *Bead* Ca-alginat yang terbentuk saat larutan alginat diteteskan ke dalam larutan CaCl_2

Kemampuan alginat membentuk gel ditentukan oleh kadar asam guluronat yang menyusun struktur alginat. Kekuatan gel ditentukan oleh ukuran molekul dan komposisi struktur yang menyusun alginat. Tingginya kandungan asam guluronat di dalam alginat akan menyebabkan alginat dapat mengikat ion divalen lebih baik dibandingkan dengan alginat yang lebih sedikit mengandung asam guluronat, sehingga akan menghasilkan gel yang lebih kuat dan lebih stabil. Dalam pembentukan gel, hanya monomer asam guluronat (G) yang berperan dalam pengikatan silang dengan ion divalen, maka alginat dengan rasio manuronat/guluronat (M/G) yang berbeda dapat menghasilkan gel dengan karakteristik yang berbeda pula (Gambar 4.12).



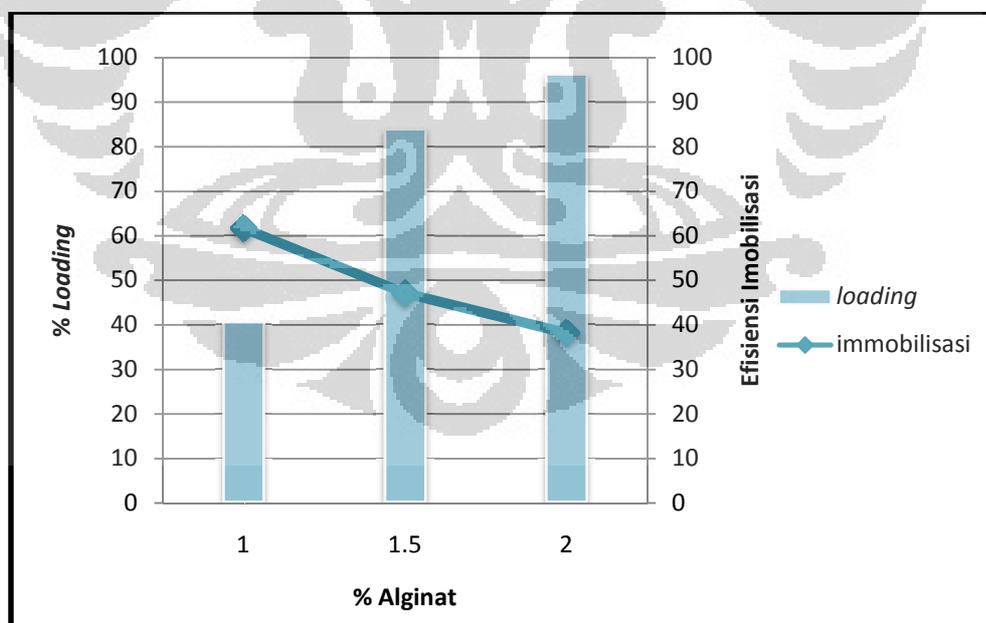
[Sumber: <http://www.genialab.de/inventory/alginate.htm>]

Gambar 4.12. Alginat dengan rasio M/G yang berbeda saat membentuk ikatan silang dengan ion divalen (telah diolah kembali)

Imobilisasi lipase dalam matriks Ca-alginat terjadi saat larutan alginat yang dicampur dengan larutan enzim lipase membentuk gel *bead* dan karena ikat silang antara alginat dengan kation Ca^{2+} menyebabkan pembentukan gel, maka dua faktor yang langsung mempengaruhi proses imobilisasi adalah konsentrasi larutan alginat yang digunakan dan konsentrasi larutan CaCl_2 sebagai sumber kation divalen (Won, *et al.*, 2005). Dalam penelitian ini, digunakan tiga variasi konsentrasi alginat, yaitu 1%, 1,5%, dan 2% (w/v). Dari reaksi hidrolisis yang digunakan untuk menguji aktivitas katalitik lipase imobil yang dihasilkan, diperoleh hasil sebagai berikut (Tabel 4.4 dan Gambar 4.13).

Tabel 4.4. Hubungan konsentrasi alginat dengan % *loading* dan efisiensi imobilisasi

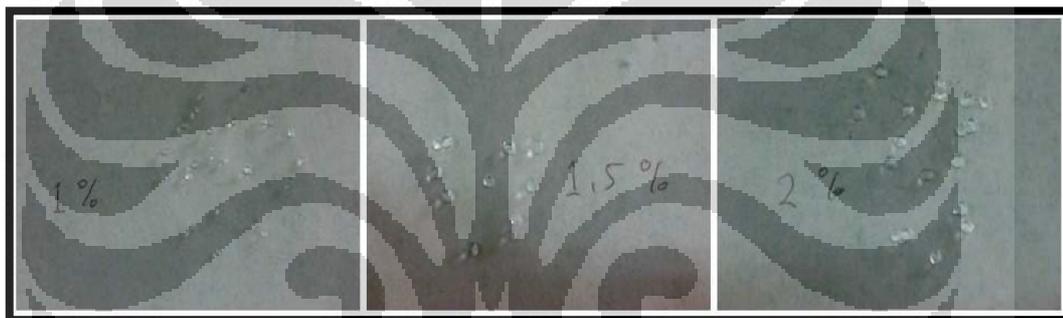
Konsentrasi larutan alginat (%)	% <i>loading</i> (%)	Efisiensi imobilisasi (%)
1,0	40,50	61,66
1,5	83,80	47,09
2,0	96,10	38,11



Gambar 4.13. Grafik % *loading* dan efisiensi imobilisasi vs % alginat yang digunakan

Berdasarkan hasil yang didapat, semakin tinggi konsentrasi alginat yang digunakan, semakin tinggi nilai % *loading* yang diperoleh. Hal ini karena anion alginat berikatan silang dengan ion Ca^{2+} , maka peningkatan konsentrasi alginat diduga membuat jaringan ikat silang tiga dimensi semakin banyak. Banyaknya jaringan ikat silang tiga dimensi membuat laju difusi lipase *Candida rugosa* untuk keluar dari matriks semakin kecil (Knezevic, *et al.*, 2002; Won, *et al.*, 2005).

Konsentrasi alginat juga berpengaruh terhadap ukuran *bead* yang dihasilkan. *Bead* dari larutan dengan konsentrasi 1% memiliki karakteristik agak rapuh dan kecil-kecil dengan bentuk oval dan pipih, sedangkan larutan dengan konsentrasi 1,5% dan 2% menghasilkan *bead* yang cukup kuat dan besar dengan bentuk bulat. Pada Gambar 4.14 terlihat bentuk *bead* yang dihasilkan dari tiap konsentrasi.



Gambar 4.14. *Bead* lipase imobil Ca-alginat yang dihasilkan dari larutan alginat dengan konsentrasi 1 – 2%

Bentuk *bead* yang lebih besar diduga juga karena jaringan ikat silang tiga dimensi yang lebih banyak terbentuk. Semakin kuat jaringan ikat silangnya, maka *bead* yang dihasilkan menjadi tidak rapuh dan mampu mempertahankan enzim dari kebocoran. Karena hal tersebut, didapatkan % *loading* yang semakin besar seiring dengan meningkatnya konsentrasi larutan alginat yang digunakan.

Berbeda dengan nilai % *loading* yang didapatkan, nilai efisiensi imobilisasi justru semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi larutan alginat yang digunakan. Peningkatan konsentrasi alginat berakibat pada meningkatnya jaringan ikat silang tiga dimensinya sehingga dapat menurunkan laju difusi, baik laju difusi lipase untuk keluar matriks maupun laju difusi substrat

untuk mencapai sisi katalitik lipase (Tanaka, *et al.*, 1984; Knezevic, *et al.*, 2002; Won, *et al.*, 2005).

