



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN KINERJA BIOKATALIS YANG DIIMOBILISASI
MELALUI METODE *ENTRAPMENT* MENGGUNAKAN
MEDIUM *SUPPORT* DARI KITIN, KITOSAN, DAN ZEOLIT
UNTUK SINTESIS BIODIESEL RUTE NON-ALKOHOL**

SKRIPSI

INTAN AFRIDAWATY SIPANGKAR

0806333184

DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA

FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA

DEPOK

JUNI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN KINERJA BIOKATALIS
YANG DIIMOBILISASI MELALUI METODE *ENTRAPMENT*
MENGUNAKAN MEDIUM *SUPPORT* DARI KITIN,
KITOSAN, DAN ZEOLIT UNTUK SINTESIS BODIESEL
RUTE NON-ALKOHOL**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik

INTAN AFRIDAWATY SIPANGKAR

0806333184

DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA

FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA

DEPOK

JUNI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Intan Afridawaty Sipangkar

NPM : 0806333184

Tanda Tangan : 

Tanggal : 25 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Intan Afridawaty Sipangkar
NPM : 0806333184
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi :

Perbandingan Kinerja Biokatalis Yang Diimobilisasi Melalui Metode *Entrapment* Menggunakan Medium *Support* Dari Kitin, Kitosan, Dan Zeolit Untuk Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Heri Hermansyah, S.T., M.Eng. (..........)
Penguji I : Dr. Muhamad Sahlan, S.Si., M.Eng (..........)
Penguji II : Rita Arbianti, ST., MT (..........)
Penguji III : Dr. Ir. Setiadi, M. Eng (..........)

Ditetapkan di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Tanggal : 19 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Pertama-tama, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah mendampingi penulis dalam pembuatan buku skripsi ini. Berkat penyertaan-Nya, penulis dapat menyelesaikan buku skripsi dengan judul “Perbandingan Kinerja Biokatalis Yang Diimobilisasi Melalui Metode *Entrapment* Menggunakan Medium *Support* Dari Kitin, Kitosan, Dan Zeolit Untuk Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol” untuk memenuhi salah satu syarat dalam mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

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


1. Prof. Dr. Widodo Wahyu Purwanto, DEA sebagai Ketua Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia
2. Dr. Ir. Nelson Saksono MT sebagai pembimbing akademik yang selalu membantu segala permasalahan akademik selama perkuliahan.
3. Semua Dosen Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia yang telah mengarahkan, membimbing, dan memberikan ilmu yang sangat berguna bagi penulis.
4. Keluarga tercinta, khususnya Mama yang telah rela meluangkan waktu menjenguk ketika sakit, yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan baik dalam hal materil dan non-materil kepada penulis.
5. Stefvy Chandra, *my bestie ever after*, teman terbaik yang selalu ada dalam segala suasana, suka maupun duka. *I don't know how I pass this moment without you girl.*
6. David Gongora, teman yang telah memberikan kenangan penuh warna selama perkuliahan dan memberikan semangat melalui hal-hal yang sederhana.
7. Matius Wisnu, teman yang sudah membantu penulis dalam banyak hal.

8. Teman-teman satu bimbingan : Daudi, Merisa, Eldo, Khotib, Mondy dan Renly atas segala bantuan, diskusi, dan keceriaannya selama ini.
9. Resiana Winata, cici pirang nan bijaksana yang sudah memberikan semangat dan menjadi pendengar yang baik atas keluhan-keluhan penulis.
10. Catur Vinaya, teman penghangat suasana yang dengan baik hati meminjamkan scanners, membantu penulis dalam scan data-data hasil HPLC dan juga mau mendengar permasalahan sekaligus memberikan saran kepada penulis.
11. Romo Yumartana dan Kak Renuk yang selalu memberikan bimbingan rohani selama ini.
12. Jacquin, Togar, dan Gabriel yang selalu membagikan semangat dan mengingatkan penulis untuk menyicil buku skripsi ini.
13. Andry Prasthio yang bersedia memberikan zeolitnya secara gratis.
14. Maylen dan Indriani Mukti yang membuat saat-saat makan siang penulis begitu berwarna dan menyenangkan.
15. Monica Wijaya dan Claudia Young, *thank you for everything that we've spent together*.
16. Antonius Erick, Julian Siahaan, dan Mangasih yang sudah membantu membawa *shaking water bath* ke lantai 4.
17. Florensia Inden dan Syifa yang sudah bersedia mengambil sampel HPLC penulis di Serpong.
18. Mang Ijal yang bersedia memperbaiki *shaking water bath* dan Mas Eko yang bersedia pulang terlambat karena menunggu penulis mengembalikan Vortex.
19. Mr. David Smith dan Mr. Tom, *my mood boosters*, yang selalu memberikan keceriaan ketika suasana hati kurang begitu baik.
20. Teman-teman satu laboratorium rekayasa bioproses atas kerja sama dan bantuan yang telah diberikan.
21. Teman-teman Program Studi Teknik Kimia 2008 dan Teknik Bioproses 2008 atas suasana akademis dan kemahasiswaan yang telah mendukung selama ini.

22. Angkatan 2007, 2009, 2010 dan 2011 Teknik Kimia atas segala bantuannya.
23. Teman-teman kosan Pondok Kerria, Hani, Ella, Olla, Ewi, Erwin dan Fajar, yang membuat suasana kosan terasa nyaman sehingga penulis betah mengerjakan buku skripsi ini di kosan.
24. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini secara langsung maupun tidak langsung;

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, oleh karena itu, saran dan kritik yang konstruktif sangat penulis harapkan demi perbaikannya untuk menyempurnakan skripsi ini.

Depok, 25 Juni 2012



Penulis

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

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

Nama : Intan Afridawaty Sipangkar
NPM : 0806333184
Program Studi : Teknik Kimia
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

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

**Perbandingan Kinerja Biokatalis Yang Diimobilisasi Melalui Metode
Entrapment Menggunakan Medium Support Dari Kitin, Kitosan, Dan Zeolit
Untuk Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/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, Jawa Barat, Indonesia
Pada tanggal : 25 Juni 2012

Yang menyatakan



(Intan Afridawaty Sipangkar)

ABSTRAK

Nama : Intan Afridawaty Sipangkar

Program studi : Teknik Kimia

Judul : Perbandingan Kinerja Biokatalis Yang Diimobilisasi Melalui Metode *Entrapment* Menggunakan Medium *Support* Dari Kitin, Kitosan, Dan Zeolit Untuk Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol

Salah satu sumber energi alternatif ramah lingkungan yang berpotensi dalam mengatasi krisis energi yang terjadi di dunia adalah biodiesel. Umumnya produksi biodiesel mempergunakan proses teknik kimia konvensional yang memiliki kelemahan dalam penggunaan energi dan pembentukan produk samping yang tidak dikehendaki. Oleh karena itu, dikembangkan proses enzimatik melalui rute non-alkohol. Pada penelitian ini, biodiesel akan disintesis melalui interesterifikasi antara substrat minyak jelanta dan metil asetat dengan perbandingan 1:12 pada sistem *batch* dengan kondisi suhu 37°C, shaker 150 rpm dan pada sistem kontinu menggunakan reaktor packed bed berukuran ID 11 mm dan panjang 150 mm. Interesterifikasi ini dikatalis dengan enzim *Candida rugosa* lipase. Karena alasan teknis dan ekonomi, lipase diimobilisasi melalui metode *entrapment* pada *support* kitin, kitosan dan zeolit. Variasi yang akan dilakukan adalah variasi rasio massa kitin dan kitosan sebagai *support* terhadap lipase, waktu imobilisasi kitin dan kitosan, konsentrasi *sodium tripolyphosphate* (TPP) dalam proses gelasi *support* kitin dan *support* kitosan dan variasi perbandingan enzim dan *support* pada imobilisasi dengan *support* zeolit. Enzim *loading* terbesar dihasilkan melalui *entrapment* dengan *support* kitosan. Enzim *loading* yang dihasilkan adalah 97,24%. *Yield* biodiesel terbesar yang dihasilkan pada reaktor *batch* berasal dari sintesis biodiesel dengan *support* zeolit sebesar 99,79%. Dan pada reaktor kontinu, stabilitas lipase terbaik dihasilkan dari lipase terimobilisasi dalam *support* kitosan.

Kata Kunci : *biodiesel*, *entrapment*, *Candida rugosa*, *batch*, kontinu

ABSTRACT

Name : Intan Afridawaty Sipangkar

Study Program: Chemical Engineering

Title : The Comparison of Immobilized Biocatalyst Performance by Entrapment Method Using Medium Support on Chitin, Chitosan, and Zeolite for Non-Alcohol Route of Biodiesel Synthesis

One of the alternative energy sources that are environmentally friendly potentially to overcome energy crisis in the world is biodiesel. Generally, biodiesel production process use conventional chemical techniques, which has disadvantages related to energy use and formation of unwanted byproducts. Therefore, the enzymatic process non-alcohol route developed. In this research, biodiesel will be synthesized by interesterification process between waste cooking oil as substrate and methyl acetate with ratio 1:12 in batch system with the conditions of 37° C, shaker at 150 rpm and continuous system using a packed bed reactor sized 11 mm ID and 150 mm long. This reaction is catalyzed by *Candida rugosa* lipase enzyme. Because of technical and economic reasons, lipase will be immobilized by entrapment methods on chitin, chitosan and zeolite as supports. The variations in this research are mass ratio of chitin and chitosan as supports for lipase, immobilization time on chitin and chitosan, tripolyphosphate (TPP) concentration in gelation process of chitin and chitosan, and variation of comparison between enzyme and support in immobilization on zeolite. The largest enzyme loading produced by entrapment in the chitosan support. The resulting enzyme loading was 97.24%. And the largest yield of biodiesel produced in batch reactors from the synthesis of biodiesel by zeolite, which is 99.79%. And from the continuous system, the best stability produced from immobilized on chitosan.

Keyword : biodiesel, entrapment, *Candida rugosa* lipase, batch, continuous

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB I	
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II	
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biodiesel.....	5
2.1.1 Keuntungan Pemakaian Biodiesel	5
2.1.2 Bahan Baku Biodiesel.....	6
2.1.3 Sintesis Biodiesel	7

2.1.3.1 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi	7
2.1.3.2 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Katalis Basa	8
2.1.3.3 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Katalis Asam.....	9
2.1.3.4 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Katalis Alkali ...	9
2.1.3.5 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Biokatalis	10
2.1.3.6 Sintesis Biodiesel Melalui Rute Non-Alkohol.....	10
2.2 Metil Ester Asam Lemak Sebagai Komponen Biodiesel.....	11
2.3 Minyak Kelapa Sawit.....	13
2.3.1 Komposisi Trigliserida dalam Minyak Kelapa Sawit.....	13
2.3.2 Fraksi Stearin dalam Minyak Kelapa Sawit	14
2.4 Enzim	15
2.4.1 Fungsi dan Cara Kerja Enzim	15
2.4.2 Klasifikasi Enzim	17
2.4.3 Lipase.....	19
2.4.3.1 Sumber Lipase.....	19
2.4.3.2 Struktur Lipase.....	20
2.4.3.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim Lipase	21
2.5 Imobilisasi Enzim	23
2.5.1 <i>Carrier-Binding</i>	24
2.5.2 <i>Entrapment</i>	25
2.5.3 <i>Cross-Linking</i>	27
2.6 Kitin	28
2.6.1 Kegunaan Kitin	29
2.7 Kitosan	30
2.7.1 Proses Pembuatan Kitosan.....	30
2.7.2 Kegunaan Kitosan.....	31

2.8 Zeolit	32
2.8.1 Struktur Zeolit	34
2.8.2 Jenis-jenis Zeolit	37
2.8.3 Sifat Zeolit	39
2.9 <i>State of the Art</i>	42
2.9.1 Imobilisasi Lipase dengan Metode <i>Entrapment</i>	42
2.9.2 Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dengan Lipase Terimobilisasi	44
 BAB III	
METODOLOGI PENELITIAN.....	45
3.1 Model Penelitian	45
3.2 Variabel	46
3.3 Alat dan Bahan.....	46
3.4 Prosedur Penelitian.....	48
3.4.1 Imobilisasi Biokatalis Menggunakan Metode <i>Entrapment</i>	48
3.4.1.1 Pra-Imobilisasi Lipase.....	49
3.4.1.2 Imobilisasi Lipase dengan <i>Support</i> Kitin.....	50
3.4.1.3 Imobilisasi Lipase dengan <i>Support</i> Kitosan	50
3.4.1.4 Imobilisasi Lipase dengan <i>Support</i> Zeolit	51
3.4.1.5 Kurva Kalibrasi Standar	52
3.4.1.6 Pengukuran Enzim <i>Loading</i>	54
3.4.2 Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor <i>Batch</i>	55
3.4.3 Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor Kontinyu.....	56
3.4.3.1 Set Up Reaktor Kontinyu	56
3.4.3.2 Sintesis Biodiesel dalam Reaktor Kontinyu	57
3.4.4 Variasi	58
3.4.5 Analisa	60

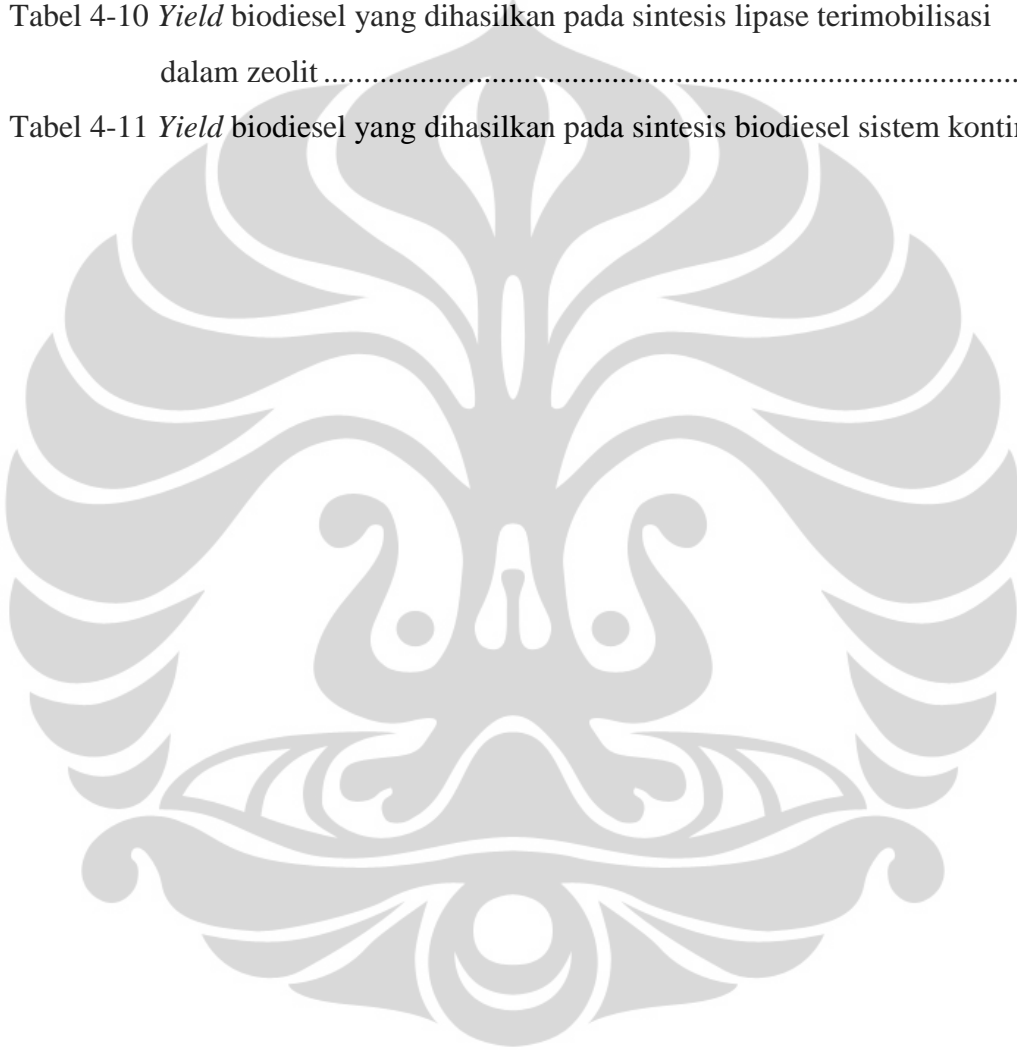
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN.....	63
4.1 Hasil Imobilisasi Biokatalis Metode <i>Entrapment</i>	63
4.1.1 Hasil <i>Entrapment</i> dalam Kitin	63
4.1.1.1 Efek Variasi Massa	65
4.1.1.2 Efek Variasi Waktu.....	67
4.1.1.3 Efek Variasi Konsentrasi TPP	68
4.1.2 Hasil <i>Entrapment</i> dalam Kitosan	69
4.1.2.1 Efek Variasi Massa	70
4.1.2.2 Efek Variasi Waktu.....	72
4.1.2.3 Efek Variasi Konsentrasi TPP	73
4.1.3 Hasil <i>Entrapment</i> dalam Zeolit.....	74
4.2 Hasil Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor <i>Batch</i>	76
4.2.1 Sintesis Biodiesel dengan Lipase Terimobilisasi dalam Kitin.....	78
4.2.2 Sintesis Biodiesel dengan Lipase Terimobilisasi dalam Kitosan	81
4.2.3 Sintesis Biodiesel dengan Lipase Terimobilisasi dalam Zeolit	83
4.3 Hasil Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor Kontinyu	85
BAB V	
KESIMPULAN DAN SARAN.....	89
5.1 Kesimpulan	89
5.2 Saran.....	90
DAFTAR PUSTAKA	91
LAMPIRAN.....	96