Salah satu efek imobilisasi enzim pada suatu matriks adalah terlokalisasinya enzim tersebut dalam rongga matriks yang digunakan. Lokalisasi tersebut membuat enzim dapat memiliki kestabilan yang lebih besar terhadap suhu dan pH (Matsumoto & Ohashi, 2003). Namun lokalisasi tersebut juga membatasi ruang gerak enzim. Orientasi dan perubahan konformasi enzim dalam matriks juga tidak selalu pada arah yang dapat memudahkan substrat untuk mencapai sisi katalitik enzim (Knezevic, *et al.*, 2002; Won, *et al.*, 2005). Akibatnya, sisi aktif enzim dapat menjadi tertutup atau terhalangi sehingga reaksi enzimatik tidak dapat berlangsung.

Dari segi ukuran *bead*, larutan alginat 1% menghasilkan *bead* yang paling kecil dibandingkan dengan *bead* dari larutan alginat 1,5% dan 2%. *Bead* yang lebih kecil memiliki luas permukaan yang lebih besar dan dapat mengurangi resistensi transfer massa (Won, *et al.*, 2005). Hal tersebut kemungkinan berhubungan dengan jaringan ikat silang yang tidak begitu banyak pada *bead* yang berukuran kecil sehingga membuat laju difusi substrat semakin besar. Besarnya laju difusi substrat membuat kontak antara substrat dengan enzim lipase semakin banyak. Banyaknya kontak antara lipase dengan substrat membuat kerja lipase semakin optimal, karenanya memiliki aktivitas yang lebih besar. Berdasarkan hal tersebut, maka konsentrasi larutan alginat yang optimal untuk mendapatkan aktivitas katalitik yang maksimal adalah 1%.

Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan gel Ca-alginat ialah konsentrasi ion divalen. Namun, konsentrasi CaCl_2 tidak terlalu memberikan pengaruh terhadap nilai % *loading* maupun efisiensi imobilisasi, karena kelebihan konsentrasi ion Ca^{2+} tidak memberikan pengaruh terhadap proses pembentukan gel *bead* (Won, *et al.*, 2005). Secara keseluruhan, konsentrasi alginat memberikan pengaruh yang lebih besar terhadap pembentukan gel Ca-alginat. Oleh sebab itu, konsentrasi alginat perlu dioptimasi guna mengoptimalkan kinerja lipase imobil Ca-alginat.

4.4 Penggunaan Lipase Imobil pada Ca-alginat Sebagai Katalis Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Hidrolisat dengan Glukosa

Setelah terbukti reaksi esterifikasi glukosa dengan asam lemak hidrolisat minyak kelapa dapat berlangsung menggunakan lipase *Candida rugosa*, maka dalam penelitian ini dilakukan pengembangan berupa imobilisasi lipase pada matriks Ca-alginat. Tujuan dari penggunaan lipase imobil Ca-alginat pada reaksi esterifikasi ini adalah agar enzim yang digunakan dapat dipisahkan kembali dan memungkinkan bila akan digunakan secara berulang. Kondisi imobilisasi yang digunakan ialah kondisi optimal yang telah didapatkan, yaitu dengan menggunakan larutan Na-alginat 1%.

Berbeda dengan saat menggunakan lipase bebas, reaksi esterifikasi dengan menggunakan lipase imobil Ca-alginat tidak menghasilkan suatu campuran seperti emulsi setelah diinkubasi. Hasil campuran dari sampel maupun blanko nampak hampir tidak berbeda (Gambar 4.15). Perbedaan yang mencolok yang teramati baik pada sampel maupun blanko ialah banyaknya fasa dalam campuran. Sebelum diinkubasi, campuran terdiri atas dua fasa yang terpisah, yaitu fasa non polar yang berisi asam lemak hidrolisat yang terlarut dalam n-heksana, dan fasa polar yang berisi glukosa. Namun setelah proses inkubasi berlangsung, campuran hanya membentuk satu fasa yang bersifat non polar yaitu fasa asam lemak yang terlarut dalam n-heksana. Hal ini terjadi baik pada sampel maupun blanko. Penjelasan dari hal tersebut adalah kemungkinan air yang terdapat dalam sistem reaksi terserap oleh gel Ca-alginat. Hal ini disebabkan gel Ca-alginat merupakan gel yang hidrofilik dan memiliki kemampuan menyerap air yang didukung oleh fakta bahwa alginat juga dapat diaplikasikan sebagai hidrogel (Augst, *et al.*, 2006; West, *et al.*, 2007).



Gambar 4.15. Hasil inkubasi sampel (kiri) dan blanko (kanan)

Walaupun pengamatan hasil reaksi tidak berbeda dengan blanko, kemungkinan reaksi esterifikasi tetap berjalan. Hal ini didukung oleh penelitian yang telah berhasil menggunakan lipase imobil Ca-alginat sebagai biokatalis reaksi esterifikasi (Ozyilmaz & Gezer, 2010). Akan tetapi, produk ester glukosa yang berwarna putih dan berada pada fasa tengah tidak didapatkan saat campuran hasil reaksi disentrifugasi. Hal ini kemungkinan karena rasio enzim yang terlalu kecil dalam lipase imobil Ca-alginat. Selain itu hanya 61% enzim yang aktif dalam lipase imobil tersebut, sehingga produk yang terbentuk sangat sedikit.

4.5 Optimasi Kondisi Esterifikasi Menggunakan *Bead* Lipase Imobil pada Ca-alginat

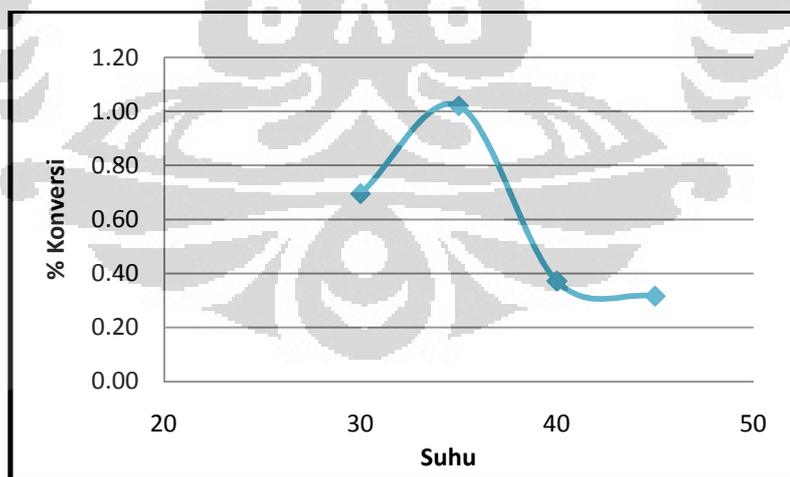
Untuk mengetahui apakah reaksi esterifikasi benar terjadi bila menggunakan lipase imobil pada Ca-alginat, pada penelitian ini dilakukan analisis hasil esterifikasi. Tujuannya adalah untuk mengetahui apakah ada asam lemak yang hilang dan bereaksi dalam campuran. Analisis hasil esterifikasi dilakukan secara titrimetri (Yu, *et al.*, 2008), yaitu dengan menitrasi sisa asam lemak yang terdapat dalam campuran, dan analisis ini dilakukan dengan memvariasikan kondisi-kondisi yang mempengaruhi jalannya reaksi esterifikasi.

4.5.1 Optimasi Suhu Reaksi

Kestabilan struktur/konformasi tiga dimensi protein enzim harus dipertahankan pada kondisi optimumnya agar enzim dapat melaksanakan aktivitas katalitiknya secara optimal sehingga dapat dihasilkan produk yang maksimal. Faktor suhu berpengaruh pada perubahan konformasi tiga dimensi protein enzim lipase dan juga terhadap kelarutan asam lemak dan glukosa sebagai substratnya pada reaksi esterifikasi. Suhu optimum enzim ialah suhu pada saat suatu enzim memiliki aktivitas katalitik yang optimum. Optimasi suhu dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan suhu optimum kondisi esterifikasi agar menghasilkan persentase produk paling besar. Tabel 4.5 dan Gambar 4.16 merupakan hubungan antara suhu reaksi dengan persentase produk ester yang didapatkan.

Tabel 4.5. Data persen konversi asam lemak variasi suhu inkubasi

Suhu (°C)	Konversi Asam Lemak (%)
30	0,70
35	1,02
40	0,37
45	0,32



Keterangan: kondisi reaksi 4 jam, rasio glukosa/asam lemak 1:60, berat *molecular sieve* 0,1 g

Gambar 4.16. Grafik hubungan suhu dengan persen konversi asam lemak

Dari Tabel 4.5 dan Gambar 4.16 diketahui bahwa suhu optimum enzim lipase *Candida rugosa* imobil untuk reaksi esterifikasi ialah pada 35° C. Enzim lipase *Candida rugosa* memiliki rentang suhu optimum antara 30 – 35° C (Fadiloğlu & Söylemez, 1997). Pada penelitian sebelumnya, suhu optimum enzim lipase *Candida rugosa* untuk reaksi esterifikasi ialah 30° C (Barkah, 2011; Novianingsih, 2011), berbeda dengan hasil yang diperoleh pada penelitian kali ini. Hal ini kemungkinan disebabkan enzim lipase yang digunakan pada penelitian ini terimobilisasi pada matriks Ca-alginat, sehingga untuk menghasilkan tumbukan yang efektif antara molekul enzim dengan substrat diperlukan energi kinetik yang lebih besar.

Dari suhu 30° C sampai suhu 35° C, kecepatan/laju reaksi enzimatis meningkat karena meningkatnya energi kinetik molekul sehingga frekuensi tumbukan antara molekul enzim dengan substrat meningkat. Selain itu, semakin tinggi suhu juga membuat kelarutan substrat, yakni asam lemak dan glukosa, semakin meningkat. Namun di atas suhu 35° C, kecepatan reaksi menurun karena kestabilan enzim imobil mulai terganggu dan matriks alginat mulai mengalami degradasi pada suhu 40° C, sehingga enzim yang terperangkap di dalamnya dapat dengan mudah lepas. Hal ini terlihat dari enzim imobil yang mulai meleleh setelah inkubasi reaksi. Bocornya enzim ke dalam larutan tidak membuat % konversi asam lemak menjadi lebih tinggi karena pada suhu 40° C enzim lipase mengalami perubahan konformasi tiga dimensi sehingga enzim menjadi inaktif.

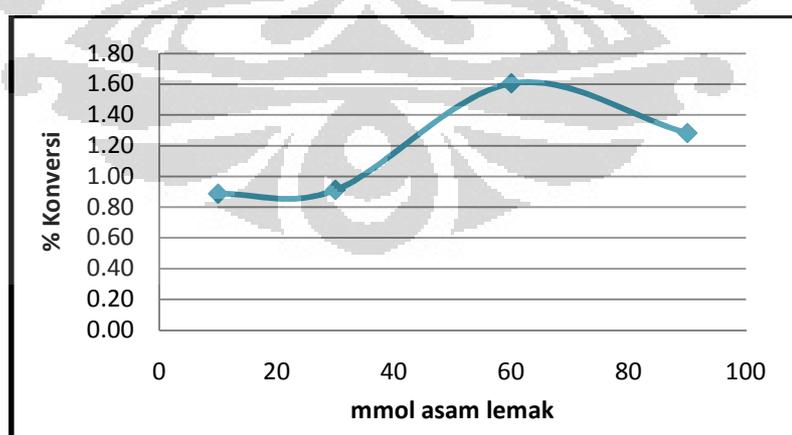
4.5.2 Optimasi Rasio Antara Asam Lemak dengan Glukosa

Berdasarkan asas kesetimbangan Le Chatelier, penggunaan reaktan berlebih dapat menggeser kesetimbangan reaksi ke arah pembentukan produk. Reaksi esterifikasi enzimatis merupakan reaksi kesetimbangan. Atas dasar hal tersebut digunakan reaktan yang berlebih agar kesetimbangan reaksi dapat bergeser ke arah pembentukan produk. Pada penelitian ini, dilihat pengaruh rasio dari asam lemak dengan glukosa terhadap reaksi esterifikasi. Variasi dilakukan terhadap jumlah mol asam lemak, sedangkan jumlah mol glukosa dibuat tetap. Hal ini dimaksudkan agar dalam reaksi, glukosa berperan sebagai pereaksi pembatas, dengan demikian gugus hidroksil yang ada pada glukosa dapat teresterifikasi secara maksimal.

Variasi konsentrasi substrat dengan rasio glukosa : asam lemak yang digunakan ialah 1:10, 1:30, 1:60, dan 1:90. Pemilihan variasi ini didasarkan pada penelitian mengenai esterifikasi enzimatis menggunakan gliserol yang menunjukkan keadaan optimum pada rasio 1:6 (Byun, *et al.*, 2007). Hasil penelitian tersebut menunjukkan rasio substrat berhubungan dengan jumlah gugus hidroksil pada alkohol dan keadaan optimum didapat pada rasio dua kali jumlah gugus hidroksil. Pada penelitian sebelumnya (Barkah, 2011; Novianingsih, 2011) mengenai reaksi esterifikasi antara sukrosa dan asam lemak, rasio yang digunakan dimulai dari 1:16, yaitu pada perbandingan dua kali jumlah gugus hidroksil pada sukrosa. Maka pada penelitian ini, rasio glukosa : asam lemak dimulai dari 1:10, karena jumlah gugus hidroksil pada glukosa ialah 5. Hubungan antara rasio substrat dengan persen konversi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.17.

Tabel 4.6. Data persen konversi asam lemak variasi rasio mol substrat

Rasio Glukosa : Asam lemak (mmol)	Konversi Asam Lemak (%)
1:10	0,89
1:30	0,91
1:60	1,60
1:90	1,41



Keterangan: kondisi reaksi 8 jam, suhu 35° C, berat *molecular sieve* 0,1 g

Gambar 4.17. Grafik hubungan rasio glukosa/asam lemak dengan persen konversi asam lemak

Persen konversi asam lemak meningkat seiring dengan meningkatnya rasio sampai 1:60, selebihnya grafik menurun. Hal ini karena semakin tinggi konsentrasi substrat akan meningkatkan aktivitas enzim hingga tercapai konsentrasi optimum. Selain itu, tingginya konsentrasi substrat juga dapat menggeser kesetimbangan ke arah pembentukan produk pada reaksi esterifikasi, sehingga didapatkan seiring dengan meningkatnya konsentrasi produk, persen konversi yang diperoleh pun semakin besar.