DAFTAR TABEL

Tabel 2- 1 Beberapa sumber minyak nabati yang dipakai sebagai bahan baku biodiesel (Direktorat Pengolahan Hasil Pertanian, 2010)	6
Tabel 2- 2 Syarat mutu biodiesel ester alkil (Direktorat Jenderal Listrik dan Pemanfaatan Energi Departemen Pertambangan dan Energi, 2005)	12
Tabel 2- 3 Komposisi trigliserida pada minyak kelapa sawit (Salunkhe, 1992).....	14
Tabel 2- 4 Kandungan asam lemak dari minyak sawit dan beberapa minyak nabati lainnya (Salunkhe, 1992).....	14
Tabel 2- 5 Persentase kadar enzim dari beberapa sumber lipase (Rini Handayani, 2005).....	19
Tabel 2- 6 Klasifikasi mineral zeolit (Togar, 2012).....	33
Tabel 2- 7 Klasifikasi zeolit berdasarkan rasio Si/Al (Togar, 2012)	38
Tabel 2- 8 Kapasitas tukar kation mineral zeolit (Togar, 2012)	41
Tabel 2- 9 Urutan selektifitas pertukaran ion pada beberapa jenis zeolit (Togar, 2012).....	41
Tabel 2-10 <i>State of the art</i> imobilisasi lipase dengan metode <i>entrapment</i>	43
Tabel 2-11 <i>State of the art</i> sintesis biodiesel dengan lipase yang diimobilisasi melalui metode <i>entrapment</i>	44
Tabel 3- 1 Alat yang digunakan dalam penelitian	46
Tabel 3- 2 Bahan yang digunakan dalam penelitian	48
Tabel 3- 3 Perbandingan volum untuk larutan buffer	49
Tabel 3- 4 Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi standar ...	53
Tabel 3- 5 Variasi yang dilakukan dalam penelitian.....	59
Tabel 3- 6 Data standar HPLC untuk sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol	60
Tabel 4- 1 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> kitin dengan variasi rasio massa.....	65
Tabel 4- 2 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> kitin dengan variasi waktu imobilisasi	66
Tabel 4- 3 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> kitin dengan variasi konsentrasi TPP	68
Tabel 4- 4 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> kitosan dengan variasi rasio massa.....	70
Tabel 4- 5 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> kitosan dengan variasi waktu imobilisasi...	72

Tabel 4- 6 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> kitosan dengan variasi konsentrasi TPP	73
Tabel 4- 7 Enzim <i>loading</i> pada <i>support</i> zeolit dengan variasi % massa enzim.....	75
Tabel 4- 8 <i>Yield</i> biodiesel yang dihasilkan pada sintesis lipase terimobilisasi dalam kitin.....	79
Tabel 4-9 <i>Yield</i> biodiesel yang dihasilkan pada sintesis lipase terimobilisasi dalam kitosan.....	83
Tabel 4-10 <i>Yield</i> biodiesel yang dihasilkan pada sintesis lipase terimobilisasi dalam zeolit	84
Tabel 4-11 <i>Yield</i> biodiesel yang dihasilkan pada sintesis biodiesel sistem kontinyu .	86



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2- 1 Reaksi transesterifikasi trigliserida (Demirbas, 2008).....	8
Gambar 2- 2 Mekanisme reaksi sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol (Demirbas, 2008).....	10
Gambar 2- 3 Proses penguraian substrat oleh suatu enzim (Poedjiadi, 1994).....	16
Gambar 2- 4 Struktur molekul enzim lipase tiga dimensi	20
Gambar 2- 5 Reaksi hidrolisis enzim lipase.....	21
Gambar 2- 6 Metode imobilisasi enzim dengan <i>carrier-binding</i> (Daudi, 2012).....	24
Gambar 2- 7 <i>Entrapment</i> dengan a) <i>gel (fiber entrapping)</i> b) <i>microencapsulation</i> (Bestari, 2012)	25
Gambar 2- 8 Metode imobilisasi enzim dengan <i>microencapsulation (membrane entrapment)</i> (Bestari, 2012).....	26
Gambar 2- 9 Metode imobilisasi enzim dengan <i>cross-linking</i> (Daudi, 2012).....	28
Gambar 2-10 Struktur kitin (Muzarelli, 1985).....	28
Gambar 2-11 Struktur kitosan (Muzarelli, 1985).....	30
Gambar 2-12 Struktur asam-basa Bronstead Si/Al (Togar, 2012).....	34
Gambar 2-13 Struktur asam-basa Bronstead Si/Al (Togar, 2012).....	35
Gambar 2-14 Bentuk tetrahedron silika atau alumina (Togar, 2012)	36
Gambar 2-15 Unit pembentuk sekunder (Togar, 2012).....	36
Gambar 3- 1 Diagram alir prosedur penelitian	45
Gambar 3- 2 Diagram alir percobaan imobilisasi metode <i>entrapment</i>	49
Gambar 3- 3 Prosedur konsentrasi enzim terimobilisasi.....	54
Gambar 3- 4 Ilustrasi percobaan sintesis biodiesel dalam reaktor <i>batch</i>	55
Gambar 3- 5 Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem <i>batch</i>	55
Gambar 3- 6 Skema alat yang digunakan untuk sintesis biodiesel secara kontinyu (Ayu, 2009).....	56
Gambar 3- 7 <i>Set up</i> reaktor kontinyu	57
Gambar 3- 8 Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu	58

Gambar 3- 7 <i>Set up</i> reaktor kontinyu	57
Gambar 3- 8 Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu.....	58
Gambar 4- 1 Campuran larutan enzim dan <i>support</i> dalam TPP	64
Gambar 4- 2 Lipase terimobilisasi dalam kitin	65
Gambar 4- 3 Hasil enzim <i>loading</i> dengan <i>support</i> kitin pada variasi rasio massa	66
Gambar 4- 4 Hasil enzim <i>loading</i> dengan <i>support</i> kitin pada variasi waktu imobilisasi.....	67
Gambar 4- 5 Hasil enzim <i>loading</i> dengan <i>support</i> kitin pada variasi konsentrasi TPP	69
Gambar 4- 6 Campuran larutan enzim dan larutan <i>support</i> (a) awal penetasan dalam larutan TPP (b) setelah penetasan beberapa menit dalam larutan TPP	70
Gambar 4- 7 Hasil enzim <i>loading</i> dengan <i>support</i> kitosan pada variasi rasio massa	71
Gambar 4- 8 Hasil enzim <i>loading</i> dengan <i>support</i> kitosan pada variasi waktu imobilisasi.....	73
Gambar 4- 9 Hasil enzim <i>loading</i> dengan <i>support</i> kitosan pada variasi konsentrasi TPP	74
Gambar 4-10 Prosedur percobaan (a) inkubasi dalam <i>water bath</i> (b) filtrasi lipase terimobilisasi dalam larutan	75
Gambar 4-11 Hasil enzim <i>loading</i> pada imobilisasi dengan <i>support</i> zeolit	76
Gambar 4-12 Lipase terimobilisasi (a) dalam <i>support</i> kitosan (b) dalam <i>support</i> zeolit	77
Gambar 4-13 Sintesis biodiesel dalam reaktor <i>batch</i> (a) minyak jelanta, metil asetat dan lipase terimobilisasi yang dicampurkan dalam Scotch Duran (b) reaksi interesterifikasi pada suhu 37°C dalam <i>shaking water bath</i>	78
Gambar 4-14 Konsentrasi masing-masing komponen dalam reaksi sintesis biodiesel menggunakan <i>support</i> kitin.....	78
Gambar 4-15 <i>Yield</i> biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam kitin	80

Gambar 4- 16	Konsentrasi masing-masing komponen dalam reaksi sintesis biodiesel menggunakan <i>support</i> kitosan	81
Gambar 4- 17	<i>Yield</i> biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan	82
Gambar 4- 18	Konsentrasi masing-masing komponen dalam reaksi sintesis biodiesel menggunakan <i>support</i> zeolit	84
Gambar 4- 19	<i>Yield</i> biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam zeolit.....	85
Gambar 4-20	Sintesis biodiesel dalam reaktor kontinyu (a) minyak jelanta, metil asetat dan lipase terimobilisasi pada reaktor <i>packed bed</i> skala lab (b) keseluruhan proses sintesis biodiesel dalam reaktor kontinyu	78
Gambar 4- 21	<i>Yield</i> biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel sistem kontinyu dengan lipase terimobilisasi dalam kitin.....	87
Gambar 4- 22	<i>Yield</i> biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel sistem kontinyu dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan.....	87
Gambar 4- 23	<i>Yield</i> biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel sistem kontinyu dengan lipase terimobilisasi dalam zeolit	88

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Data Kromatogram Hasil Analisa HPLC	96
Lampiran 2: Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar	163



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Krisis energi yang terjadi di dunia akhir-akhir ini menuntut masyarakat dan pemerintah untuk mencari energi alternatif yang ramah lingkungan. Proporsi minyak bumi sebagai sumber utama energi mencapai 40% dari total permintaan energi dunia, namun cadangannya terus berkurang. Pada tahun 2011 pertumbuhan permintaan minyak bumi dunia akan mencapai 1,7% sementara peningkatan produksi hanya mencapai 0,9%. Keadaan ini menyebabkan negara-negara termasuk Indonesia rentan terhadap risiko terjadinya krisis energi dunia.

Cadangan minyak bumi terbukti saat ini di Indonesia diperkirakan 9 milyar barel, dengan tingkat produksi rata-rata 0,5 milyar barel per tahun, sehingga diperkirakan cadangan minyak akan habis dalam waktu 18 tahun. Untuk menyikapi ancaman krisis energi dimasa mendatang dan mengoptimalkan potensi sumber energi nasional, konsep ketahanan energi menjadi sangat penting bagi Indonesia. Untuk itu, dibutuhkan bahan bakar alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut.

Salah satu sumber energi alternatif yang berpotensi adalah biodiesel. Biodiesel merupakan bahan bakar alternatif yang berasal dari minyak nabati seperti minyak kedelai, minyak jarak, minyak zaitun, minyak kelapa (minyak goreng), dan minyak sayur lainnya. Pada umumnya produksi biodiesel mempergunakan proses teknik kimia konvensional. Proses teknik kimia konvensional dilakukan melalui reaksi transesterifikasi trigliserida (yang terdapat pada minyak nabati) dengan alkohol (umumnya metanol) menggunakan katalis basa (alkali) pada temperatur yang cukup tinggi, yaitu 120°C - 150°C. Proses teknik kimia konvensional ini memiliki kelemahan yang berhubungan dengan penggunaan energi dan pembentukan produk samping yang tidak dikehendaki. Oleh sebab itu, dikembangkan proses enzimatik untuk menghasilkan biodiesel dengan menggunakan biokatalisator.

Biokatalisator yang banyak digunakan adalah enzim lipase karena karena tingginya tingkat selektivitasnya dan lipase juga mempunyai kemampuan mengkatalis reaksi organik baik didalam media berair maupun dalam media non-air. Penggunaan enzim lipase pada sintesis biodiesel memiliki beberapa keuntungan yaitu (i) sifat spesifik lipase yang tinggi sehingga akan dihasilkan produk yang murni, (ii) penggunaan suhu dan tekanan yang relatif rendah, (iii) biaya pengolahan limbah yang relatif lebih murah dan (iv) produk yang dihasilkan lebih aman dibandingkan dengan proses kimia konvensional (Elisabeth dkk, 1998). Salah satu jenis lipase yang banyak digunakan sebagai biokatalisator adalah *Candida rugosa* (Pandey, dkk, 1999). *Candida rugosa* adalah satu dari banyak lipase yang biasa digunakan dalam reaksi esterifikasi asam lemak untuk produksi metil ester asam lemak (FAME), kosmetik (*palm oil emulsifier*) yang mengandung asam palmitat yang tinggi, industri makanan (*cocoa butter*), industri minyak nabati seperti minyak jagung, minyak bunga matahari, minyak zaitun (Hasan dkk, 2005).

Berdasarkan atas kenyataan tersebut, proses enzimatik melalui reaksi transesterifikasi trigliserida dengan alkohol menggunakan lipase menguntungkan. Namun, penggunaan lipase dalam transesterifikasi trigliserida juga masih menyisakan masalah yaitu lingkungan beralkohol menyebabkan lipase terdeaktivasi secara cepat dan stabilitasnya dalam mengkatalis menjadi buruk. Hal ini mengakibatkan biaya produksi yang tinggi sehingga sintesis biodisel menggunakan biokatalis belum bisa dilakukan secara komersial. Untuk menyelesaikan masalah tersebut, ditemukan teknologi baru yaitu sintesis biodisel melalui rute non-alkohol.

Masalah lain yang dihadapi dalam sintesis biodiesel dalam proses enzimatik yaitu tingginya harga enzim lipase di pasaran dan lipase juga tidak dapat digunakan kembali setelah dipakai dalam sintesis biodiesel karena terlarut dalam media reaksi (Kirk, et al., 2002). Keadaan ini menyebabkan biaya reaksi yang menggunakan katalis lipase menjadi meningkat. Maka, agar dapat digunakan kembali, perlu dilakukan teknik reaksi imobilisasi dengan bantuan *support* sebagai media pembantu yang dapat menahan enzim dalam struktur molekulnya. Saat ini, ada beberapa metode dalam mengimobilisasi lipase, antara lain metode

carrier-binding, *cross-linking*, dan *entrapment*. Pada penelitian ini, metode yang dipakai dalam mengimobilisasi lipase adalah metode *entrapment* menggunakan *support* kitin, kitosan dan zeolit. Pada *entrapment* dengan *support* kitin dan kitosan, variasi yang digunakan adalah rasio massa, waktu imobilisasi dan konsentrasi TPP. Sedangkan pada *entrapment* dengan *support* zeolit, variasi yang dilakukan hanya variasi perbandingan enzim dan zeolit.

Hasil imobilisasi lipase akan digunakan sebagai katalis pada sintesis biodiesel rute non-alkohol. Hasil reaksi yang didapatkan akan dianalisa menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) dan besarnya konversi biodiesel digunakan untuk menentukan keaktifan imobilisasi lipase. Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui kondisi optimal dalam imobilisasi lipase dengan metode *entrapment* pada *support* kitin, *support* kitosan dan *support* zeolit.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

- 1) Manakah jenis *support* yang unggul ?
- 2) Bagaimana pengaruh perubahan faktor-faktor dalam proses imobilisasi lipase, seperti rasio massa, waktu imobilisasi, konsentrasi TPP dan perbandingan enzim dengan *support* terhadap enzim *loading* ?
- 3) Bagaimana pengaruh waktu sintesis biodiesel terhadap *yield* biodiesel yang dihasilkan ?
- 4) Bagaimana stabilitas lipase terimobilisasi dengan metode *entrapment* pada sistem reaktor kontinu?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah

- 1) Melakukan imobilisasi lipase dengan metode *entrapment* menggunakan *support* kitin, kitosan dan zeolit.
- 2) Mengetahui pengaruh rasio massa, waktu imobilisasi, konsentrasi TPP dan perbandingan enzim dengan *support* terhadap enzim *loading*.

- 3) Mengetahui pengaruh waktu sintesis biodiesel terhadap biodiesel yang dihasilkan
- 4) Mengetahui stabilitas lipase terimobilisasi dengan metode *entrapment* pada sistem reaktor kontinyu.

1.4 Batasan Masalah

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

- 1) Biokatalis yang digunakan adalah *Candida rugosa* lipase yang diimobilisasi dengan metode *entrapment*.
- 2) Substrat trigliserida yang dipakai adalah minyak goreng bekas.
- 3) *Support* yang digunakan adalah kitin, kitosan dan zeolit.
- 4) Reaktor yang digunakan adalah reaktor *batch* berupa tabung reaksi berukuran 10 ml yang diletakkan dalam *shaking waterbath*, lalu dilanjutkan dengan sistem reaktor kontinyu.

1.5 Manfaat Penelitian

Keluaran dari penelitian ini berupa alkil ester yang secara komersial dikenal dengan nama biodiesel, dimana biodiesel merupakan energi alternatif untuk menggantikan bahan bakar fosil. Selain itu, penyelidikan mengenai kondisi optimum proses imobilisasi lipase dalam penelitian ini juga penting untuk dilakukan karena hal ini dapat menjadi solusi untuk menurunkan biaya yang harus dikeluarkan dalam sintesis biodiesel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biodiesel

Biodiesel merupakan salah satu jenis bahan bakar berupa ester alkil/alkil asam-asam lemak (biasanya ester metil) yang dibuat dari minyak nabati. Pembuatan biodiesel dari minyak nabati dilakukan melalui proses transesterifikasi antara trigliserida dengan metanol atau etanol dengan bantuan katalis basa menjadi alkil ester dan gliserol atau melalui proses esterifikasi antara asam-asam lemak bebas dengan metanol atau etanol dengan bantuan katalis basa menjadi senyawa alkil ester dan air. Nama biodiesel juga telah disetujui oleh Department of Energy (DOE), the Environmental Protection Agency (EPA) dan American Society of Testing Materials (ASTM) sebagai industri energi alternative yang berasal dari asam lemak yang sumbernya lemak yang dapat diperbaharui. Biodiesel dapat ditulis sebagai B100 yang menunjukkan bahwa biodiesel tersebut murni 100% terdiri atas mono-alkyl ester (Wafa, 2009).