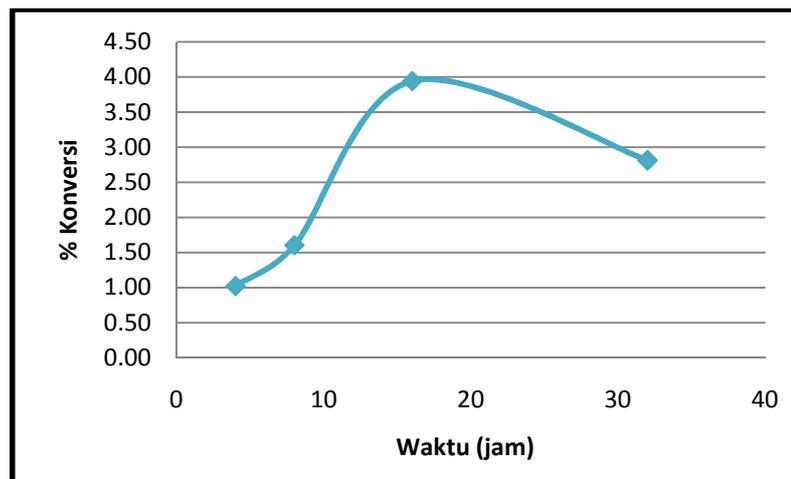
Setelah mencapai konsentrasi optimum, diperoleh persen konversi menurun dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Hal ini disebabkan substrat akan bertindak sebagai inhibitor dalam reaksi enzimatik (Novianingsih, 2011). Tingginya konsentrasi asam lemak dapat menyebabkan gugus asam karboksilat bebas atau terionisasi tinggi. Hal ini menyebabkan lapisan air mikro (air esensial) di sekitar enzim bersifat asam, sehingga struktur tersier protein lipase bersifat tidak stabil dan cenderung berubah pada kondisi di bawah normal (Ozyilmaz & Gezer, 2010; Poerwanto, *et al.*, 2010).

4.5.3 Optimasi Waktu Inkubasi Reaksi Esterifikasi

Waktu inkubasi ialah waktu yang ditentukan untuk enzim bereaksi dengan substrat. Waktu inkubasi menentukan lamanya waktu yang dibutuhkan agar reaksi esterifikasi enzimatik mencapai kesetimbangan. Pada penelitian ini, dilakukan variasi waktu inkubasi yaitu 4, 8, 16, dan 32 jam. Berikut ini merupakan data pengaruh waktu inkubasi terhadap persen konversi (Tabel 4.7 dan Gambar 4.18).

Tabel 4.7. Data persen konversi asam lemak variasi waktu inkubasi

Waktu inkubasi (jam)	Konversi Asam Lemak (%)
4	1,02
8	1,60
16	3,94
32	2,81



Keterangan: kondisi reaksi suhu 35° C, rasio glukosa/asam lemak 1:60, berat *molecular sieve* 0,1 g

Gambar 4.18. Grafik hubungan waktu dengan persen konversi asam lemak

Dari hasil optimasi waktu inkubasi didapatkan waktu inkubasi optimal untuk reaksi esterifikasi ialah selama 16 jam. Selanjutnya, persen konversi yang didapatkan menurun. Penurunan persen konversi kemungkinan disebabkan karena mulai banyaknya air yang terbentuk. Hal ini dapat menyebabkan reaksi esterifikasi menjadi terhambat karena kandungan air melebihi yang dibutuhkan untuk berperan sebagai air esensial dapat menyebabkan resistensi transfer massa substrat pada enzim imobil (Ozyilmaz & Gezer, 2010). Penyebab lainnya ialah kemungkinan terjadinya reaksi hidrolisis dari ester yang telah terbentuk, sehingga persen konversi menjadi berkurang (Barkah, 2011; Novianingsih, 2011).

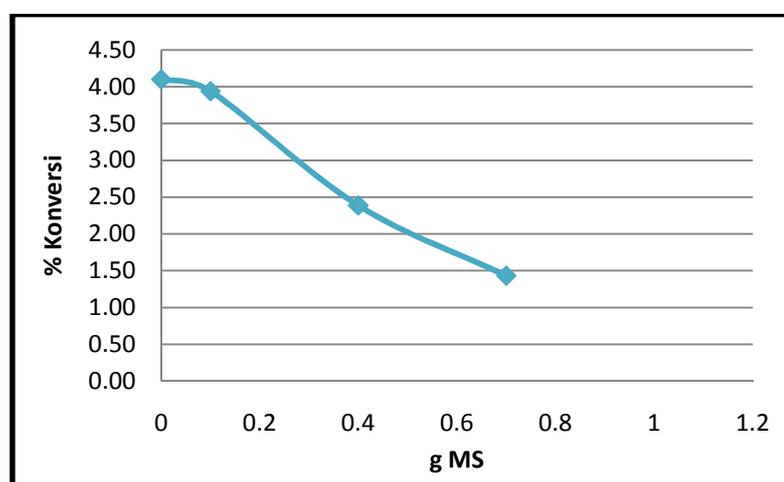
4.5.4 Optimasi Berat *Molecular Sieve*

Reaksi esterifikasi enzimatik merupakan reaksi kesetimbangan, dan salah satu produknya ialah air (produk samping). Apabila kesetimbangan telah tercapai dan air yang terbentuk tidak ditarik atau dipisahkan, adanya air tersebut justru akan menyebabkan reaksi esterifikasi enzimatik berhenti, bahkan malah berjalan sebaliknya yaitu reaksi hidrolisis ester. Untuk itu, perlu dilakukan pemisahan air dari campuran reaksi agar reaksi esterifikasi dapat terus berjalan optimal, salah satu caranya ialah dengan penggunaan *molecular sieve*. *Molecular sieve* merupakan suatu bahan penarik air yang berfungsi mengeringkan sistem reaksi dari air.

Pada penelitian ini, dilakukan variasi berat *molecular sieve* dan dilihat pengaruhnya pada nilai persen konversi asam lemak. Hubungan berat *molecular sieve* dengan persen konversi dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan Gambar 4.19.

Tabel 4.8. Data persen konversi asam lemak variasi berat *molecular sieve*

Berat <i>molecular sieve</i> (g)	Konversi Asam Lemak (%)
0,0	4,10
0,1	3,94
0,4	2,39
0,7	1,43



Keterangan: kondisi reaksi 16 jam, suhu 35° C, rasio glukosa/asam lemak 1:60

Gambar 4.19. Grafik hubungan berat *molecular sieve* dengan persen konversi asam lemak

Dari hasil optimasi pengaruh penambahan *molecular sieve* didapatkan nilai persen konversi semakin menurun seiring dengan bertambahnya *molecular sieve*. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan bentuk fisik lipase imobil yang digunakan. Pada penelitian ini, matriks gel Ca-alginat yang digunakan untuk imobilisasi lipase juga memiliki kandungan air sebagai kerangka penyusun gel. Penggunaan *molecular sieve* yang semakin banyak kemungkinan justru akan mengganggu lipase imobil Ca-alginat. Hal ini disebabkan daya dehidrasi *molecular sieve* yang sangat besar, sehingga menyebabkan air yang menyusun

kerangka gel alginat terserap keluar dari molekul alginat. Molekul alginat yang terdehidrasi menyebabkan matriks menjadi rusak dan meleleh. Selain itu, tumbukan antara lipase imobil Ca-alginat dengan *bead molecular sieve* menyebabkan gel menjadi hancur. Bukti dari hal tersebut ialah melelehnya lipase imobil Ca-alginat seiring dengan bertambahnya berat *molecular sieve* yang digunakan.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Asam lemak hidrolisat minyak kelapa dapat digunakan sebagai substrat pada reaksi sintesis ester glukosa dengan bantuan lipase *Candida rugosa*.
2. Ester glukosa hasil sintesis dari reaksi esterifikasi menggunakan lipase *Candida rugosa* memiliki sifat sebagai *emulsifier*.
3. Emulsi yang dihasilkan dari ester glukosa hasil sintesis menggunakan lipase *Candida rugosa* ialah emulsi minyak dalam air (o/w).
4. Kondisi optimum imobilisasi lipase *Candida rugosa* dalam matriks gel Ca-alginat ialah pada konsentrasi alginat 1%, dengan nilai % *loading* dan efisiensi imobilisasi sebesar 40,50% dan 61,66%.
5. Kondisi optimum reaksi esterifikasi menggunakan lipase imobil Ca-alginat ialah pada suhu 35° C, rasio mol glukosa dengan asam lemak 1:60, waktu inkubasi 16 jam, dan tanpa *molecular sieve* dengan persen konversi mencapai 4,10%.