2.1.1 Keuntungan Pemakaian Biodiesel

Biodiesel adalah jenis bahan bakar yang memiliki rantai karbon antara 12 sampai 20. Selain itu, biodiesel juga mengandung oksigen, dimana oksigen inilah yang menjadi pembeda antara biodiesel dengan petroleum diesel (solar). Namun, biodiesel memiliki sifat kimia dan sifat fisika yang serupa dengan petroleum diesel (solar) sehingga dapat digunakan langsung untuk mesin diesel atau terlebih dahulu dicampur dengan petroleum diesel dimana ini akan meningkatkan biodegradability petroleum diesel sampai 500 %.

Energi yang dihasilkan oleh biodiesel hampir sama dengan energi yang dihasilkan oleh petroleum diesel, biodiesel menghasilkan 128.000 BTU sedangkan petroleum diesel menghasilkan 130.000 BTU. Keadaan ini membuat *horse power* dan *engine torque* yang dihasilkan juga hampir sama. Sedangkan

perbedaan biodiesel dengan petroleum diesel dapat dilihat dari *flash point* biodiesel yang lebih tinggi dari petroleum diesel, yang disebabkan oleh adanya kandungan oksigen pada biodiesel. Biodiesel tidak menghasilkan uap yang membahayakan pada suhu kamar, maka biodiesel lebih aman daripada petroleum diesel dalam penyimpanan dan penggunaannya. Biodiesel tidak mengandung sulfur dan senyawa benzen yang karsinogenik, sehingga biodiesel merupakan bahan bakar yang lebih bersih dan lebih mudah ditangani dibandingkan dengan petroleum diesel.

Penggunaan biodiesel juga dapat mengurangi emisi karbon monoksida, hidrokarbon total, partikel, dan sulfur dioksida. Kelebihan lain dari segi lingkungan adalah tingkat toksisitasnya yang 10 kali lebih rendah dibandingkan dengan garam dapur dan tingkat biodegradabilitasnya sama dengan glukosa, sehingga sangat cocok digunakan pada kegiatan di perairan untuk bahan bakar kapal/motor. Biodiesel tidak menambah efek rumah kaca seperti halnya petroleum diesel karena karbon yang dihasilkan masuk dalam siklus karbon.

Keuntungan-keuntungan lain dari penggunaan biodiesel yaitu: biodiesel dihasilkan dari sumber daya energi terbarukan dan ketersediaan bahan bakunya terjamin, cetane number pada biodiesel tinggi (bilangan yang menunjukkan ukuran baik atau tidaknya kualitas solar berdasar sifat kecepatan pembakaran dalam ruang bakar mesin, viskositas yang tinggi sehingga mempunyai sifat pelumasan yang lebih baik daripada solar sehingga memperpanjang umur pakai mesin, biodiesel dapat diproduksi secara lokal, mempunyai kandungan sulfur yang rendah, biodiesel dapat menurunkan tingkat opasiti asap.

2.1.2 Bahan Baku Biodiesel

Sumber utama biodiesel adalah minyak nabati yang berasal dari berbagai macam jenis tumbuhan. Indonesia mempunyai banyak sumber daya untuk bahan baku biodiesel. Pada Tabel 2-1 akan ditampilkan beberapa sumber minyak nabati yang dipakai sebagai bahan baku biodiesel.

Tabel 2-1 Beberapa sumber minyak nabati yang dipakai sebagai bahan baku biodiesel (Direktorat Pengolahan Hasil Pertanian, 2010)

Nama Lokal	Sumber Minyak	Isi (% Berat Kering)
Jarak Pagar	Inti biji	40-60
Nama Lokal	Sumber Minyak	Isi (% Berat Kering)
Jarak Kaliki	Biji	45-50
Kacang Suuk	Biji	35-55
Kapok / Randu	Biji	24-40
Karet	Biji	40-50
Kecipir	Biji	15-20
Kelapa	Inti biji	60-70
Kelor	Biji	30-49
Kemiri	Inti biji	57-69
Kusambi	Sabut	55-70
Nimba	Inti biji	40-50
Saga Utan	Inti biji	14-28
Sawit	Sabut dan biji	45-70 + 46-54
Nyemplung	Inti biji	40-73
Randu Alas	Biji	18-26
Sirsak	Inti biji	20-30
Srikaya	Biji	15-20

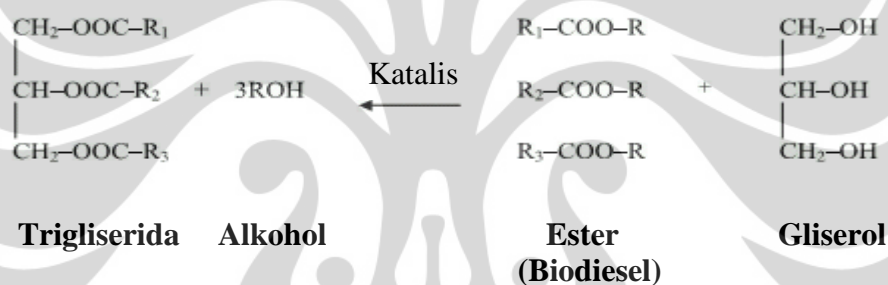
2.1.3 Sintesis Biodiesel

Penggunaan minyak nabati sebagai bahan bakar telah dikenali semenjak adanya mesin diesel. Minyak nabati memiliki viskositas yang terlalu tinggi untuk digunakan dalam kebanyakan mesin diesel. Oleh karena itu dilakukan beberapa cara untuk menurunkan viskositas minyak nabati, yaitu: dilusi, mikroemulsi, pirolisis dan transesterifikasi. Salah satu metode yang umum digunakan untuk menurunkan viskositas minyak dalam industri biodiesel disebut transesterifikasi. (Demirbas, 2008).

2.1.3.1 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi

Transesterifikasi atau alkoholisis adalah proses reaksi dari trigliserida lemak atau minyak dengan alkohol untuk membentuk ester alkohol dan gliserol. Gambar 2-1 menunjukkan reaksi transesterifikasi trigliserida. Proses ini menggunakan katalis guna meningkatkan *yield* ester alkohol dan laju reaksi.

Reaksi transesterifikasi adalah reaksi reversibel sehingga diperlukan penggunaan alkohol berlebih untuk menggeser kesetimbangan ke arah produk (Demirbas, 2008). Metanol, etanol, propanol, butanol dan amyl alkohol banyak digunakan dalam reaksi ini. Metanol lebih banyak digunakan karena harganya lebih murah dan metanol merupakan senyawa polar yang berantai karbon terpendek sehingga bereaksi lebih cepat dengan trigliserida, dan melarutkan semua jenis katalis, baik basa maupun asam (Zhang *et al.*, 2003).



Gambar 2-1 Reaksi transesterifikasi trigliserida (Demirbas, 2008)

Reaksi biodiesel memerlukan katalis seperti sodium hidroksida untuk membagi molekul minyak dan alkohol (methanol atau etanol) untuk mengombinasikan dengan ester yang terpisah. Produk sampingan utama adalah gliserin. Proses tersebut mengurangi viskositas produk akhir. Transesterifikasi banyak digunakan untuk menurunkan viskositas minyak nabati. Biodiesel merupakan sumber bahan bakar terbarui. Biodiesel dapat diproduksi dari minyak dari tanaman atau lemak hewan yang merupakan produk sampingan dari pengolahan minyak. (Demirbas, 2008)

2.1.3.2 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Katalis Basa

Transesterifikasi berkatalis basa umum digunakan pada proses produksi biodiesel secara komersial. Metode ini dapat mencapai 90% konversi metil ester dengan 1-2 jam reaksi pada suhu ruang. Metode berkatalis basa memerlukan bahan baku minyak *anhydrous*. Orchidea *et. al.*, (2012) menyarankan kandungan

asam lemak dalam minyak serendah mungkin (<0,5% berat/berat) dan kandungan *moisture* minyak <0,06% berat/berat dan tidak mengandung asam lemak. Akan terjadi penurunan *yield* ester jika reaktan yang digunakan tidak memenuhi kedua persyaratan tersebut di atas. Adanya sedikit kandungan asam lemak dan *moisture* dalam reaktan menyebabkan terbentuknya sabun, menurunkan *yield* ester dan mempersulit pemisahan ester dan glyserol. Kehadiran asam lemak bebas dalam minyak juga akan mengkonsumsi katalis sehingga menurunkan efisiensi katalis. Transesterifikasi berkatalis basa efisien digunakan jika bahan baku minyak berkemurnian tinggi.

2.1.3.3 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Katalis Asam

Transesterifikasi berkatalis asam umumnya berjalan lebih lambat dari transesterifikasi berkatalis basa. Metode ini sesuai untuk minyak atau lemak berkonten asam lemak relatif tinggi. Transesterifikasi berkatalis asam dapat digunakan pada bahan baku minyak bermutu rendah atau memiliki kandungan asam lemak tinggi.

Transesterifikasi berkatalis asam umumnya berlangsung pada suhu tinggi >100°C dengan 3-48 jam reaksi kecuali jika reaksi dilakukan pada tekanan tinggi. Asam sulfur, asam hidroklorat dan asam sulfonat umum digunakan sebagai katalis asam. Pada proses sintesis biodiesel melalui transesterifikasi berkatalis asam, katalis akan terlarut dalam methanol melalui *stirring* kuat dalam sebuah reactor kecil dan minyak ditransfer ke dalam reactor biodiesel dan kemudian campuran katalis/alkohol dipompa ke dalam minyak. (Demirbas, 2008)

Transesterifikasi berkatalis asam memiliki kekurangan yang sama dengan transesterifikasi berkatalis basa yaitu adalah larutan katalis yang homogen dengan lapisan glyserol setelah reaksi berlangsung sehingga katalis tidak dapat digunakan kembali (*reused*). Selain itu, buangnya bersifat tak ramah lingkungan akibat penggunaan bahan kimia.

2.1.3.4 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Katalis Alkali

Dalam metode transesterifikasi methanol dengan katalis alkali, katalis (KOH atau NaOH) terlarut dalam methanol melalui *stirring* kuat dalam reactor kecil. Minyak ditransfer ke dalam reactor biodiesel dan kemudian campuran

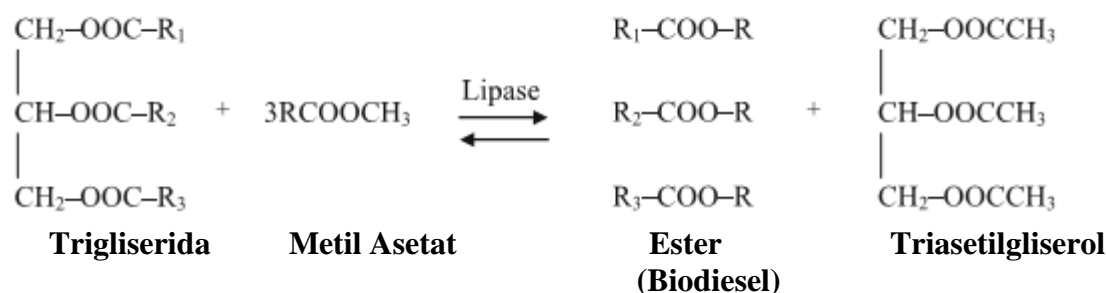
katalis/alkohol dipompa ke dalam minyak. Campuran akhir di-*stirring* secara kuat selama 2 jam pada 340 K dalam tekanan ambient. Reaksi transesterifikasi yang sukses akan menghasilkan dua fasa liquid: ester dan *crude* gliserin. (Demirbas, 2008)

2.1.3.5 Sintesis Biodiesel Melalui Transesterifikasi dengan Biokatalis

Biodiesel juga dapat dihasilkan dengan metode transesterifikasi biokatalitik. Metil asetat, yang merupakan akseptor asil baru untuk produksi biodiesel, telah dikembangkan dan studi mengenai perbandingan katalis Novozyme 435 transesterifikasi dari minyak kedelai untuk produksi biodiesel dengan akseptor asil yang berbeda-beda telah dikaji (Demirbas, 2008). Lipase merupakan salah satu contoh biokatalis yang paling sering digunakan dalam produksi biodiesel. Transesterifikasi lipase memerlukan kemurnian bahan baku tinggi sehingga diperlukan *pretreatment* bahan baku dan penggunaan jenis katalis lipase yang tahan terhadap alkohol.

2.1.3.6 Sintesis Biodiesel Melalui Rute Non-Alkohol

Dalam kaitannya dengan sintesis biodiesel yang dikatalis dengan menggunakan biokatalis, penggunaan lipase sebagai katalis dalam reaksi alkoholisis masih menyisakan masalah. Lingkungan beralkohol menyebabkan lipase terdeaktivasi secara cepat dan stabilitasnya dalam mengkatalis menjadi buruk. Akibatnya biokatalis tersebut tidak bisa dipakai ulang. Hal ini mengakibatkan biaya produksi yang tinggi sehingga sintesis biodiesel menggunakan biokatalis belum bisa dilakukan secara komersial. Untuk menyelesaikan masalah tersebut maka ditemukan teknologi baru yaitu sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol (Wafa, 2009). Berikut merupakan mekanisme reaksi sintesis biodiesel melalui rute baru non-alkohol.



Gambar 2-2 Mekanisme reaksi sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol (Demirbas, 2008)

Dalam sintesis biodiesel rute alkohol, alkohol (metanol) berfungsi untuk mensuplai gugus alkil (metil). Sementara itu, dalam sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol, metanol dapat digantikan dengan metil asetat sebagai pensuplai gugus metil seperti yang diperlihatkan pada Gambar 2-2. Penggantian alkohol dengan alkil asetat ini diharapkan mampu meningkatkan stabilitas enzim selama proses reaksi secara signifikan. Di samping itu, produk samping rute non-alkohol ini yaitu triasetilgliserol mempunyai nilai jual yang lebih tinggi bila dibandingkan produk samping pada rute alkohol yaitu gliserol (Xu et.al, 2004). (Wafa, 2009)

2.2 Metil Ester Asam lemak Sebagai Komponen Biodiesel

Biodiesel adalah ester alkil (metil, etil, isopropil, dan sejenisnya) dari asam-asam lemak. Metil ester asam lemak memiliki rumus molekul $C_{n-1}H_{2(n-r)-1}CO-OCH_3$ dengan nilai n yang umum adalah angka genap antara 8 sampai dengan 24 dan nilai r yang umum 0, 1, 2, atau 3. Beberapa metil ester asam lemak yang dikenal adalah :

1. Metil stearat, $C_{17}H_{35}COOCH_3$ [$n = 18$; $r = 0$]
2. Metil palmitat, $C_{15}H_{31}COOCH_3$ [$n = 16$; $r = 0$]
3. Metil laurat, $C_{11}H_{23}COOCH_3$ [$n = 12$; $r = 0$]
4. Metil oleat, $C_{17}H_{33}COOCH_3$ [$n = 18$; $r = 1$]
5. Metil linoleat, $C_{17}H_{31}COOCH_3$ [$n = 18$; $r = 2$]
6. Metil linolenat, $C_{17}H_{29}COOCH_3$ [$n = 18$; $r = 3$]

Kelebihan metil ester asam lemak dibanding asam-asam lemak lainnya :

1. Ester dapat diproduksi pada suhu reaksi yang lebih rendah.
2. Gliserol yang dihasilkan dari metanolisis adalah bebas air.
3. Pemurnian metil ester lebih mudah dibanding dengan lemak lainnya karena titik didihnya lebih rendah.
4. Metil ester dapat diproses dalam peralatan karbon steel dengan biaya lebih rendah daripada asam lemak yang memerlukan peralatan stainless steel.

Metil ester asam lemak tak jenuh memiliki bilangan setana yang lebih kecil dibanding metil ester asam lemak jenuh ($r = 0$). Meningkatnya jumlah ikatan rangkap suatu metil ester asam lemak akan menyebabkan penurunan bilangan setana. Maka, untuk komponen biodiesel lebih dikehendaki metil ester asam lemak jenuh seperti yang terdapat dalam fraksi stearin minyak sawit.

Pada Tabel 2-2 akan ditampilkan syarat mutu biodiesel pada ester alkil.

Tabel 2-2 Syarat mutu biodiesel ester alkil (Direktorat Jenderal Listrik dan Pemanfaatan Energi Departemen Pertambangan dan Energi, 2005)

No.	Parameter	Satuan	Nilai
1	Massa jenis pada 40 °C	kg/m ³	850 – 890
2	Viskositas kinematik pd 40 °C	mm ² /s (cSt)	2,3 – 6,0
3	Angka setana		min. 51
4	Titik nyala (mangkok tertutup)	°C	min. 100
5	Titik kabut	°C	maks. 18
6	Korosi lempeng tembaga (3 jam pada 50 °C)		maks. no 3
7	Residu karbon	%-massa	
	- dalam contoh asli		maks 0,05
	- dalam 10 % ampas distilasi		(maks. 0,3)
8	Air dan sedimen	%-vol.	maks. 0,05*
9	Temperatur distilasi 90 %	°C	maks. 360
10	Abu tersulfatkan	%-massa	maks.0,02
11	Belerang	ppm-m (mg/kg)	maks. 100
12	Fosfor	ppm-m (mg/kg)	maks. 10
13	Angka asam	mg-KOH/g	maks.0,8
14	Gliserol bebas	%-massa	maks. 0,02
15	Gliserol total	%-massa	maks. 0,24
16	Kadar ester alkil	%-massa	min. 96,5

No.	Parameter	Satuan	Nilai
17	Angka iodium	%-massa (g-I ₂ /100 g)	maks. 115
18	Uji Halphen		Negatif

* dapat diuji terpisah engan ketentuan kandungan sedimen maksimum 0.01 %-vol

2.3 Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit (*Crude Palm Oil*) merupakan gliserida yang terdiri dari berbagai asam lemak, dengan titik lebur dari gliserida yang tergantung pada kejenuhan asam lemaknya. Semakin jenuh asam lemaknya semakin tinggi titik lebur dari minyak sawit tersebut.