5.2 Saran

1. Melakukan pengeringan secara *freeze dry* terhadap *bead* lipase imobil Ca-alginat untuk meminimumkan kandungan airnya.
2. Melakukan optimasi kondisi esterifikasi menggunakan lipase imobil Ca-alginat yang telah diberi perlakuan *freeze dry*.
3. Melakukan optimasi berat enzim yang digunakan dalam reaksi esterifikasi.
4. Melakukan uji keberulangan terhadap lipase imobil Ca-alginat yang digunakan.
5. Mencari persentase konversi asam lemak dengan metode spektrometri agar lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Acros, J. A., Bernabe, M., & Otero, C. (1998). Quantitative Enzymatic Production of 6-O-acylglucose Esters. *Biotechnol. Bioeng.* 57 , 505-509.
- Adamopoulos, Lambrini. (2006). *Understanding the formation of sugar fatty acid esters*. Faculty of North Carolina State University.
- Adelhorst, K., Björkling, F., Godtfredsen, S. E., & Kirk, O. (1990). Enzyme Catalysed Preparation of 6-O-acylglucopyranosides. *Synthesis* 2 , 112-115.
- Akoh, C. C. (1998). Fat Replacers. *Food Technology* 52 , 47-53.
- Akoh, C. C., & Min, D. B. (1998). Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification in Food Lipids-Chemistry. *Nutrition and Biotechnology* , 641-698.
- Akoh, C. C., Lee, G. C., & Liaw, Y. C. (2004). GSDL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res* 43 , 534 - 552.
- Álvarez, J. I., & Carmona, G. H. (2007). Monomer Composition and Sequence of Sodium Alginate Extracted at Pilot Plant Scale from Three Commercially Important Seaweeds from Mexico. *J. Appl. Phycol.* 19 , 545-548.
- Antonian, E. (1998). Recent Advances in the Purification, Characterization, and Structure Determination of Lipases. *LIPIDS* 23 , 1101-1106.
- Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials . *Macromolecular Bioscience* 6 , 623-633.
- Balcao, V. M., & Malcata, F. X. (1998). Lipase Catalyzed Modification of Milkfat. *Biotechnology Advances* 16 , 309-341.
- Balcao, V. M., Pavia, A. L., & Malcata, F. X. (1996). Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art. *Enzyme and Microbial Technology* 18 , 392-416.
- 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.
- Byun, H. G., et al. (2007). *Lipase catalyzed production of monoacylglycerols by the esterification of fish oil fatty acids and with glycerol*. Faculty of Science and Biotechnology, Kangnung National University, Korea.
- Cygler, M., & Schrag, J. D. (1999). Structure and Conformational Flexibility of *Candida rugosa* Lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1441 , 205-214.

- da Silva, V. C., Cintesini, F. J., & Carvalho, P. (2008). Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: A Comparative Study. *J. Braz Chem. Soc* 19 , 1468-1474.
- Fadiloğlu, S., & Söylemez, Z. (1997). Kinetics of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil. *Food Research International* 30 , 171-175.
- Fraser, J.E. & Bickerstaff, G.F. (1997). Entrapment in calcium alginate, in: *Bickerstaff, G.F., Methods in Biotechnology* (1st ed) , 61-66.
- Hariyadi, P. (1996). Katalis Enzimatis dalam Pelarut Organik. *J. Ilmu dan Tek Pangan Vol 1* , 52-60.
- Hashim, Hasnisa binti dan Jumat Salimon. (2008). Kajian Pengoptimuman Tindak Balas Hidrolisis Minyak Kacang Soya. *The Malaysian Journal of Analytical Science* 12 , 205-209.
- Katchalski-Katzir, E., Kraemer, D. M., & Eupergit, C. (2000). A Carrier for Immobilization of Enzyme of Industrial Potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 , 157-176.
- Ketaren, S. (1986). *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Kierstan, M., & Bucke, C. (1977). The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles, and Enzyme in Calcium Alginate Gels. *Biotechnology and Bioengineering* 19 , 387-397.
- Klibanov, A. M. (1986). Enzymes That Work in Organic Solvents. *Chemtech*. 16 , 354-359.
- Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, L., & Bugarski, B. (2002). Alginate - Immobilized Lipase by Electrostatic Extrusion for the Purpose of Palm Oil Hydrolysis in Lecithin/Isooctane System. *Process Biochemistry* 38 , 313-318.
- Kurashige, J., Matsuzaki, N., & Makabe, K. (1989). Modification of Fats and Oils by Lipases. *J. Dispersion Sci. Technol.* 10 , 531-559.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., & Veeger, C. (1987). Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering* , 81-87.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 , 265-275.
- Lozano, P., Diego, T. D., Carrié, D., Vaultier, M., & Iborra, J. L. (2004). Synthesis of Glycidyl Esters Catalyzed by Lipases in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 214 , 113-119.

- Mala, J. G., & Takeuchi, S. (2008). Understanding Structural Features of Microbial Lipases - An Overview. *Analytical Chemistry Insights* 3 , 9-19.
- Matsumoto, M., & Ohashi, K. (2003). Effect of Immobilization on Thermostability of Lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal* 14 , 75-77.
- Nelson, David L. & Cox, Michael M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed). 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.
- Öztürk, Banu. (2001). *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. Đzmir Institute of Technology, Turkey.
- Ozyilmaz, G., & Gezer, E. (2010). Production of Aroma Esters by Immobilized *Candida rugosa* and Porcine Pancreatic Lipase into Calcium Alginate Gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 , 140-145.
- Petersen, M. T., Fojan, P., & Petersen, S. B. (2001). How Do Lipases and Esterases Work: The Electrostatic Contribution. *Journal of Biotechnology* 85 , 115-147.
- Poerwanto, S., Hidayat, C., & Supriyadi. (2010). Sintesis Lipida Terstruktur dari Asam Laurat dan Gliserol dalam Pelarut Isooktana dengan Biokatalis Lipase *Candida rugosa*. *Reaktor* 13 , 44-50.
- Pusat Data dan Informasi Pertanian Kementerian Pertanian. (2010). Outlook Komoditas Pertanian dan Perkebunan.
- 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.
- Sugiharni, Nanik. (2010). *Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari Pseudomonas fluorescens Sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa*. Universitas Indonesia.
- Syamsul, M. W. K. (2010). *Green synthesis of lauryl palmitate via lipase-catalyzed reaction*. Faculty of Science and Technology, Universiti Sains Islam Malaysia (USIM), Malaysia.
- Tanaka, H., Matsumura, M., & Veliky, I. A. (1984). Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-alginate Gel Beads. *Biotechnol Bioeng* 26 , 53-58.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., & Haas, M. J. (2000). Customizing Lipases for Biocatalysis: A Survey of Chemical, Physical, and

Molecular Biological Approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9 , 113-148.