Pada umumnya minyak kelapa sawit mengandung lebih banyak asam-asam palmitat, oleat dan linoleat jika dibandingkan dengan minyak inti sawit. Minyak kelapa sawit banyak digunakan sebagai bahan baku pembuatan gliserin dan asam lemak seperti bahan baku minyak makan, margarin, sabun, kosmetika, industri baja, kawat, radio, kulit dan industri farmasi, disamping minyak inti sawit (*Crude Palm Hemel Oil*) dan minyak kelapa kopra (*Crude Coconut Oil*) (Ghosh dan Bhattacharyya, 1995).

Penggunaan minyak kelapa sawit yang beragam ini disebabkan karena keunggulan sifat trigliserida yang dimilikinya yaitu tahan oksidasi dengan tekanan tinggi, mampu melarutkan bahan kimia yang tidak larut oleh bahan pelarut lainnya, mempunyai daya melapis yang tinggi dan tidak menimbulkan iritasi pada tubuh dalam bidang kosmetik. Setiap trigliserida yang terdapat pada minyak kelapa sawit memiliki spesifikasi yang berbeda-beda dan dapat dipilih sebagai bahan baku sesuai dengan produk asam lemak yang ingin dihasilkan dari proses hidrolisis.

2.3.1 Komposisi Trigliserida dalam Minyak Kelapa Sawit

Trigliserida adalah komponen utama penyusun minyak kelapa sawit. Trigliserida atau lebih tepatnya triasilgliserol atau triasilgliserida adalah sebuah

gliserida, yaitu ester dari gliserol dan tiga asam lemak. Berikut ini merupakan komponen trigliserida pada minyak kelapa sawit yang terdapat di beberapa negara.

Tabel 2-3 Komposisi trigliserida pada minyak kelapa sawit (Salunkhe, 1992)

Asam Lemak	Malaysia (%)	Indonesia (%)	Zaire (%)
Miristik	0,5-0,8	0,4-0,8	1,2-2,4
Palmitik	46-51	46-50	41-43
Stearik	2-4	2-4	4-6
Oleik	40-42	38-42	38-40
Linoleik	6-8	6-8	10-11

2.3.2 Fraksi Stearin dalam Minyak Kelapa Sawit

Pada industri pengolahan minyak kelapa sawit, banyak dihasilkan fraksi olein dan stearin. Fraksi olein lebih baik digunakan untuk pembuatan minyak goreng, karena asam lemak tak jenuh yang terkandung di dalamnya lebih mudah dihancurkan di dalam tubuh. Fraksi stearin biasanya digunakan sebagai bahan baku pada pabrik oleokimia dan untuk diekspor. Akan tetapi, saat ini ekspor stearin mendapat saingan dari negara lain yang juga penghasil kelapa sawit seperti Malaysia. Akibatnya, fraksi stearin akan terus berlimpah karena produksi oleokimia dalam negeri sampai kini juga masih sangat sedikit dibanding produksi bahan baku yang terus meningkat.

Stearin memiliki asam lemak jenuh yang lebih banyak daripada fraksi olein, karena itu fraksi stearin memiliki bilangan setana lebih besar. Kedua alasan di atas menjadikan fraksi stearin sebagai sumber yang tepat untuk dijadikan bahan baku pembuatan biodiesel. Berikut ini ditampilkan kandungan asam lemak pada minyak kelapa sawit dan sumber minyak nabati lainnya.

Tabel 2-4 Kandungan asam lemak dari minyak sawit dan beberapa minyak nabati lainnya (Salunkhe, 1992)

Asam Lemak	R	n	Sawit (%)	Inti Sawit (%)	Kelapa (%)	Kedelai (%)	Bunga Matahari (%)	Kanola (Rape) (%)
Heksanoat	0	6	-	0.5	0.5	-	-	-

Asam Lemak	R	n	Sawit (%)	Inti Sawit (%)	Kelapa (%)	Kedelai (%)	Bunga Matahari (%)	Kanola (Rape) (%)
Oktanoat	0	8	-	3 – 10	6 – 9	-	-	-
Dekanoat	0	10	-	3 – 14	6 – 10	-	-	-
Laurat	0	12	0,1 – 1,0	37 – 52	44 – 51	-	-	-
Miristat	0	14	0,9 – 1,5	7 – 17	13 – 18	-	-	-
Palmitat	0	16	41,8 – 46,8	2 – 9	8 – 10	7 – 10	4 – 8	3,49
Stearat	0	18	4,2 – 5,1	1 – 3	1 – 3	3 – 6	2 – 5	0,48
Eikosanoat	0	20	0,2 – 0,7	0,6	-	0 – 2	0 – 1	-
Dekasanoat	0	22	-	-	-	-	0 – 1	-
Palmitoleat	1	16	-	0,6	0,3	1	-	-
Oleat	1	18	37,3 – 40,8	11 – 23	5,5 – 7,5	20 – 35	20 – 35	64,4
Linoleat	2	18	9,1 – 11,0	1 – 3	Tr – 2,5	40 – 57	45 – 68	22,30
Linolenat	3	18	0 – 0,6	-	-	5 – 14	-	8,23

2.4 Enzim

Enzim adalah golongan protein yang disintesis oleh sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator dalam setiap reaksi metabolisme yang terjadi pada organisasi hidup. Enzim merupakan biokatalisator yang menunjang berbagai proses industri seperti: industri produk pertanian, kimia, dan medis. Sifat-sifat spesifik enzim menyebabkan penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun, diperkirakan peningkatan mencapai 10–15% per tahun. Beberapa sifat-sifat spesifik enzim yang menguntungkan yaitu efisien dan efektifitas yang tinggi, selektif, *predictable*, proses reaksi tanpa produk samping, dan ramah lingkungan, serta dapat digunakan berulang kali dengan teknik imobilisasi (Lehninger, 1982).

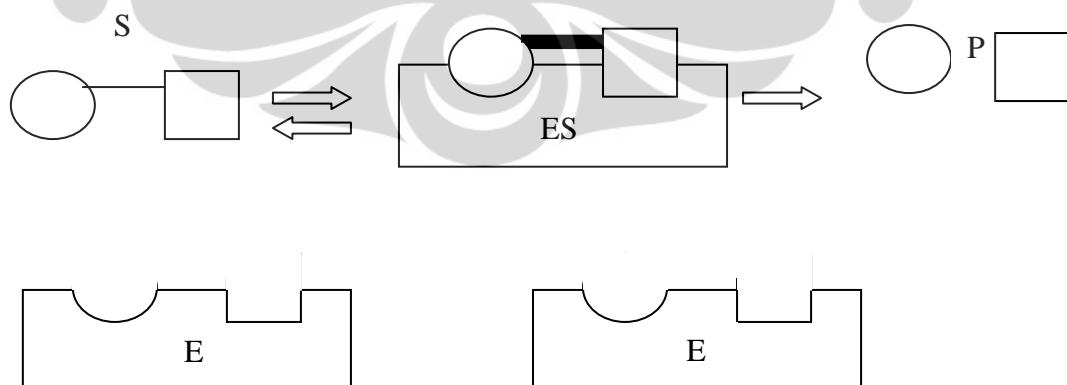
2.4.1 Fungsi dan Cara kerja Enzim

Fungsi suatu enzim ialah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada reaksi yang dilakukan tanpa enzim. Jadi enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien, disamping mempunyai kekhasan

(spesifik) yang tinggi. Seperti katalis yang lain, enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Reaksi kimia ada yang membutuhkan energi (reaksi endergonik) dan ada pula yang menghasilkan energi atau mengeluarkan energi (eksergonik). Sifat spesifik (kekhasan) enzim menyebabkan enzim hanya dapat bekerja pada satu reaksi saja (Poedjiadi, 1994). Untuk dapat bekerja terhadap suatu zat atau substrat harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat.

Suatu enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substrat. Oleh karena itu tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan langsung dengan substrat. Hubungan antara substrat dengan enzim hanya terjadi pada bagian atau tempat tertentu saja. Tempat atau bagian enzim yang mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat dinamai bagian aktif (*active site*). Hubungan hanya mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif suatu enzim. Dalam hal ini enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat. Hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang aktif, yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi.

Secara sederhana, penguraian suatu senyawa atau substrat oleh suatu enzim dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 2-3. Proses penguraian substrat oleh suatu enzim (Poedjiadi, 1994)

2.4.2 Klasifikasi Enzim

Penggunaan enzim dalam bioteknologi modern semakin berkembang secara cepat. Banyak industri-industri yang telah memanfaatkan kerja enzim, meliputi industri pangan dan non-pangan. Ratusan enzim telah diketahui spesifikasinya terhadap substrat yang berbeda, tetapi hanya beberapa yang diisolasi dalam bentuk murni dan dikristalkan, serta hanya sedikit yang diketahui strukturnya. Keunggulan penggunaan protein dalam bioteknologi, menjadikan industri enzim menjadi penting. Misalnya protease dan lipase digunakan dalam industri deterjen, amilase dan glukosa isomerisasi digunakan dalam industri pati atau dalam sintesis senyawa organik lainnya. Hal ini mendorong dilakukannya klasifikasi enzim yang rasional dan juga nomenklatur. Pada tahun 1961, *International Union of Biochemistry* menetapkan klasifikasi enzim menjadi enam kelas dasar (Manitto, 1981) yaitu :

1) Oksidoreduktase

Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini dapat dibagi menjadi dua bagian yaitu dehidrogenasi dan oksidase. Dehidrogenasi bekerja pada reaksi-reaksi dehidrogenase, yaitu reaksi pengambilan atom hidrogen dari suatu senyawa (donor). Hidrogen yang dilepas akan diterima oleh senyawa lain (akseptor). Oksidase juga bekerja sebagai katalis pada reaksi pengambilan hidrogen dari suatu substrat. Dalam hal ini yang bertindak sebagai akseptor hidrogen adalah oksigen.

2) Transferase

Enzim yang termasuk golongan ini bekerja sebagai katalis pada reaksi pemindahan suatu gugus dari suatu senyawa kepada senyawa lain. Beberapa contoh enzim yang termasuk golongan ini adalah metiltransferase, karboksilattransferase dan amonitransferase atau disebut juga transaminase. Enzim transaminase bekerja pada reaksi transaminase yaitu suatu reaksi pemindahan gugus amino dari suatu asam amino kepada senyawa lain.

3) Hidrolase

Enzim yang termasuk dalam kelompok ini bekerja sebagai katalis pada reaksi hidrolisis. Ada tiga jenis hidrolase, yaitu yang memecah ikatan ester, memecah glikosida dan memecah ikatan peptida. Beberapa enzim sebagai contoh ialah esterase, lipase, fosfatase, amilase, amino peptidase, karboksi peptidase, pepsin, tripsin, kimotripsin. Lipase adalah enzim yang memecah ikatan ester pada lemak, sehingga terjadi asam lemak dan gliserol. Lipase dapat mengkatalisasi reaksi hidrolisis dari trigliserida rantai panjang. Sejak berkembangnya bioteknologi, lipase mendapatkan perhatian yang besar. Lipase merupakan kelas biokatalis yang penting dalam aplikasi bioteknologi.

4) Liase

Meningkatkan terjadinya pemisahan secara non-hidrolik suatu gugus atom dari substrat, sehingga terbentuk suatu ikatan rangkap atau penambahan suatu gugus atom pada suatu ikatan rangkap. Contoh enzim golongan ini antara lain dekarboksilase, aldolase, hidratase.

5) Isomerase

Enzim yang termasuk golongan ini bekerja pada reaksi perubahan intramolekuler, misalnya reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa, perubahan senyawa L menjadi senyawa D, senyawa cis menjadi senyawa trans. Contoh enzim yang termasuk golongan isomerase antara lain ialah ribulofosfat epimerase dan glukosafosfat isomerase.

6) Ligase

Enzim yang termasuk golongan ini bekerja pada reaksi-reaksi penggabungan dua molekul. Oleh karenanya enzim-enzim tersebut juga dinamakan sintetase. Ikatan yang terbentuk dari penggabungan tersebut adalah ikatan C-O, C-S atau C-C. Contoh enzim golongan ini antara lain glutamine sintetase dan piruvat karboksilase.

2.4.3 Lipase

Enzim lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan bekerja dengan mengkatalisis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut air seperti trigliserida berantai panjang. Berdasarkan fungsi fisiologisnya enzim lipase mempunyai peranan penting menghidrolisis lemak dan minyak menjadi asam lemak dan gliserol yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Enzim lipase termasuk golongan enzim hidrolase yaitu enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis.

Enzim ini juga mampu mengkatalisasi pembentukan ikatan ester (esterifikasi) dan pertukaran ikatan ester (transesterifikasi) pada media bukan air. Cara kerja lipase adalah menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak dan gliserol (Hasan dkk, 2005).

2.4.3.1 Sumber Lipase

Enzim lipase atau *Triacylglycerol Acylhdrolase* diproduksi oleh sel, bakteri, mikroorganisme eukarotik, tumbuhan tingkat tinggi dan tumbuhan rendah. Lipase dari mikroorganisme banyak digunakan sebagai biokatalis dalam aplikasi bioteknologi seperti produksi emulsifier dan biosurfaktan untuk membantu kelarutan dari lemak (Hasan, 2005) dan kimia organik. Keuntungan memproduksi enzim dari mikroorganisme adalah produksi enzim dapat ditingkatkan dalam skala besar dalam ruangan yang relatif terbatas. Berikut ini merupakan persentase kadar enzim dari beberapa sumber lipase.

Tabel 2-5 Persentase kadar enzim dari beberapa sumber lipase (Rini Handayani, 2005)

Substrat	Sumber Enzim	Kadar enzim (v/v)
Kontrol	-	0%
CPO + Bufer	<i>C. rugosa</i>	10%
CPO + Bufer	<i>C. rugosa</i>	25%
CPO + Santan	<i>C. rugosa</i>	10%
CPO + Santan	<i>C. rugosa</i>	25%

Substrat	Sumber Enzim	Kadar enzim (v/v)
CPO + Butanol	<i>C. rugosa</i>	10%
CPO + Butanol	<i>C. rugosa</i>	25%
CPO + Bufer	<i>B. subtilis</i>	10%
CPO + Bufer	<i>B. subtilis</i>	25%
CPO + Santan	<i>B. subtilis</i>	10%
CPO + Santan	<i>B. subtilis</i>	25%
CPO + Butanol	<i>B. subtilis</i>	10%
CPO + Butanol	<i>B. subtilis</i>	25%
CPO + Bufer	<i>P. aerogenes</i>	10%
CPO + Bufer	<i>P. aerogenes</i>	25%
CPO + Santan	<i>P. aerogenes</i>	10%
CPO + Santan	<i>P. aerogenes</i>	25%
CPO + Butanol	<i>P. aerogenes</i>	10%
CPO + Butanol	<i>P. aerogenes</i>	25%

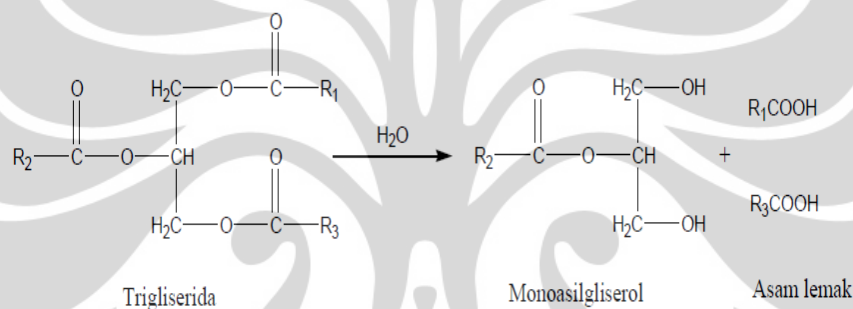
2.4.3.2 Struktur Lipase

Struktur molekul enzim lipase dengan gambar tiga dimensi ditunjukkan pada gambar 2-4. Daerah A merupakan “lid” atau tepi pengaktifan yang akan membuka daerah B yaitu daerah aktif enzim dan tempat substrat berada di daerah C. Substrat dapat kontak dengan enzim lipase jika tepi pengaktifan telah terbuka.



Gambar 2-4 Struktur molekul enzim lipase tiga dimensi

Enzim lipase mempunyai 3 asam amino yang berperan dalam reaksi katalitiknya yaitu asam aspartat, histidin dan serin. Tapak aktif atau sisi aktif enzim lipase berada pada asam amino serin yaitu gugus hidroksil (-OH) dari serin akan berikatan kovalen dengan substratnya. Proses hidrolisis enzim lipase yang terdapat pada mikroba menyerang gugus ester pada asam lemak atau menghidrolisis ikatan ester pada posisi ester primer, kemudian pada posisi ester tersier, ester posisi 2 tidak mampu memasuki tapak aktif dari enzim lipase karena gangguan keruangan. Reaksi hidrolisis berlangsung menghasilkan monoasilgliserol dan dua molekul asam lemak bebas. Reaksi hidrolisis lemak (trigliserida) oleh enzim lipase ditunjukkan pada Gambar 2-5.



Gambar 2-5 Reaksi hidrolisis enzim lipase

2.4.3.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim Lipase

Suatu enzim lipase memerlukan kondisi tertentu agar mampu bekerja secara maksimal sebagaimana enzim pada umumnya. Kondisi tersebut ditentukan oleh beberapa faktor yaitu (Poedjiadi,1994):

1. Konsentrasi Enzim

Pada konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi akan bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Jadi kecepatan reaksi suatu enzim bergantung pada konsentrasi enzim tersebut.

2. Konsentrasi Substrat

Suatu enzim yang mempunyai keadaan konsentrasi tetap akan bertambah kecepataannya dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Namun pada batas konsentrasi substrat tertentu tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksinya meskipun konsentrasi ditambah.

3. pH

Enzim lipase mempunyai pH optimum 8-9 namun dapat diantara 6-7 sesuai dengan jenis substratnya. Struktur ion enzim bergantung pada pH lingkungannya seperti halnya protein. Enzim dapat berbentuk ion positif dan ion negatif atau ion bermuatan ganda. Perubahan pH lingkungan akan mempengaruhi efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Pada pH rendah maupun pada pH tinggi akan menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan berakibat turunnya aktivitas enzim.

4. Suhu

Suhu optimum enzim lipase antara 30 °C dan 40 °C. Pada suhu yang rendah kecepatan reaksi kimia akan menjadi lambat, sedangkan pada suhu yang tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Namun karena enzim suatu protein, maka kenaikan suhu akan menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Bila terjadi denaturasi, bagian aktif enzim akan terganggu dan aktivitas enzim akan berkurang dan kecepatannya akan menurun.

5. Aktivator/Kofaktor

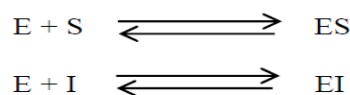
Aktivator merupakan suatu komponen yang dibutuhkan oleh enzim untuk dapat berfungsi sebagai katalis .

6. Inhibitor

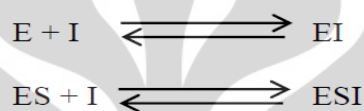
Mekanisme enzim dalam suatu reaksi adalah melalui pembentukan kompleks enzim-substrat. Proses mekanisme reaksi enzim dapat mengalami hambatan oleh adanya ion atau molekul yang menghambat reaksi. Penghambat tersebut dinamakan Inhibitor. Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dibagi menjadi dua yaitu: hambatan irreversibel dan hambatan reversibel.

Hambatan Irreversibel disebabkan oleh adanya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Hambatan ini terjadi karena inhibitor bereaksi tidak reversible dengan bagian tertentu pada enzim sehingga mengakibatkan berubahnya bentuk enzim.

Hambatan Reversibel dibagi menjadi dua yaitu: hambatan kompetitif dan non-kompetitif. Hambatan kompetitif disebabkan oleh adanya molekul yang mirip dengan substrat yang dapat membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI).



Hambatan non-kompetitif tidak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi substrat. Inhibitor non-kompetitif dapat bergabung dengan enzim pada suatu bagian enzim di luar bagian aktif. Penggabungan antara enzim dan inhibitor terjadi pada saat enzim bebas atau pada saat enzim telah mengikat substrat yaitu enzim-substrat. Penggabungan inhibitor dengan enzim bebas menghasilkan kompleks EI, sedangkan penggabungan dengan kompleks ES menghasilkan kompleks ESI.



2.5 Imobilisasi Enzim

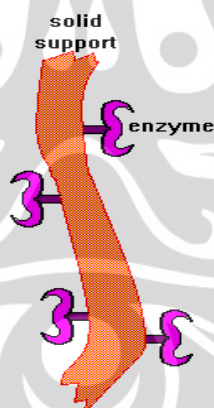
Dalam suatu proses yang melibatkan enzim dan menggunakan air sebagai pelarut, umumnya enzim akan larut dalam air dan sulit dipisahkan dari substrat dan produk. Selain itu, aktivitas enzim akan menurun dan enzim sulit untuk digunakan kembali. Imobilisasi enzim merupakan suatu usaha untuk membuat enzim dapat dipakai kembali (berulang-ulang). Imobilisasi enzim adalah suatu proses dimana pergerakan molekul enzim secara fisik maupun kimia ditempatkan pada suatu ruang yang dapat menahan aktivitas kataliknya. Pada proses imobilisasi ini, akan terjadi perubahan enzim dari yang larut dalam air (keadaan bergerak) menjadi tidak larut di dalam air (keadaan tidak bebas bergerak). Keadaan ini membuat enzim dapat menjadi aktif sehingga dapat digunakan kembali (berulang-ulang) dan tidak berdifusi ke dalam campuran reaksi.

Pada imobilisasi enzim, penahanan enzim pada suatu ruang dalam bahan pendukung harus dilakukan dengan tepat untuk mencegah perusakan struktur ruang tiga dimensi pada sisi-sisi aktif enzim sehingga pada akhirnya tidak akan mengurangi sifat spesifik enzim terhadap substrat dan tidak mengganggu gugus fungsi aktif. Beberapa bahan pendukung (*support*) yang dapat digunakan pada proses imobilisasi enzim antara lain bentonit, sheparose, gelatin, kitosan, kitin dan zeolit.

Imobilisasi enzim dapat dilakukan dengan berbagai metode. Pemilihan metode imobilisasi enzim tergantung pada bagaimana metode tersebut mempengaruhi aktivitas katalis enzim. Terdapat beberapa metode imobilisasi lipase dengan berbagai jenis *support*, yaitu : *carrier-binding* (mengikat enzim secara kovalen ke permukaan bahan yang tak larut dalam air dan dengan adsorpsi pada zat pendukung), *entrapment* (penjebakan di dalam suatu matrik atau gel yang permiable terhadap enzim, substrat, dan produk, dan dengan enkapsulasi) dan *cross-linking* (pengikatan-silang dengan bahan yang cocok untuk menghasilkan partikel yang larut).

2.5.1 *Carrier-binding*

Metode *carrier-binding* merupakan metode pengikatan enzim pada *carrier* yang tidak larut air dan hasil setelah imobilisasi tergantung pada sifat *carrier*. Pemilihan *carrier* tergantung pada sifat dari enzim, ukuran partikel, luas permukaan, rasio molar kelompok hidrofobik hidrofilik dan komposisi kimia. Metode ini diklasifikasikan lagi menjadi tiga jenis, yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik dan ikatan kovalen.



Gambar 2- 6 Metode imobilisasi enzim dengan metode *carrier-binding* (Daudi, 2012)

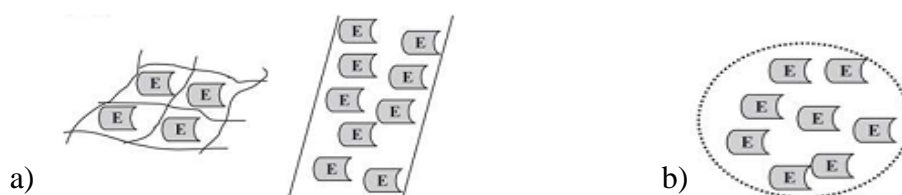
Metode adsorpsi enzim merupakan metode yang sederhana, tidak melibatkan spesies reaktif dan tidak ada modifikasi enzim. Umumnya digunakan bahan organik dan anorganik sebagai adsorban, diantaranya alumina (aminoasilase, amilase), selulosa (selulase), tanah liat (katalase), kaca (urease), hidroksilapatit (NAD pirofosforilase), karbon dan bahan silika (amilase). Penukar ion kemudian segera mengadsorpsi protein. Pengikatan enzim bersifat reversible, enzim yang teradsorpsi dapat mengalami desorpsi dengan adanya substrat.

Metode pengikatan enzim secara ionik merupakan metode yang melibatkan adanya ikatan ionik antara enzim dan *carrier* yang tidak larut air dan mengandung residu penukar ion. Kelebihan pada metode ini yaitu terjadi pada kondisi lunak sehingga aktivitas enzim tetap tinggi dan enzim dapat diregenerasi. Sedangkan kekurangannya adalah kekuatan ikatan yang lemah sehingga dapat bocor.

Pada metode pengikatan enzim secara kovalen, proses didasarkan pada ikatan kimia peptide dan protein. Ikatan kovalen tidak putus akibat adanya pengaruh pH dan kekuatan ion atau substrat, sehingga pembentukannya menguntungkan. Selama pembentukannya, terjadi reaksi kimia sehingga terdapat kemungkinan enzim menjadi tak aktif sebagian atau seluruhnya. Gugus yang berhubungan dengan pembentukan ikatan kimia diantaranya gugus amino, imino, amida, hidroksil, karboksil, dan gugus fenol. Terdapat dua tahapan metode ini, yakni aktivasi zat pendukung dan pengikatan. Tipe pendukung yang umumnya dipakai yaitu: gelas berpori dan keramik (amiloglukosidase), polimer sintesis (tripsin), selulosa (asparaginase, amilase), nilon (urease), dan alumina (glukosa oksidase).

2.5.2 Entrapment

Entrapment adalah metode imobilisasi yang didasari oleh penempatan enzim dengan pola matriks (polimer yang didasarkan pada elektropolimerisasi sehingga enzim akan terperangkap oleh elektropolimer yang terbentuk) atau membran (menutupi enzim dengan membran yang hanya dapat melewatkan analyte tapi tidak melewatkan enzim). *Entrapment* akan membatasi enzim untuk bergerak (Neau et al., 2002). Pada *entrapment*, enzim akan terperangkap dengan keramik yang menahan protein ketika penetrasi substrat. Pada metode *entrapment*, terdapat beberapa pendekatan untuk menjebak enzim yaitu tipe *gel* dan *microencapsulation*.

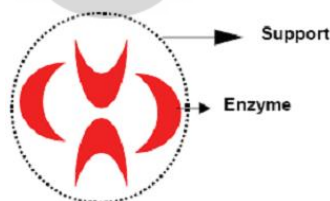


Gambar 2- 7 Entrapment dengan a) *gel*(fiber entrapping) b) *microencapsulation*
(Bestari, 2012)

Tipe *gel entrapment* termasuk dalam metode pemerangkapan enzim dengan ruang berpori dari rantai polimer larut air. Beberapa polimer sintetis seperti *polyacrylami*, *polyfinylalcohol* sedangkan polimer alami seperti alginat yang ter-*cross-linked* dengan rantai linear ion Ca^{2+} , gelatin, carrageenan dan agarose, kitin dan kitosan (Bestari, 2012) telah digunakan untuk imobilisasi enzim menggunakan teknik ini.

Metode penjebakan enzim ini sangat lunak dan tidak merusak aktivitas enzim. Enzim dapat ditambahkan ke dalam larutan monomer sebelum pembentukan gel yang terjadi, baik dengan perubahan suhu maupun dengan penambahan zat kimia mengiduksi sel. Kemudian enzim terjebak dalam volume gel tersebut di mana enzim tetap berada dalam bentuk aslinya tanpa risiko penutupan bagian aktif enzim oleh ikatan kimia. Namun, metode ini dapat menyebabkan hilangnya enzim secara terus menerus melalui pori dan penghambatan reaksi enzimatik oleh pengaturan difusi dari pemindahan substrat dan produk yang senyawanya memiliki berat molekul tinggi.

Tipe *microencapsulation* merupakan pengembangan metode inklusi dan melibatkan teknik enkapsulasi dengan menggunakan membran polimer semipermeable, di mana membran tidak semipermeable terhadap enzim dan makromolekul lain, tetapi terhadap substrat dan produk dengan berat molekul tinggi. Penyiapan dari metode ini memerlukan kondisi kontrol yang baik. Bahan yang digunakan diantaranya, kolodion (katalase, L-asparaginase), derivat selulosa (lipase), polistiren (katalase), dan nilon (tripsin, urease) yang sering digunakan. Bahan-bahan tersebut berguna untuk membentuk membrane yang tipis, berbentuk lingkaran semipermeable yang membentuk mikro kapsul dengan inklusi enzim.



Gambar 2- 8 Metode imobilisasi enzim dengan *microencapsulation (membrane entrapment)* (Bestari, 2012)

Penerapan metode *entrapment* ini dapat digunakan pada enzim horseradish peroxidase yang diperangkap dengan matrix gel *polyacrilamide*. Ketika

acrylamide dan *methylene bisacrylamide* (a cross-linking agent) dipolimerisasi menjadi a *cross linked* polimer. Jika rasio *acrylamide* dan *methylene bisacrylamide* yang digunakan itu tepat, perpanjangannya dari cross linking dapat membuat molekul enzim yang relative lebih besar dapat terperangkap dengan polymer cage, ketika substrat relatif kecil dan molekul produk untuk berdifusi dengan mudah ke dalam dan keluar matrix.

Acrylamide gel mempunyai keuntungan yang lain yaitu non-ionik, oleh karena muatan reaktan dan molekul produk tidak tertahan dalam gel. Untuk membuat suatu enzim yang terperangkap, suatu larutan enzim dicampur dengan monomer *acrylamide*, cross linking agent, *methylene bisacrylamide*, dan penambahan katalis untuk pembentukan awal polimer. Setelah beberapa menit, suatu massa gel padat dihasilkan, yang dicuci untuk memindahkan enzim bebas yang tidak terperangkap. Selain pada enzim horseradish peroxydase, metode *entrapment* juga dapat digunakan pada beberapa enzim diantaranya enzim invertase, katalase, penicillin acylase, fumarase, aspartase, dan lactase.

Metode *entrapment* ini memiliki beberapa keuntungan diantaranya adalah metode ini tidak memerlukan waktu yang banyak, tidak memerlukan biaya yang banyak, dan memperbolehkan karakterisasi kinetik dari enzim termobilisasi. Selain memiliki keuntungan metode *entrapment* juga memiliki beberapa kelemahan yaitu lepasnya enzim dari matrix karena enzim ukurannya lebih kecil dari sel, selain itu *entrapping* umumnya menggunakan matrix polyacrylamide gel yang bersifat karsinogenik sehingga lebih cocok untuk proses pengolahan limbah.

2.5.3 Cross-linking

Cross-linking merupakan metode pengikatan silang dengan bahan bergugus ganda yang membentuk ikatan melintang inter molekuler (suatu jaringan molekul enzim tiga dimensi) antara molekul enzim dengan pereaksi bifungsional atau multifungsional. Pada metode ini, terjadi ikatan kimia, tetapi tidak menggunakan *carrier* yang tidak larut.

Pada umumnya, enzim mengalami *crosslink* setelah adsorpsi pada zat pembawa yang sesuai. Senyawa yang umum digunakan sebagai pembentuk ikatan silang adalah diamin alifatik, dimetil adipimat, dan glutaraldehid. Pengikatan

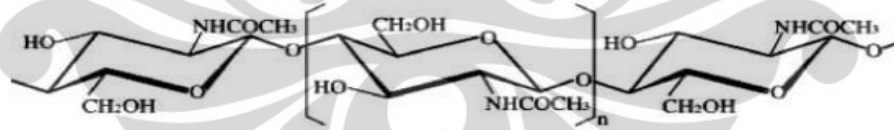
silang ini dapat merupakan intermolekuler, yakni menghasilkan agregat yang tidak larut dalam air, dan intramolekuler. Enzim takgerak dapat terjadi melalui reaksi kopolimerisasi, misalnya pembentukan polimer melalui penggabungan kovalen yang melibatkan reaksi kopolimerisasi.



Gambar 2- 9 Metode immobilisasi enzim dengan *cross-linking* (Daudi, 2012)

2.6 Kitin

Kitin merupakan biopolimer selulosa seperti terdiri dari rantai bercabang dari sebagian besar β -(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukosa. Kitin adalah biopolimer kedua yang paling sering ditemukan di alam setelah selulosa. Kitin pertama sekali ditemukan oleh Henri Bracannot pada tahun 1811. Kitin diproduksi oleh banyak organisme hidup dan biasanya ditemukan dalam bentuk kompleks dengan polisakarida atau protein lain. Kitin merupakan polimer yang berasal dari kulit terkuar udang-udangan ataupun kepiting (Neau et al., 2002). Kitin juga terdapat pada dinding sel dari beberapa organisme (Neau et al.,2002). Struktur kimia kitin dapat dilihat pada 2-10.



Gambar 2- 10 Struktur kitin (Muzarelli, 1985)

Kitin diketahui sulit larut dalam pelarut yang umum digunakan akibat strukturnya yang kristalin, sehingga hal ini yang menyebabkan kitin sulit untuk digunakan (Dong et al.,2000). Kitin tidak dapat larut dalam air, asam encer dan alkali dingin, jika dibiarkan terlalu lama dalam pelarut alkali, kitin hanya sebagian yang mengambang dan tidak larut. Permukaan kitin didapati kurang aktif dan dapat diresapi air apabila bersentuhan dengan air. Interaksi kitin dengan asam mineral pekat dapat mengakibatkan pemutusan pada kitin seperti asam klorida.

Pelarut dengan asam organik adalah pelarut yang baik untuk melarutkan kitin (Muzarelli, 1985). Campuran pelarut dari asam trikloroasetat dan diklorometana dapat melarutkan kitin dengan cepat dan memberikan larutan dengan viskositas yang baik. Selama ini kitin dilarutkan pada pelarut campuran, seperti campuran asam triklorometana dan diklorometana, juga dengan pelarut campuran N,N-Dimetilasetamida dan Litium Khlorida (Muzarelli, 1985).