- Warisno. (1998). *Budidaya Kelapa Kopyor*. Kanisius: Yogyakarta.
- West, E. R., Xu, M., Woodruff, T. K., & Shea, L. D. (2007). Physical Properties of Alginate Hydrogels and Their Effects on In Vitro Follicle Development. *Biomaterials* 30 , 4439-4448.
- Won, K., Kim, S., Kim, K.-J., & Park, H. W. (2005). Optimization of Lipase Entrapment in Ca-alginat gel beads. *Process Biochemistry* 40 , 2149-2154.
- Yang, B. K., Kuo, S. J., & Parklin, K. L. (1994). Solvent Suitability for Lipase-Mediated Acyl-Transfer and Esterification Reactions in Microaqueous Milieu is Related to Substrat and Product Polarities. *Enzyme Microb. Technol.* 16 , 577-583.
- Yoo, I. S., Park, S. J., & Yoon, H. H. (2007). Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters. *J. Ind. Eng. Chem.* 13 , 1-6.
- Youchun, Y. (2001). *Enzymatic Production of Sugar Fatty Acid Esters*. Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart.
- Yu, J., Zhang, J., Zhao, A., & Ma, X. (2008). Study of Glucose Ester Synthesis by Immobilized Lipase from *Candida* sp. *Catalysis Communication* 9 , 1369-1374.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1984). Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100o C. *Science* 224 , 1249-1251.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988). The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *J. Biol. Chem.* 263 , 8017-8021.
- <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap05/lecture2.htm> (akses 7 Juni 2012)
- <http://lc.brooklyn.cuny.edu/smarttutor/corc1321/energy.html> (akses 7 Juni 2012)
- <http://www.dekindo.com/content/artikel/oleokimia.pdf>. (akses 7 Juni 2012)
- <http://www.genialab.de/inventory/alginate.htm> (akses 7 Juni 2012)
- <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fischer-esterification.shtm> (akses 7 Juni 2012)

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan BM asam lemak hidrolisat minyak kelapa

Tabel L.1.1. Komposisi asam lemak pada minyak kelapa yang digunakan

Asam Lemak	BM	Persentase	Jumlah
Kaprilat	144	7,20	10,368
Kaprat	172	8,02	13,794
Laurat	200	54,10	108,200
Miristat	228	17,40	39,672
Palmitat	256	6,64	16,998
Stearat	284	1,86	5,282
Oleat	282	3,99	11,252
Linoleat	280	0,81	2,268
Linolenat	287	0,02	0,056
		BM	207,890

Sumber: Awaliatul Barkah, (2011). *Studi reaksi esterifikasi antara asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan sukrosa menggunakan lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3*. Universitas Indonesia.

(lanjutan)

Tabel L.1.2. Komposisi asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa yang digunakan dan berdasarkan analisis BBIA

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

Lampiran 2. Perhitungan penentuan rasio bahan

1. Menentukan ρ asam lemak

Untuk menentukan ρ asam lemak digunakan piknometer berukuran 10 mL

massa asam lemak = 8,380 g

$$\rho \text{ asam lemak} = \frac{8,380 \text{ g}}{10,00 \text{ mL}} = 0,838 \text{ g/mL}$$

2. Menentukan massa glukosa

1 mL glukosa 0,100 M = 0,100 mmol glukosa

$$\text{g glukosa} = 0,100 \text{ mmol} \times \frac{180 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} = 0,018 \text{ g glukosa}$$

3. Menentukan perbandingan rasio molar glukosa (G) : asam lemak (A)

(pada G/A = 1:10 mmol)

glukosa = 0,1 mmol

$$\text{asam lemak} = 1 \text{ mmol} = \frac{\text{g}}{\text{Mr}} = \frac{\text{g}}{207,891}$$

g asam lemak = 1 mmol \times 207,891 = 0,208 g

$$\text{mL asam lemak} = \frac{\text{g}}{\rho} = \frac{0,208}{0,838} = 0,25 \text{ mL}$$

4. Menentukan massa enzim bebas untuk pendahuluan esterifikasi (pada G/A = 1:60)

5% berat substrat

$$= \frac{5}{100} \times (\text{g glukosa} + \text{g asam lemak})$$

$$= \frac{5}{100} \times (0,018 \text{ g glukosa} + 1,247 \text{ g asam lemak})$$

$$= 0,063 \text{ g}$$

(lanjutan)

5. Menentukan volume pelarut (pada G/A = 1:60)

= volume glukosa + volume asam lemak

= 1,00 mL glukosa + 1,50 mL asam lemak

= 2,50 mL

6. Menentukan berat enzim (E) dan Na-alginat (A) untuk imobilisasi (pada konsentrasi alginat 2%)

$$2\% = \frac{\text{g alginat}}{8 \text{ mL}}$$

$$0,020 = \frac{\text{g alginat}}{8}$$

$$\text{g alginat} = 0,020 \times 8 = 0,160 \text{ g}$$

$$\text{rasio E/A} = 0,125$$

$$0,125 = \frac{\text{g enzim}}{\text{g alginat}} = \frac{\text{g enzim}}{0,160}$$

$$\text{g enzim} = 0,020 \text{ g} = 20 \text{ mg}$$

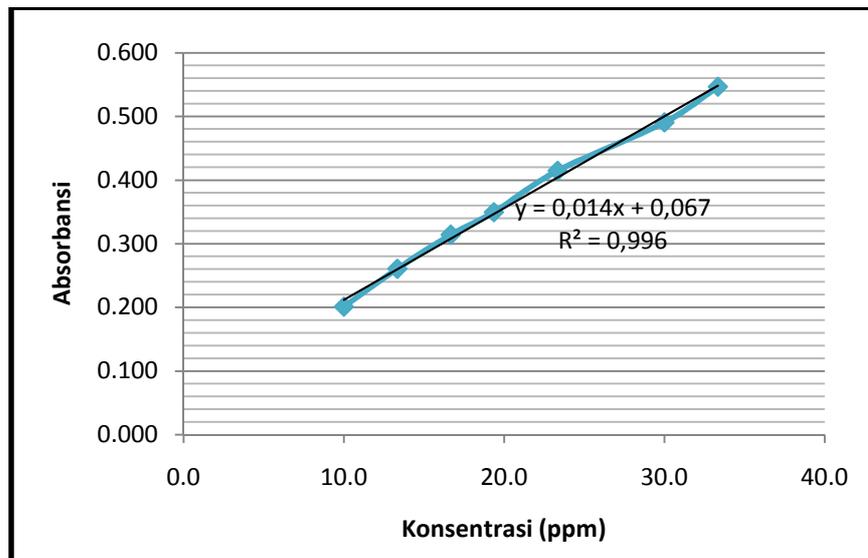
Lampiran 3. Data penentuan konsentrasi protein dengan metode Lowry

Tabel L.3.1. Komposisi larutan untuk penentuan kadar protein metode Lowry

Zat	Blanko	Standar							Sampel
		1	2	3	4	5	6	7	
BSA 400 ppm (mL)	-	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,45	0,50	
Sampel (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50
H ₂ O (mL)	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-
Pereaksi Lowry (mL)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Kocok, diamkan selama 10 menit dan langsung ditambahkan									
Folin Ciocalteu 1 N (mL)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Inkubasi larutan selama 30 menit									

Tabel L.3.2. Hubungan konsentrasi dan absorbansi dari metode lowry

Larutan	Absorbansi	Konsentrasi
Blanko air	0,109	
Kontrol alginat 1%	0,104	
Kontrol alginat 1.5%	0,122	
Kontrol alginat 2%	0,117	
Kontrol CaCl ₂	0,050	
Kontrol Tris-HCl buffer	0,070	
Larutan Standar BSA	0,201	10,0
	0,261	13,3
	0,314	16,7
	0,350	19,4
	0,415	23,3
	0,491	30,0
	0,547	33,3
Larutan alginat 1% + enzim	0,222	11,1
Larutan alginat 1,5% + enzim	0,328	18,6
Larutan alginat 2% + enzim	0,405	24,1
Larutan filtrat 1%	0,109	3,0
Larutan filtrat 1,5%	0,086	1,4
Larutan filtrat 2%	0,073	0,4



Grafik Kurva Standar BSA Metode Lowry

Tabel L.3.3. Perhitungan % loading

Konsentrasi Alginat (%)	C_i (ppm)	V_i (mL)	C_f (ppm)	V_f (mL)	$\frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100$ (%)
1,0	11,1	9	3,0	20	40,5
1,5	18,6	9	1,4	20	83,8
2,0	24,1	9	0,4	20	96,1

Tabel L.3.4. Perhitungan berat lipase bebas per g lipase imobil

Konsentrasi Alginat (%)	Berat Enzim yang Dipakai (mg)	% Loading (%)	Berat Rata-rata Lipase Imobil Diperoleh (g)	Berat Lipase Bebas / g Lipase Imobil (mg)
1,0	10	40,5	2,56	1,58
1,5	15	83,8	3,99	3,15
2,0	20	96,1	6,96	2,76