Sebagai matriks pendukung pada proses imobilisasi enzim, kitin mempunyai beberapa keuntungan karena mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, tidak beracun dan tidak membahayakan. Kitin mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan antara lain non-toksik, *hydrophilicity*, *biocompatibility* karena merupakan polimer alami, *biodegradability* sehingga dapat didegradasi oleh protease membentuk oligosakarida yang non-toksik, sifat anti mikroba terhadap berbagai macam mikroorganisme dan mempunyai afinitas besar terhadap enzim.

Kitin merupakan polimer alam yang dapat berikatan secara *crosslink* apabila ditambahkan *crosslinked agent* misalnya glutaraldehid (Neau et al., 2002). Kemampuan untuk digunakan dalam berbagai bentuk seperti gel dan kopolimer adalah karakteristik lain yang membuat kitin sebagai bahan yang baik untuk *support*. Hal ini dapat membentuk partikel koloid dan menjerat molekul bermuatan negatif melalui beberapa sarana seperti kimia dan silang ion. Fleksibilitas kitin dan sifat biokompatibilitas material cocok untuk penghantaran).

2.6.1 Kegunaan kitin

Berikut ini merupakan kegunaan dari kitin :

1. Bidang Kedokteran/Kesehatan

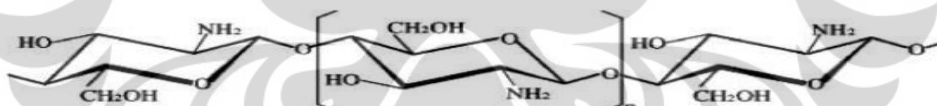
Kitin dan turunannya (karboksimetil kitin, hidroksietil kitin dan etil kitin) dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi. Benang operasi ini mempunyai keunggulan dapat diurai dan diserap dalam jaringan tubuh, tidak toksik, dapat disterilisasi dan dapat disimpan lama. Kitin juga dapat digunakan sebagai bahan pemercepat penyembuhan luka bakar, lebih baik dari kitin yang terbuat dari tulang rawan. Selain itu, digunakan juga sebagai bahan pembuatan garam-garam glukosamin yang mempunyai banyak manfaat di bidang kedokteran, misalnya untuk menyembuhkan influenza, radang usus dan sakit tulang.

2. Industri Pengolahan Pangan

Karena sifat kitin yang dapat mengikat air dan lemak, maka kitin dapat digunakan sebagai media pewarnaan makanan. Mikrokristalin kitin jika ditambahkan pada adonan akan dapat meningkatkan pengembangan volume roti tawar yang dihasilkan. Selain itu, dapat digunakan sebagai pengental dan pembentuk emulsi yang lebih baik daripada mikrokristalin selulosa. Pada pemanasan tinggi kitin akan menghasilkan pyrazine yang potensial sebagai zat penambah cita rasa. Kitin juga tidak beracun sehingga tidak berbahaya bagi kesehatan manusia.

2.7 Kitosan

Kitosan (yang dikenal dengan nama kimia Poliglusam) adalah serat polimer alami yang merupakan turunan kitin yang diisolasi dari kulit udang, rajungan, kepiting, dan kulit serangga lainnya (Neau et al., 2002). Kitosan berbentuk lembaran tipis, tidak berbau, berwarna putih, dan terdiri dari dua jenis polimer, yaitu poli (2-deoksi-2-asetilamin-2-glukosa) dan poli (2-deoksi-2-aminoglukosa) yang berikatan secara beta (1,4). Struktur kimia kitosan dan kitin dapat dilihat pada Gambar 2-11.



Gambar 2- 11 Struktur kitosan (Muzarelli, 1985)

2.7.1 Proses Pembuatan Kitosan

Kitosan dengan rumus molekul $(C_6H_{11}NO_4)_n$ dapat diperoleh dari deasetilasi kitin (Neau et al., 2002). Proses pembuatan kitosan didapat melalui tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Deproteinasi

Di dalam kulit udang, protein berikatan dengan kovalen dengan kitin. Dalam proses ini kulit udang direaksikan dengan larutan natrium hidroksida (NaOH) panas dalam waktu yang relatif lama. Tujuan dari proses ini adalah untuk memisahkan atau melepas ikatan-ikatan protein dari kitin.

2. Demineralisasi

Dalam proses demineralisasi digunakan larutan asam klorida (HCl) pada suhu kamar. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam-garam anorganik atau kandungan mineral yang ada pada kitin terutama kalsium karbonat (CaCO_3).

3. Decolorisasi

Penghilangan zat-zat warna dilakukan pada waktu pencucian residu setelah proses deproteinasi dan proses demineralisasi. Pada proses ini hasil dari proses demineralisasi direaksikan lebih lanjut dengan menggunakan agensia pemutih berupa natrium hipoklorit (NaOCl). Proses decolorisasi bertujuan untuk menghasilkan warna putih pada kitin.

4. Deasetilasi

Proses deasetilasi merupakan proses pembentukan kitosan dari kitin menggunakan NaOH untuk mengganti gugus asetamida dengan gugus amino.

2.7.2 Kegunaan kitosan

Perkembangan penggunaan bahan alami pada akhir 1970-an, meningkatkan konsumsi kitosan, terlebih dengan beberapa penemuan baru untuk aplikasi kitosan di bidang farmasi dan kesehatan di akhir 1990-an hingga sekarang. Berikut ini merupakan kegunaan dari kitosan :

1. Bidang Kedokteran/Kesehatan

Kitosan dapat digunakan sebagai bahan pemercepat penyembuhan luka bakar, lebih baik dari kitosan yang terbuat dari tulang rawan. Selain itu, kitosan digunakan juga sebagai bahan pembuatan garam-garam glukosamin yang mempunyai banyak manfaat di bidang kedokteran, misalnya untuk menyembuhkan influenza, radang usus dan sakit tulang.

2. Industri Pengolahan Pangan

Karena sifat kitosan yang dapat mengikat air dan lemak, maka dapat digunakan sebagai media pewarnaan makanan. Karena sifatnya yang dapat bereaksi dengan asam-asam seperti polifenol, maka kitosan sangat cocok untuk menurunkan kadar asam pada buah-buahan, sayuran dan ekstrak kopi. Bahkan

terakhir diketahui dapat sebagai penjernih jus apel lebih baik dari pada penggunaan bentonite dan gelatin. Selain itu, kitosan juga tidak beracun sehingga tidak berbahaya bagi kesehatan manusia.

3. Penanganan Limbah

Karena sifat polikationiknya, kitosan dapat dimanfaatkan sebagai agensia penggumpal dalam penanganan limbah terutama limbah berprotein yang kemudian dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Pada penanganan limbah cair, kitosan sebagai chelating agent yang dapat menyerap logam beracun seperti merkuri, timah, tembaga, plutonium, dan uranium dalam perairan dan untuk mengikat zat warna tekstil dalam air limbah.

2.8 Zeolit

Zeolit menurut *J.V Smith* pada tahun 1984 adalah mineral dengan struktur kristal aluminasilikat yang berbentuk rangka (*framework*) tiga dimensi, mempunyai rongga dan saluran serta mengandung ion-ion logam seperti Na, K, Mg, Ca dan Fe serta molekul air. Pertama kali zeolit ditemukan oleh seorang ahli mineralogi asal Swedia bernama *Axel Frederick Cronstedt* pada tahun 1756. Mineral yang ditemukan akan dengan cepat melepaskan air bila dipanaskan dan seolah-olah mendidih. Sehingga mineral alam ini dinamakan zeolit yang dalam bahasa Yunani berarti batu didih (*zeo: boil* dan *lythe: stone*) (Togar, 2012)

Komposisi kimia dan sifat dari zeolit alam ini banyak dipengaruhi oleh kondisi hidrotermal lingkungan sekitar seperti temperatur, tekanan uap air dan komposisi air tanah dilokasi tempat pembentukan zeolit alam. Maka dapat ditemukan zeolit alam yang berbeda komposisi kimianya dengan zeolit alam dari lokasi lain meskipun warna dan teksturnya sama (Togar, 2012), sehingga akan menimbulkan beragam jenis zeolit alam yang terbentuk. Tabel 2-6 menunjukkan klasifikasi mineral zeolit alam dan rumus kimianya.

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

- Mempunyai kapasitas adsorpsi yang tinggi
- Dapat memisahkan atau mereaksikan produk dan reaktan
- Luas permukaan yang besar

- Memiliki dimensi pori molekuler
- Memiliki kemampuan modulasi sifat elektronik dengan aktif
- Adanya kemungkinan melakukan *preactivation* molekul ketika pori-pori oleh medan listrik kuat dan kekangan molekul.

Tabel 2-6 Klasifikasi mineral zeolit (Togar, 2012)

Zeolit	Rumus Kimia
Grup Analsim	
Analsim	$\text{Na}_{16}[\text{Al}_{16}\text{Si}_{31}\text{O}_{96}] 6\text{H}_2\text{O}$
Wairakit	$\text{Ca}_8[\text{Al}_{16}\text{Si}_{31}\text{O}_{96}] 6\text{H}_2\text{O}$
Grup Natrolit	
Natrolit	$\text{Na}_{16}[\text{Al}_{16}\text{Si}_{24}\text{O}_{80}] 6\text{H}_2\text{O}$
Thomsonit	$\text{Na}_{16}\text{Ca}_8[\text{Al}_{20}\text{Si}_{20}\text{O}_{80}] 24\text{H}_2\text{O}$
Grup Heulandit	
Heulandit	$\text{Ca}_4[\text{Al}_8\text{Si}_{28}\text{O}_{72}] 24\text{H}_2\text{O}$
Klinoptilolit	$\text{Na}_6[\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}] 24\text{H}_2\text{O}$
Grup Fillipsit	
Fillipsit	$\text{K}_2\text{Ca}_{1.5}[\text{Al}_6\text{Si}_{10}\text{O}_{32}] 12\text{H}_2\text{O}$
Zeolit Na-P-1	$\text{Na}_8[\text{Al}_{31}\text{SiO}_{16}] 16\text{H}_2\text{O}$
Grup Mordenit	
Mordenit	$\text{Na}_8[\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96}] 24\text{H}_2\text{O}$
Ferrierit	$\text{NaCa}_{0.5}\text{Mg}_2[\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}] 24\text{H}_2\text{O}$
Grup Kabasit	
Kabasit	$\text{Ca}_2[\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{24}] 13\text{H}_2\text{O}$
Zeolit L	$\text{K}_6\text{Na}_3[\text{Al}_9\text{Si}_{27}\text{O}_{72}] 21\text{H}_2\text{O}$
Grup Faujasit	
Faujasit	$\text{Na}_{12}\text{Ca}_{12}\text{Mg}_{11}[\text{Al}_{58}\text{Si}_{134}\text{O}_{384}] 235\text{H}_2\text{O}$

Zeolit A	$\text{Na}_{12}[\text{Al}_{12}\text{Si}_{12}\text{O}_{48}] 27\text{H}_2\text{O}$
Grup Laumontit	
Laumontit	$\text{Ca}_4[\text{Al}_8\text{Si}_{16}\text{O}_{46}] 16\text{H}_2\text{O}$
Grup Pentasil	
ZSM-5	$\text{Na}_n[\text{Al}_n\text{Si}_{96}\text{O}_{192}] 16\text{H}_2\text{O}$
Grup Zeotype	
AlPO ₄ -5	$[\text{Al}_{12}\text{P}_{12}\text{O}_{48}] (\text{C}_3\text{H}_7)_4 \text{NOH } q \text{ H}_2\text{O}$

2.8.1 Struktur Zeolit

Zeolit merupakan mineral yang terdiri dari kristal alumino-silikat yang terhidrasi dan mengandung kation alkali dan alkali tanah. Struktur kristal zeolit yang terkoordinasi Si, Al, atau P, atau sekelompok elemen seperti B, Ga, Fe, Cr, Ge, Ti, V, Mn, Co, Zn, Be, Cu, dan lain-lain, dan dapat juga disintesis, yang disebut zeotypes, menghasilkan ALPO₄, SAPO, MeAPO, dan *molecular sieve* MeAPSOS (Togar, 2012). Struktur kristal zeolit mempunyai diameter ruang hampa sekitar 3-30^oA. Kerangka dasar struktur zeolit adalah unit-unit tetrahedral AlO₄ dan SiO₄ yang saling berhubungan melalui atom oksigen dan didalam struktur tersebut ion Si⁴⁺ dapat digantikan oleh ion Al³⁺ (Togar, 2012). Rumus kimia zeolit sebagai berikut:



atau



\longleftrightarrow \longleftrightarrow \longleftrightarrow
Non-framework *framework* *Sorbed phase*

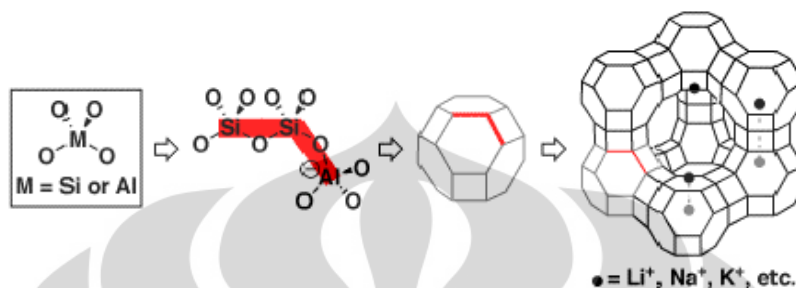
Keterangan:

$\text{M}_{c/n}$: kation bervalensi n yang dapat dipertukarkan, kationnya dapat berupa alkali atau alkali tanah.

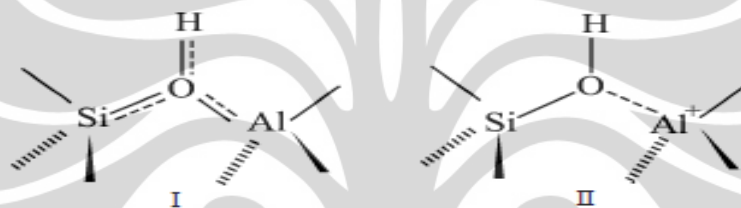
B : menunjukkan jumlah molekul air.

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

[] : lambang struktur rangka aluminasilika



Gambar 2-12 Struktur asam-basa Bronstead Si/Al (Togar, 2012)



Gambar 2-13 Struktur asam-basa Bronstead Si/Al (Togar, 2012)

Rasio Si terhadap Al pada suatu zeolit tidak kurang dari 1. Komposisi adsorben akan mengalami transisi atom-atom aluminium secara sistematis dan kaya akan atom aluminium, sehingga menjadi bersifat afinitas tinggi terhadap air dan senyawa polar lainnya, sedangkan struktur mikropori silika seperti silikalite menyebabkan sifat *hydrophobic* dan menyerap n-parafin terhadap air. Transisi dari *hydrophilic* menjadi *hydrophobic* akan terjadi jika rasio Si terhadap Al antara 8 hingga 10. Setiap adsorben zeolite akan memiliki jenis yang berbeda-beda tergantung pada struktur rangka dari rasio perbandingan Si terhadap Al dan bentuk susunan kation, dengan perbedaan komposisi tersebut akan pula menjadi adsorben yang selektif dalam pemilihan molekul yang akan dipisahkan

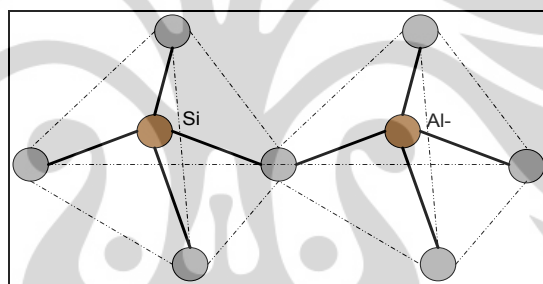
Zeolit yang terdehidrasi akan mempunyai struktur pori terbuka dengan *internal surface area* besar sehingga kemampuan mengadsorp molekul selain air semakin tinggi. Ukuran pori ini menentukan ukuran molekul yang dapat teradsorp. Sifat ini yang menjadikan zeolit mempunyai kemampuan penyaringan yang sangat spesifik yang dapat digunakan untuk pemurnian dan pemisahan.

Zeolit yang digunakan sebagai penyaring molekular tidak menunjukkan perubahan cukup besar pada struktur kerangka dasar pada dehidrasi walaupun kation berpindah menuju posisi dengan koordinasi lebih rendah. Setelah dehidrasi, zeolit sangat stabil terhadap pemanasan dan tidak terdekomposisi di bawah 700°C. (Togar, 2012)

Kation-kation dan molekul-molekul air tidak termasuk ke dalam kerangka alumina silikat tapi mengisi rongga diantara rangka. Unit-unit pembentuk dari kerangka aluminasilikat sebagai inti dari zeolit adalah:

1. Unit Pembentuk Primer (TO_4)

Tetrahedron yang mengandung Si atau Al sebagai pusat atom. Pada keempat sudut tetrahedron terdapat masing-masing satu atom oksigen yang digunakan bersama-sama oleh dua tetrahedron yang berdekatan, dimana atom-atom oksigen tersebut mengelilingi pusat silika (Si) atau alumunium (Al).