Lampiran 4. Data penentuan aktivitas lipase bebas dan lipase imobil Ca-alginat dengan metode titrimetri

Tabel L.4.1. Perhitungan nilai aktivitas spesifik

Enzim	Minyak Kelapa (mL)	V NaOH (mL)			N NaOH (M)	Waktu (menit)	Aktivitas (U)	Berat Enzim Bebas (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	% Imob (%)
		B	1	2						
Lipase bebas	0,43	6,05	22,50	23,10	0,050	60	35,26	15,20	2,32	-
Lipase Imobil 1%	0,44	3,20	3,70	3,85	0,095	60	2,26	1,58	1,43	61,66
Lipase Imobil 1,5%	0,44	3,20	3,90	4,25	0,095	60	3,45	3,15	1,09	47,09
Lipase Imobil 2%	0,44	3,20	4,80	4,70	0,095	150	2,44	2,76	0,88	38,11

Lampiran 5. Data titrasi asam lemak sisa variasi suhu inkubasi

Tabel L.5.1. Data variasi suhu inkubasi

Suhu (°C)	Erlenmeyer	Vol. NaOH (mL)	Molaritas NaOH (M)	Konversi (%)
30	Blanko	17,60	0,2085	0,70
	S 1	17,40		
	S 2	17,45		
	S 3	17,35		
35	Blanko	17,75	0,2227	1,02
	S 1	17,45		
	S 2	17,50		
40	Blanko	17,90	0,2227	0,32
	S 1	17,80		
	S 2	17,80		
45	Blanko	17,40	0,2273	0,37
	S 1	17,30		
	S 2	17,30		
	S 3	17,35		

Lampiran 6. Data titrasi asam lemak sisa variasi rasio glukosa/asam lemak

Tabel L.6.1. Data variasi rasio mol substrat

Rasio G/A (mmol)	Erlenmeyer	Vol. NaOH (mL)	Molaritas NaOH (M)	Konversi (%)
1:10	Blanko	14,40	0,0507	0,89
	S 1	14,15		
	S 2	14,30		
1:30	Blanko	38,30	0,0475	0,91
	S 1	37,75		
	S 2	37,70		
1:60	Blanko	74,65	0,0507	1,60
	S 1	72,75		
	S 2	72,65		
	S 3	72,85		
1:90	Blanko	122,45	0,0475	1,28
	S 1	119,90		
	S 2	120,15		

Lampiran 7. Data titrasi asam lemak sisa variasi waktu inkubasi

Tabel L.7.1. Data variasi waktu inkubasi

Waktu (jam)	Erlenmeyer	Vol. NaOH (mL)	Molaritas NaOH (M)	Konversi (%)
4	Blanko	17,75	0,2227	1,02
	S 1	17,45		
	S 2	17,50		
8	Blanko	74,65	0,0507	1,60
	S 1	72,75		
	S 2	72,65		
	S 3	72,85		
16	Blanko	40,60	0,0958	3,94
	S 1	38,00		
	S 2	38,30		
	S 3	38,10		
32	Blanko	43,80	0,0955	2,81
	S 1	42,20		
	S 2	41,60		
	S 3	42,30		

Lampiran 8. Data titrasi asam lemak sisa variasi berat *molecular sieve*

Tabel L.8.1. Data variasi berat *molecular sieve*

Berat MS (gr)	Erlenmeyer	Vol. NaOH (mL)	Molaritas NaOH (M)	Konversi (%)
0	Blanko	41,10	0,0958	4,10
	S 1	38,50		
	S 2	38,60		
	S 3	38,50		
0,1	Blanko	40,60	0,0958	3,94
	S 1	38,00		
	S 2	38,30		
	S 3	38,10		
0,4	Blanko	42,90	0,0955	2,39
	S 1	41,50		
	S 2	41,30		
	S 3	41,40		
0,7	Blanko	40,90	0,0955	1,43
	S 1	40,25		
	S 2	39,90		
	S 3	39,85		

Lampiran 9. Data spesifikasi lipase *Candida rugosa*

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis http://buchpsrv05.europe.stal.com/anpr/cofa3.php?az_charge=1298612...

SIGMA-ALDRICH



Fluka
Analytical

Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449

Certificate of Analysis

Product Name:	LIPASE CANDIDA RUGOSA	
Product Number:	90860	
Product Brand:	Fluka	
Molecular Formula:		
Molecular Mass:		
CAS Number:	9001-62-1	

TEST	SPECIFICATION	LOT 1298612 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO SLIGHTLY BEIGE	SLIGHTLY BEIGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO POWDER WITH LUMPS	POWDER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO FAINTLY BROWN	SLIGHTLY YELLOW (Y4)
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR (VISUAL)	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	-	5 MG/ML H ₂ O
ENZYMATIC ACTIVITY	> 2.0 U/MG	2.45 U/MG 1 U CORRESPONDS TO THE AMOUNT OF ENZYME WHICH LIBERATES 1 UMOL OLEIC ACID PER MINUTE AT PH 8.0 AND 40 DEG C (TRIOLEIN, FLUKA NO. 62314, AS SUBSTRATE)

QC RELEASE DATE	13/JUL/06
RECOMMENDED RETEST DATE	JUN/12



Edeltraud Schwärzler, Manager
Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, additional lot specific tests may be included for further information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

1 of 1
10/11/2010 17:28

Lampiran 10. Data analisis kandungan asam lemak minyak kelapa

	<p>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</p>	 <small>Konita Akreditasi Nasional Laboratorium Penguji LP-057-10N</small>
<p>Kepada : To: DEPARTEMEN KIMIA UI KAMPUS UI DEPOK</p>		
<p>LAPORAN HASIL UJI <i>TEST REPORT</i></p>		
<p>Balasan surat/ Pemintaan tanggal : - <i>Reply to your letter/ request dated</i></p>	<p>Nomor / Number : 11528.LHUB/ABICAL.1 / XI / 2010 Nomor Analisis <i>Analysis Number</i> : 12653 dan 12654 Nomor Seri <i>Serial Number</i> : 11528 Halaman : 1 dari / of 2 Tanggal penerbitan : 19 Nopember 2010 <i>date of issue</i></p>	
<p>Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian <i>The undersigned attests that the testing of</i></p>		
<p>Contoh : Minyak Goreng Kode A & B <i>Sample (s)</i></p> <p>Untuk analisis : Kimia <i>for analysis</i></p> <p>Keterangan contoh : Dikemas dalam botol <i>Description of sample</i></p> <p>Diambil dari : - <i>Taken from</i></p> <p>Oleh : - <i>by</i></p> <p>Tanggal penerimaan contoh : 25 Oktober 2010 <i>Date of sample</i></p> <p>Tanggal pelaksanaan analisis : 26 Oktober 2010 <i>Date of analysis</i></p> <p>Pengambilan contoh : - <i>Sampling</i></p> <p>adalah sebagai berikut : <i>The result is as follows</i></p>		
<p>FAD.04a</p>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH TERSEBUT DIATAS. PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.</p> </div>

(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 :				G C
Kaprilat (C8)	%	0,09	7,20	
Kaprat (C10)	%	0,13	8,02	
Laurat (C12)	%	0,51	54,1	
Miristat (C14)	%	1,24	17,4	
Palmitat (C16-0)	%	35,5	6,64	
Stearat (C18-0)	%	2,82	1,86	
Asam lemak tidak jenuh :				G C
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