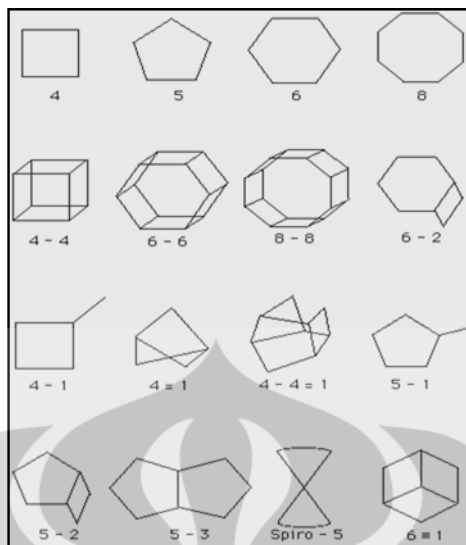
Gambar 2-14 Bentuk tetrahedron silika atau alumina (Togar, 2012)

2. Unit Pembentuk Sekunder (Unit Bangun Sekunder/SBU)

Gabungan unit-unit pembentuk primer yaitu dengan cara menyusun atom-atom pusat sehingga membentuk sudut-sudut tertentu yang membagi atom-atom oksigennya.

3. Polihedron simetris,

Yaitu dimana tiap unit pembentuk sekunder tergabung membentuk satu polihedron simetris yang arah pertumbuhannya sesuai dengan tiap-tiap bidang kristal unit pembentuk sekunder (Gambar 2-20). Polihedron simetris terbagi tiga jenis, yaitu: *Truncated octahedron* (T.O) atau unit *sodalite*, *11-Hedron* atau unit *cancrinite* dan *14-Hedron* atau unit *gmelinite*.



Gambar 2-15 Unit pembentuk sekunder (Togar, 2012)

4. Struktur zeolit secara keseluruhan, merupakan gabungan polihedron-polihedron simetris sehingga membentuk jaringan rongga teratur ke segala arah, yang dapat terisi oleh kation-kation dan molekul air.

2.8.2 Jenis-jenis Zeolit

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

a. Zeolit alam

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

Jenis dari zeolit alam tersebut dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu:

- Zeolit yang terdapat di antara celah-celah batuan atau di antara lapisan batuan.

Zeolit jenis ini terdiri dari beberapa jenis mineral zeolit bersama-sama dengan mineral lain seperti kalsit, kwarsa, renit, fluorit, mineral, dan sulfida.

- Zeolit yang berupa batuan

Jenis zeolit yang berbentuk batuan hanya sedikit, diantaranya adalah klinoptilolit, analsim, laumontit, mordenit, filipsit, erionit, kabasit dan heulandit.

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

b. Zeolit Sintesis

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

- Zeolit Si

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

- Zeolit dengan kadar Si rendah

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

- Zeolit dengan kadar Si tinggi

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

Pembuatan zeolit sintesis selalu didasarkan pada pemanfaatannya, dengan memodifikasi sifat-sifat zeolit dan memvariasikan rasio Si/Al. Berikut klasifikasi zeolit yang berdasarkan rasio Si/Al yang disajikan pada Tabel 2-7.

Tabel 2-7 Klasifikasi zeolit berdasarkan rasio Si/Al (Togar, 2012)

Rasio Si/Al	Zeolit
<i>Low</i> (1-1.5)	A,X
<i>Intermediate</i> (2-5)	a) Zeolit alam : Erionite, Khabasit, Klinoptilolit, Mordenit b) Zeolit sintetis : Y, L, mordenit dengan pori yang besar, omega
<i>High</i> (~10-∞)	ZSM-5 (<i>direct synthesis</i>) Erionit ^b Mordenit ^b Y ^b
<i>Silica Molecular Sieves</i>	Silicalite

b: zeolit yang mengalami modifikasi pada rangka secara termokimia

Pada zeolit berkadar Si rendah, akan menyebabkan daya pertukaran kation (*cations exchange*) yang maksimum. Zeolit dengan kadar Si sedang, daya tukar kationnya akan menjadi lebih rendah. Sedangkan untuk zeolit sintesis dengan kadar Si tinggi dapat digunakan sebagai katalisator asam untuk hidrokarbon karena mampu menyerap molekul-molekul non-polar. Zeolit dengan kadar silika 100% (zeolit silika) dapat memisahkan suatu molekul organik dari suatu campuran air (Togar, 2012).

2.8.3 Sifat Zeolit

Sifat zeolit yang terpenting adalah sebagai penyerap yang selektif, penukar ion, dan mempunyai sifat katalisis yang tinggi. Sifat-sifat serapan zeolit dipengaruhi oleh muatan-muatan kation. Kation-kation ini terkoordinasi pada atom oksigen. Pada zeolit terhidrasi penuh, kation-kation mobil dapat diganti kation-kation lain tidak harus monovalen. Penggantian kation dengan kation lain yang berbeda ukurannya dan muatan listriknya dapat mempengaruhi ukuran pori-pori yang akhirnya mempengaruhi sifat-sifat serapannya. Perubahan sifat zeolit tergantung pada sifat-sifat dan ukuran kation, temperatur, tekanan, konsentrasi larutan, dan struktur zeolit.

Kation-kation yang ada dalam zeolit mempengaruhi sifat fisiknya. Berikut adalah sifat-sifat zeolit antara lain :

a. Dehidrasi

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

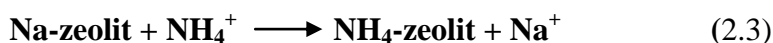
b. Adsorpsi

Dalam keadaan normal ruang hampa kristal zeolit terisi oleh molekul air bebas yang berada di sekitar kation bila kristal zeolit dipanaskan pada suhu 300-400⁰C maka molekul air tersebut akan keluar sehingga zeolit dapat berfungsi sebagai penyerap gas atau cairan. Zeolit juga mampu memisahkan molekul zat berdasarkan ukuran dan kepolarannya, karena adanya pengaruh kutub antara molekul zeolit dengan zat tersebut. Molekul yang tidak jenuh atau memiliki kutub akan lebih mudah lolos daripada yang jenuh atau yang tidak ber kutub. Selektivitas adsorpsi zeolit terhadap ukuran molekul tertentu dapat disesuaikan dengan jalan: penukaran kation, dekationisasi, dealuminasi secara hidrotermal dan perubahan perbandingan kadar Si dan Al.

c. Pertukaran ion

Kemampuan zeolit sebagai penukar ion tergantung pada banyaknya kation tukar pada zeolit. Banyaknya kation tukar pada zeolit ditentukan oleh banyaknya kation Si^{4+} yang digantikan oleh kation yang bervalensi tiga atau lima. Pada zeolit alam kation Si^{4+} yang biasanya dapat digantikan oleh kation Al^{3+} , sehingga kapasitas tukar kation ditentukan oleh rasio Si/Al. Kation tukar pada zeolit dapat dipertukarkan dengan kation lain dari golongan logam alkali atau alkali tanah yang lain, karena kation tukar tidak terikat dalam rangka zeolit oleh empat atom oksigen seperti Si^{4+} dan Al^{3+} .

Berikut contoh pertukaran kation:



Na adalah logam alkali. Selanjutnya NH₄-Zeolit ini dapat membentuk H-Zeolit yang merupakan katalis asam. Berikut faktor-faktor yang mempengaruhi pertukaran ion:

Jenis Zeolit	Ukuran Rongga (°A)	Si/Al	Kapasitas Tukar Kation (meq/g)
--------------	--------------------	-------	--------------------------------

- 1) *Ukuran Rongga Zeolit*, semakin besar ukuran rongga zeolit maka akan semakin besar pula kemampuan pertukaran ionnya.
- 2) *Rasio Si/Al*, semakin kecil rasio Si/Al maka kapasitas tukar kation zeolit akan semakin besar. Data kapasitas tukar kation dari beberapa jenis mineral zeolit berdasarkan ukuran pori dan rasio Si/Al terdapat pada Tabel 2-8. Sedangkan pada Tabel 2-9. dapat dilihat jenis reaksi pertukaran ion dengan kapasitas pertukaran ionnya.
- 3) *Volume Ion*, ukuran ion yang masuk dapat mempengaruhi laju dan jumlah pertukaran ion. Contoh: ion NH₄⁺ akan mengalami pertukaran ion yang cukup lama karena ukuran molekulnya cukup besar dan hampir sama dengan ukuran rongga zeolit.
- 4) *Selektifitas Ion*, Setiap jenis-jenis zeolit pada umumnya memiliki urutan selektifitas ion yang berbeda-beda. Ion dengan selektifitas yang tinggi akan dengan mudah masuk kedalam rongga zeolit dibandingkan dengan ion yang selektifitasnya lebih rendah. Berikut urutan selektifitas ion dari beberapa jenis zeolit dapat dilihat pada Tabel 2-9.
- 5) *Temperatur*, semakin tinggi temperatur maka akan semakin mempercepat laju pertukaran ion.

Analsim	2.6	4	4.9
Klinoptilolit	3.7 x 4.2	4	4.9
	4.0 x 5.5	10	2.6
Erionit	3.6 x 5.5	5	3.3
Ferririt	3.6 x 5.2	11	2.4
	3.4 x 4.6		
Mordenit	6.7 x 7.0	10	2.6
	2.9 x 5.7		
Filipsit	4.2 x 4.4	1.4	4.7
	4.3 x 4.0		

Tabel 2-8 Kapasitas tukar kation mineral zeolit (Togar, 2012)

Tabel 2-9 Urutan selektifitas pertukaran ion pada beberapa jenis zeolit (Togar, 2012)

2.9 State of the Art

2.9.1 Imobilisasi Lipase dengan Metode *Entrapment*

Jenis Zeolit	Urutan Selektifitas
Analsim	$K^+ < Li^+ < Na^+ < Ag^+$
Khabasit	$Li^+ < Na^+ < K^+ < Cs^+$
Klinoptilolit	$Mg^{2+} < Ca^{2+} < Na^+ < NH_4^+ < K^+$
Heulandit	$Ca^{2+} < Ba^{2+} < Si^{4+} < Li^+ < Na^+ < Rb^+ < K^+$
Mordenit	$Li^+ < Na^+ < Rb^+ < NH_4^+ < K^+ < Cs^+$

Sejumlah penelitian mengenai imobilisasi melalui metode *entrapment* telah banyak dilakukan. Sejumlah material tertentu dapat digunakan sebagai *support* dalam metode *entrapment* ini, seperti K-carrageenan, silica beserta modifikasinya,

alginate (Moon, 2005), diatomaceous earth, *hydrophobic sol-gel support* (Noureddini, et al., 2005), zirconia, kitosan (Kharistiananda, 2012), zeolit (Daudi, 2012), karbon aktif (Moreno-Pirajan, et al., 2011) dan (Bestari, 2012),

Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan imobilisasi lipase dengan menggunakan zeolit alam sebagai *support* (Daudi, 2012), dimana enzim *loading* terbesar adalah 95,74%. Hasil ini didapatkan dari imobilisasi *entrapment* dengan perbandingan rasio yang dipilih adalah 3% massa enzim dengan zeolit 97%. Pada variasi perbandingan enzim dengan zeolit yang dilakukan (Daudi, 2012), enzim *loading* yang dihasilkan mengalami penurunan yang tidak stabil. Oleh karena itu dilakukan pada penelitian ini, dilakukan pengulangan imobilisasi dengan variasi perbandingan enzim dengan zeolit yang sama untuk menguji kestabilan enzim *loading*. Selain itu, juga akan dilakukan imobilisasi dengan metode *entrapment* dengan *support* yang berbeda, yaitu kitin dan kitosan. Imobilisasi dengan *support* kitin melalui metode *entrapment* pertama sekali dilakukan pada penelitian ini, sebelumnya kitin dipakai pada imobilisasi dengan metode adsorpsi (Hermansyah et al., 2008).

Tabel 2-10 State of the art imobilisasi lipase dengan metode *entrapment*

Rute	Lipase	<i>Entrapment</i>	Penelitian ini	
		Non- Terimobilisasi	Enkapsulasi	(Orcaire, et al., 2006)

Alkohol		Adsorpsi	(Xu, et al., 2005)	(Du, et al., 2004) (Ognjanovic, et al., 2009) Wafa (2008) Ayu (2008) (Hermansyah, et al., 2008)
	Free Lipase		(Orcaire, et al., 2006) Kim (2007) (Hermansyah, et al., 2009)	
Rute Alkohol	Katalis non-lipase		Moreno (2010) Ko Woon Lee (2010) Noereddini (2004) Watanabe (2002) Shimada (2002) Kaieda (2001)	Moreno (2010) Fatimah (2008)
			Batch	Kontinyu
			Sistem Reaktor	

2.9.2 Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dengan Lipase Terimobilisasi

Sintesis biodiesel dengan menggunakan lipase yang diimmobilisasi dengan metode *entrapment* belum banyak dilakukan. *Support* yang telah digunakan, yaitu karbon aktif oleh Moreno-Pirajan dan Giraldo pada tahun 2010 di Bogota, Colombia. Noureddini, Gao dan Philkana menggunakan *support* hydrophobic sol-

gel. *Support* tersebut berasal dari polikondensasi hydrolyzed tetramethoxysilane dengan iso-butyltrimethoxysilane.

Sintesis biodiesel yang menggunakan alkohol sebagai asil akseptor berdampak pada cepatnya terjadi deaktivasi pada lipase yang digunakan. Oleh karena itu, sangat penting untuk dilakukan sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol, dimana yang berperan sebagai asil akseptor adalah metil asetat. Namun demikian, penggunaan lipase terimobilisasi melalui metode *entrapment* dalam sintesis biodiesel rute non-alkohol belum banyak dilakukan. Padahal imobilisasi lipase merupakan aspek penting dalam kaitannya dengan keekonomisan dalam memproduksi biodiesel. Berdasarkan pertimbangan terlepasnya enzim dari *support*, biaya dan tingkat kehilangan aktivitas, metode *entrapment* lebih unggul dibandingkan metode lainnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan sintesis biodiesel rute non-alkohol dengan lipase terimobilisasi melalui metode *entrapment*.

Tabel 2-11 *State of the art* sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi melalui *entrapment*

Rute sintesis Biodiesel	Non-Alkohol		Daudi (2012)	Penelitian Ini	
	Alkohol	(Moreno-Pirajan, et al., 2011)	(Noureddini, et al., 2005)		
	Karbon Aktif	Hydrophobic Sol-Gel Support	Zeolit	Kitin	Kitosan
	<i>Support</i>				

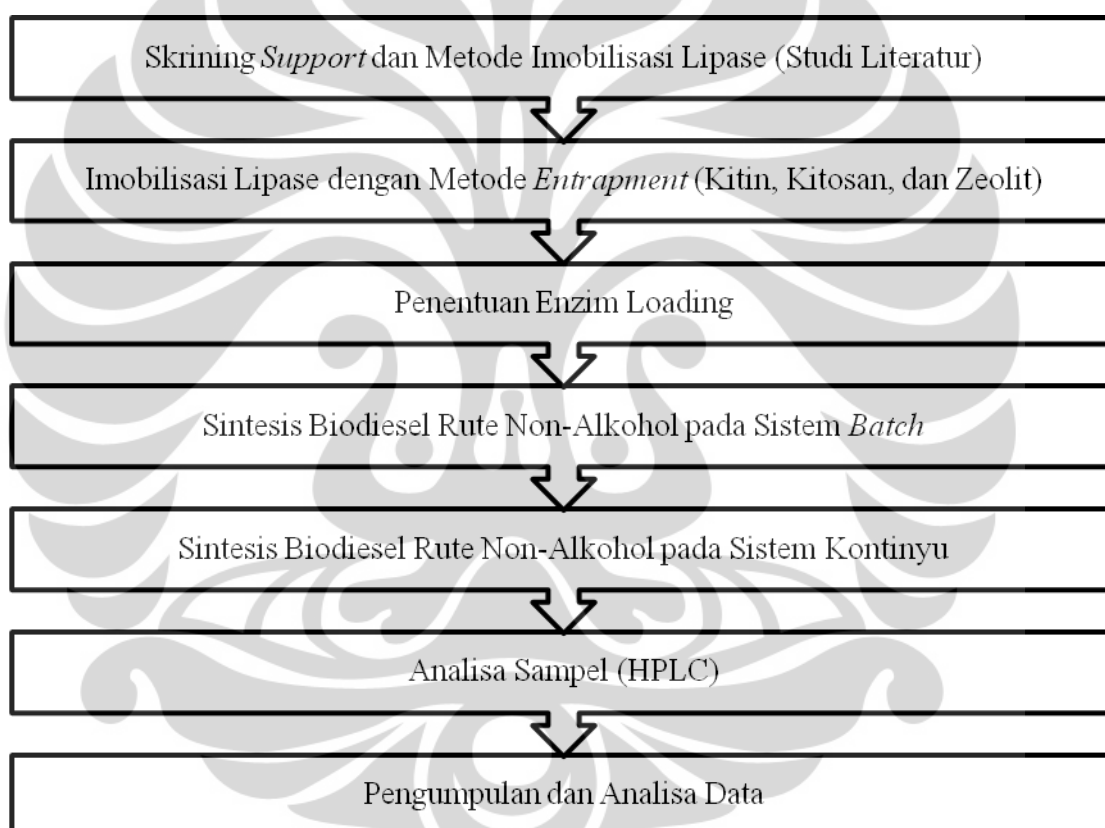
BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Dalam bab ini akan dibahas secara menyeluruh mengenai model penelitian, bahan dan peralatan yang digunakan, variabel penelitian, dan prosedur

penelitian. Sebagian besar penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Untuk melakukan analisa sampel dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian dan Teknologi (Puspitek) Serpong.