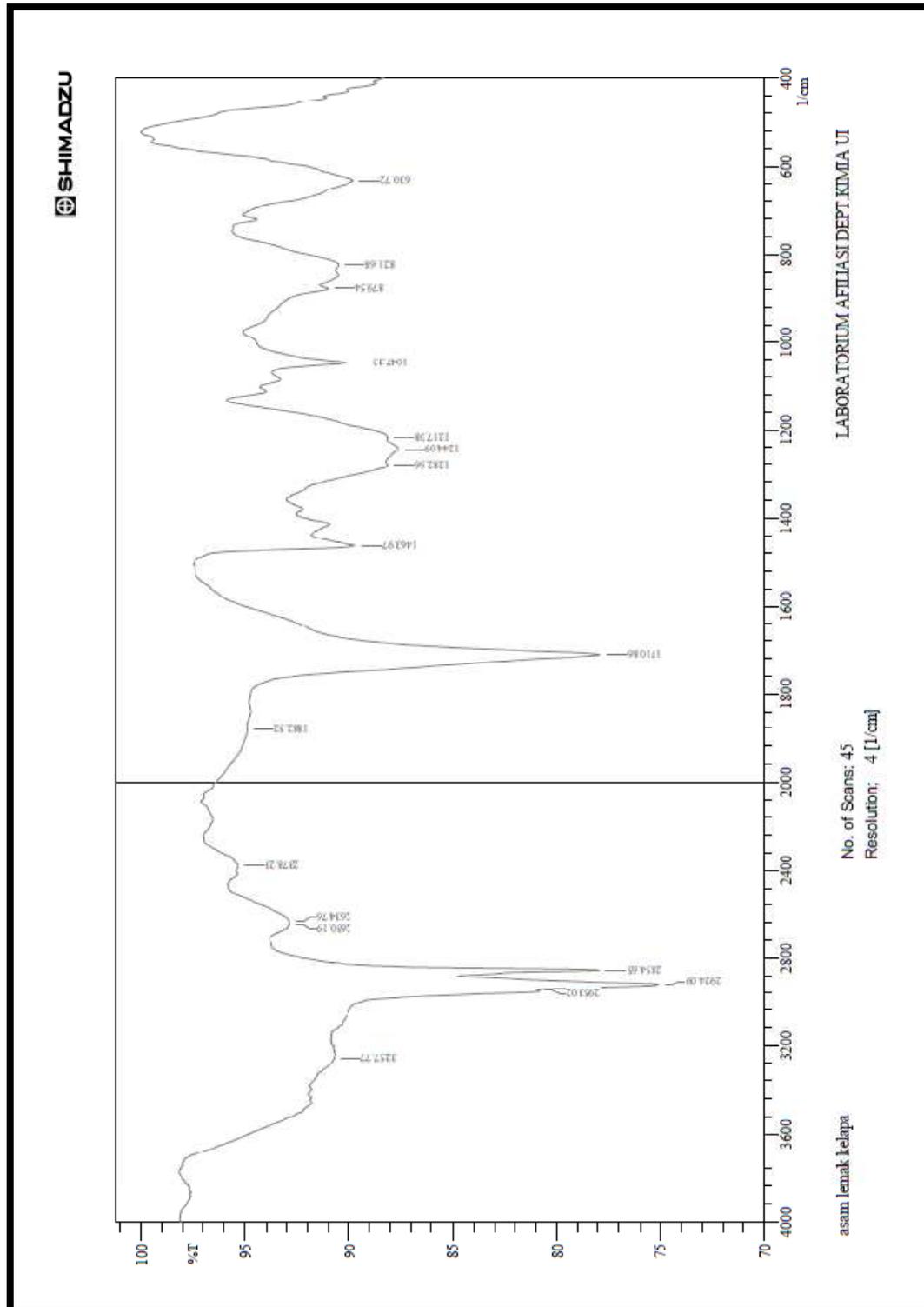
(Mulhaquddin S. M.Si)

es/ef

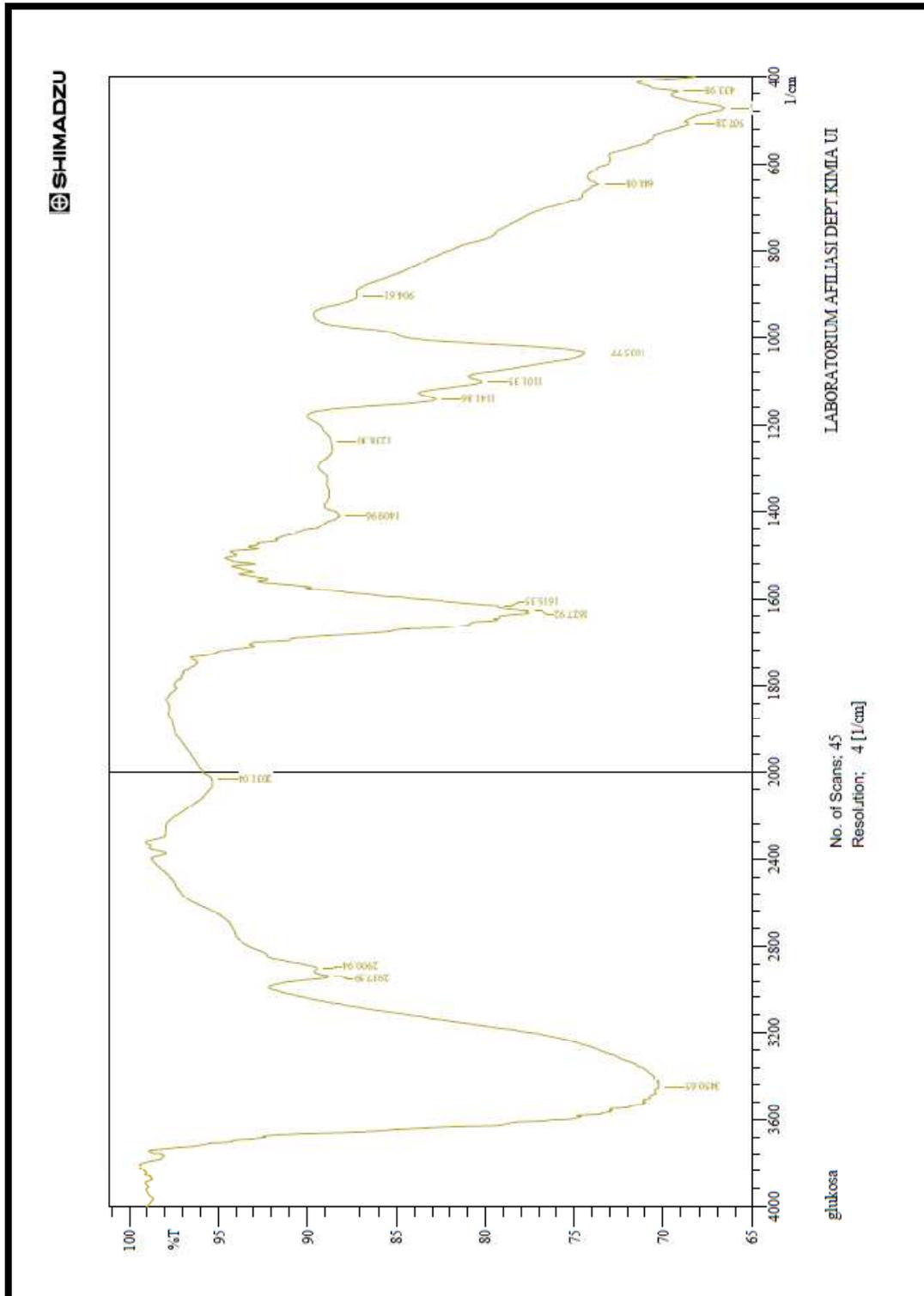
HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS.
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.

FAD 04a

Lampiran 11. Spektrum FT-IR asam lemak minyak kelapa



Lampiran 12. Spektrum FT-IR glukosa



Lampiran 13. Spektrum FT-IR ester glukosa hasil sintesis menggunakan lipase *Candida rugosa*