3.1 Model Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan beberapa tahapan, berikut diagram alir dari penelitian yang telah dilakukan:



Gambar 3- 1 Diagram alir prosedur penelitian

3.2 Variabel

Variabel independen dalam penelitian ini adalah

- Rasio massa pada *entrapment* dengan *support* kitin dan kitosan
- Waktu imobilisasi dengan *entrapment* menggunakan *support* kitin dan kitosan
- Konsentrasi larutan TPP dalam *entrapment* dengan *support* kitin dan kitosan
- Perbandingan enzim dan zeolit pada *entrapment* dengan *support* zeolit

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah

- Enzim *loading*
- *Yield* biodiesel

3.3 Alat dan Bahan

a. Alat

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

Tabel 3- 1 Alat yang digunakan dalam penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Beaker glass	Wadah untuk mengimobilisasi lipase
2.	<i>Hot plate stirrer dan stirrer bar (magnetic stirrer)</i>	Sebagai media pemanas untuk menghomogenkan campuran lipase dan <i>support</i>
3.	Kaca arloji	Wadah untuk menimbang bahan
4.	Timbangan digital	Alat untuk menimbang berat bahan
5.	Tabung reaksi	Tempat untuk membuat larutan
6.	Batang pengaduk	Alat untuk mengaduk campuran
7.	Spatula besi	Alat untuk mengambil bahan dalam bentuk padatan atau bahan berbentuk powder
8.	Pipet tetes	Alat untuk memindahkan bahan dalam bentuk liquid dengan cara meneteskan bahan liquid
9.	Pipet volumetrik (1 ml, 10 ml)	Pipet yang digunakan saat dibutuhkan untuk

(Lanjutan)

	memindahkan bahan liquid yang volumenya harus presisi
10. Kertas filter	Alat untuk memisahkan lipase terimobilisasi dan lipase bebas setelah dilakukan proses imobilisasi
11. Stop Watch	Alat untuk mengukur waktu pengambilan sampel
12. Pompa vakum	Alat yang dapat menciptakan kondisi vakum sehingga dapat mempercepat proses filtrasi
13. Kulkas	Tempat untuk menyimpan berbagai bahan/sampel yang membutuhkan temperatur penyimpanan yang cukup rendah ($<5^{\circ}\text{C}$)
14. <i>Shaking water bath</i>	Alat untuk mencapai kondisi reaksi yang diinginkan (temperatur dan guncangan)
15. Termometer	Alat untuk mengukur temperature
16. <i>Syringe Pump</i>	Untuk mengairkan substrat ke dalam reaktor hingga produk terbentuk
17. Plastik <i>Syringe</i>	Untuk tempat substrat yang akan dialirkan menggunakan <i>syringe pump</i>
18. Reaktor <i>Packed Bed (PBR)</i>	Tempat berlangsungnya reaksi sintesis biodiesel
19. <i>Syringe auto transfepette</i>	Untuk mengambil sampel ukuran mikro
20. Botol plastik	Untuk tempat sampel
21. Gelas ukur	Untuk mengukur volume bahan yang digunakan
22. Pompa air dan selang	Untuk memompa air yang akan dialirkan ke dalam jaket PBR
23. Cuvvette	Sebagai wadah saat dilakukan absorbansi di dalam spektrofotometer
24. Spektrofotometer	Alat yang digunakan untuk mengukur konsentrasi enzim
25. HPLC	Untuk menganalisa sampel hasil sintesis biodiesel

b. Bahan

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

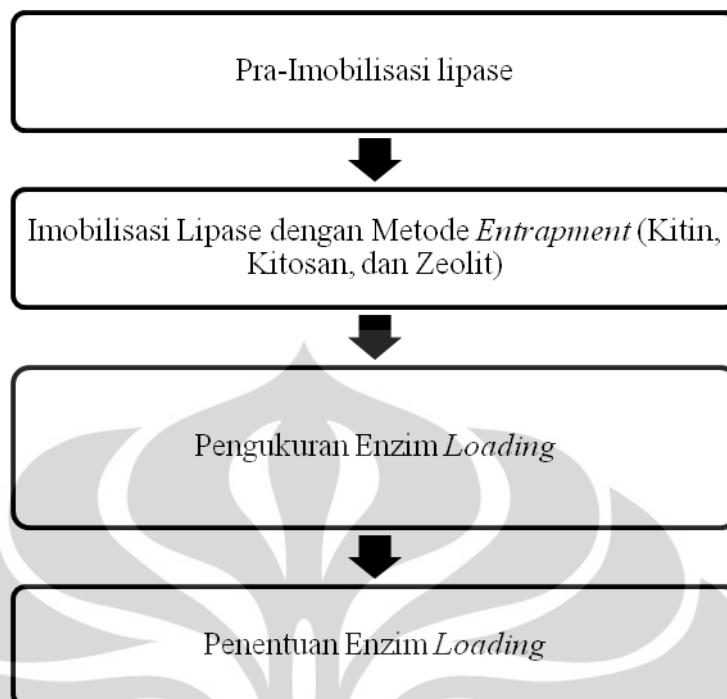
Tabel 3- 2 Bahan yang digunakan dalam penelitian

No.	Bahan	Supplier
1.	Kitin	PT. Biotech Surindo
2.	Kitosan	PT. Biotech Surindo
3.	<i>Candida rugosa</i> Lipase	Sigma Chemical Co.
4.	Zeolit	Merck
5.	Metil Asetat	Merck
6.	Buffer Fosfat	Laboratorium Bioproses
7.	Asam Asetat	Laboratorium Bioproses
8.	Na ₂ CO ₃	Laboratorium Bioproses
9.	TPP	Laboratorium Bioproses
10.	NaOH	Laboratorium Bioproses
11.	CuSO ₄ .5H ₂ O	Laboratorium Bioproses
12.	Folin Ciocalteu Phenol Reagent	Laboratorium Dasar Proses Kimia
13.	Aquades	Laboratorium Dasar Proses Kimia
14.	Minyak jelanta	Preparasi sendiri (1x penggorengan)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Imobilisasi Biokatalis Menggunakan Metode *Entrapment*

Imobilisasi lipase melalui metode *entrapment* dengan menggunakan *support* merupakan tahap awal dari inti penelitian ini. *Support* yang dipakai adalah kitin, kitosan, dan zeolit. Sedangkan enzim yang dipakai adalah lipase *Candida rugosa*. Gambar 3-2 merupakan diagram percobaan imobilisasi menggunakan metode *entrapment*.



Gambar 3- 2 Diagram alir percobaan imobilisasi metode *entrapment*

3.4.1.1 Pra-Imobilisasi Lipase

Pra-imobilisasi lipase merupakan tahap persiapan bahan-bahan yang akan digunakan pada saat imobilisasi. Berikut ini merupakan tahapan-tahapannya :

- 1) Membuat zeolit dalam bentuk bubuk dengan cara sebagai berikut :
 - a. Menghancurkan batu zeolit menjadi serbuk dengan mortar.
 - b. Zeolit yang telah menjadi serbuk disaring dengan saringan berukuran 0,7
 - c. Zeolit yang sudah halus (serbuk zeolit) akan dipakai sebagai *support* dalam metode imobilisasi *entrapment*.
- 2) Membuat buffer fosfat dengan cara sebagai berikut :
 - a. Membuat larutan A : larutan KH_2PO_4 2.652 g dalam 390 mL
 - b. Membuat larutan B : larutan $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.307 g dalam 610 mL
 - c. Mencampur larutan A dengan larutan B larutan sampai 1 L

Tabel 3- 3 Perbandingan volum untuk larutan buffer

KH_2PO_4 (mL)	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mL)	pH
877	123	6
390	610	7
160	840	7.5
53	947	8

3.4.1.2 Imobilisasi Lipase dengan *support* kitin

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- 2) Menyiapkan larutan enzim dengan konsentrasi 35 mg/mL.
- 3) Menyiapkan masing-masing larutan *support* yang memiliki konsentrasi 40 mg/mL dengan cara sebagai berikut:
 - a. Menimbang *support* sesuai dengan variasi.
 - b. Mencampurkan *support* yang telah ditimbang dengan asam fosfat 100%.
 - c. Mengaduk campuran tersebut dengan magnetic stirrer hingga homogen pada suhu 40°C
- 4) Menyiapkan larutan *sodium tripolyphosphate* (konsentrasi sesuai variasi) dengan cara sebagai berikut:
 - a. Menimbang *sodium tripolyphosphate* (TPP) sesuai dengan variasi.
 - b. Melarutkan TPP yang telah ditimbang dalam 100 mL aquadest.
- 5) Mencampurkan larutan enzim dengan larutan *support* dengan perbandingan volume sesuai variasi.
- 6) Meneteskan campuran larutan enzim dan *support* dalam larutan TPP.
- 7) Mendinginkan larutan tersebut selama beberapa menit.
- 8) Mendekantasi *gelbeads* yang terbentuk.
- 9) Menyimpan enzim yang telah diimobilisasi di dalam refrigerator dalam suhu 4°C dan menyimpan filtrat hasil filtrasi untuk menentukan konsentrasi lipase yang diimobilisasi.

3.4.1.3 Imobilisasi Lipase dengan *support* kitosan

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- 2) Menyiapkan larutan enzim dengan konsentrasi 30 mg/mL.
- 3) Menyiapkan masing-masing larutan *support* dengan cara sebagai berikut:
 - a. Menimbang *support* sesuai dengan variasi.
 - b. Mencampurkan *support* yang telah ditimbang dengan asam asetat 2%
 - c. Mengaduk campuran tersebut dengan magnetic stirrer hingga homogen.
- 4) Menyiapkan larutan *sodium tripolyphosphate* (konsentrasi sesuai variasi) dengan cara sebagai berikut:
 - a. Menimbang *sodium tripolyphosphate* (TPP) sesuai dengan variasi.

- b. Melarutkan TPP yang telah ditimbang dalam 100 mL aquadest.
- 5) Mencampurkan larutan enzim dengan larutan *support* dengan perbandingan volume sesuai variasi.
 - 6) Meneteskan campuran larutan enzim dan *support* dalam larutan TPP.
 - 7) Mendiamkan larutan tersebut selama beberapa menit sampai bead terbentuk.
 - 8) Menyimpan enzim yang telah diimobilisasi di dalam refrigerator dalam suhu 4°C dan menyimpan filtrat hasil filtrasi untuk menentukan konsentrasi lipase yang diimobilisasi.

3.4.1.4 Imobilisasi Lipase dengan *support* zeolit

Pada percobaan ini variasi dilakukan dengan variasi rasio jumlah massa enzim dengan massa *support* zeolit untuk imobilisasi. Studi yang didapatkan bahwa rasio enzim dalam *support* yang optimal tidak melebihi 10 % dari *support* yang digunakan (Daudi, 2012). Oleh karena itu, variasi rasio dilakukan dari 2-6 % massa enzim dengan *support* zeolit. Berikut ini tahapan percobaan yang dilakukan:

- 1) Membuat larutan NaF 0,5 M dengan melarutkan 0,21 g NaF dalam 10 mL air.
- 2) Membuat larutan enzim lipase *Candida rugosa* 0,01 g/mL dengan melarutkan 1 g lipase ke dalam 100 mL buffer fosfat pH 7.
- 3) Membuat variasi imobilisasi dengan perbandingan enzim sebesar 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6% terhadap *support* zeolit.
 - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 15 g serbuk zeolit perbandingan 2%.
 - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 10 g serbuk zeolit perbandingan 3%
 - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 7,5 g serbuk zeolit perbandingan 4%.
 - 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 6 g serbuk zeolit perbandingan 5%.

- 30 mL larutan enzim lipase 0,01 g/mL dicampur 5 g serbuk zeolit perbandingan 6%.
- 4) Menambahkan 0,5 mL larutan NaF 0,5M untuk setiap 10 mL larutan atau 3 mL larutan NaF.
 - 5) Menstirer campuran menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit
 - 6) Menghentikan *stirring* dan menutup Scotch Duran pada temperatur ruang selama 24 jam.
 - 7) Membuka penutup Scotch Duran dan menginkubasi campuran di dalam Scotch Duran dalam *water bath* pada 37⁰C selama 48 jam.
 - 8) Memfiltrasi lipase terimobilisasi dari larutan menggunakan kertas filter dan corong.
 - 9) Filtrat diambil untuk diukur konsentrasi enzim *loading*. Konsentrasi enzim diukur dengan metode Lowry dan enzim *loading* ditentukan berdasarkan kurva standar.
 - 10) Mengeringkan lipase terimobilisasi pada temperature 37⁰C selama 48 jam di dalam *shaker water bath*.
 - 11) Menyimpan lipase terimobilisasi di dalam *refrigerator* pada temperature 4⁰C hingga digunakan.

3.4.1.5 Kurva Kalibrasi Standar

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

- 1) Lowry Reagent (48 ml larutan A + 1 ml larutan B + 1 ml larutan C), dimana:
 - ❖ Larutan A : 2 gram Na₂CO₃ dalam 100 ml 0,1 N NaOH (0,4 gram NaOH dalam 100 ml aquadest)
 - ❖ Larutan B : 0,1 gram NaK Tartrate dalam 10 ml aquadest
 - ❖ Larutan C : 0,1 gram CuSO₄.5H₂O dalam 20 ml aquadest
- 2) Phenol reagent (5 ml Follin Ciocalteu phenol reagent + 5 ml aquadest)

Prosedurnya adalah sebagai berikut:

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

Tabel 3- 4 Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi standar

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

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

3.4.1.6 Pengukuran Enzim *Loading*

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

$$C_E = C_0 - C_t \quad (3.1)$$

Dimana :

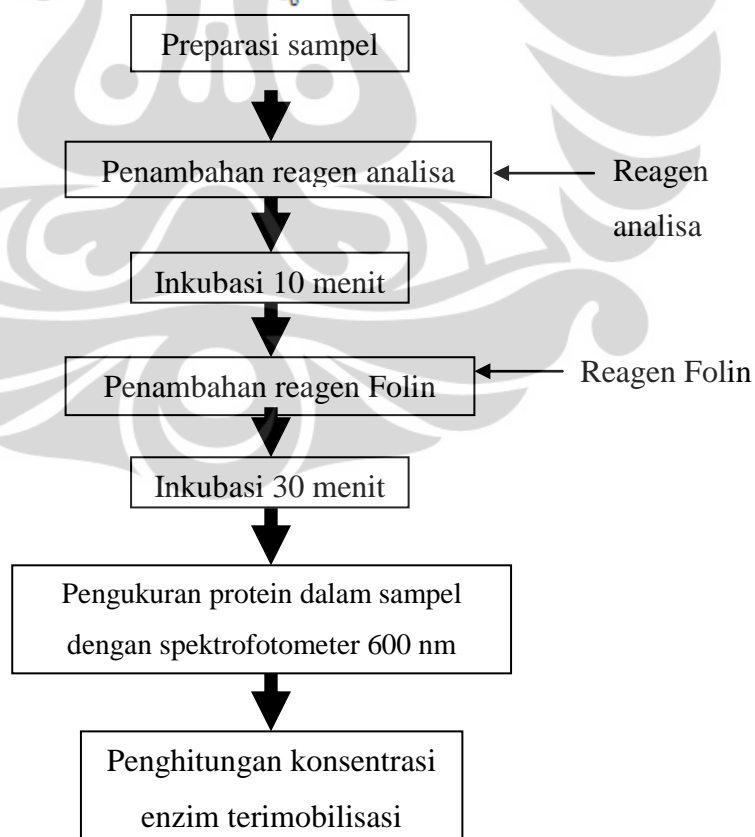
C_E = konsentrasi enzim terimobilisasi (gr/ml)

C_0 = konsentrasi enzim sebelum terimobilisasi (gr/ml)

C_t = konsentrasi enzim pada waktu setelah terimobilisasi (gr/ml)

Dan persentase enzim *loading* dapat dicari dengan dengan persamaan berikut :

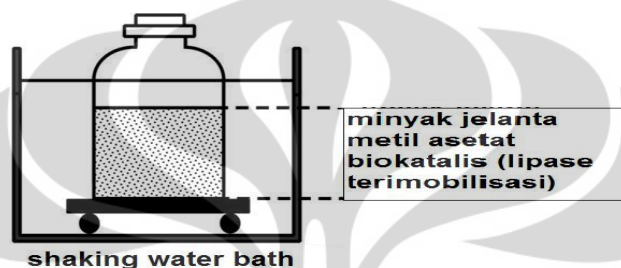
$$\%loading = \frac{C_E}{C_0} \times 100\% \quad (3.2)$$



Gambar 3- 3 Prosedur konsentrasi enzim terimobilisasi

3.4.2 Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor *Batch*

Reaksi akan dilangsungkan dalam reaktor *batch* merupakan lanjutan peneliti sebelumnya dimana labu erlenmeyer 250 mL yang berisi campuran minyak jelanta dan metil asetat dengan perbandingan mol 1:12 dimana perbandingan konversi maksimal yang dapat dicapai hasil dari penelitian sebelumnya oleh Septhian Marno. Berikut ini merupakan ilustrasi sintesis biodiesel dalam reaktor *batch* :



Gambar 3- 4 Ilustrasi percobaan sintesis biodiesel dalam reaktor *batch*

Percobaan uji aktivitas direaksikan pada suhu 37°C dengan berat biokatalis sebesar 4% wt dari substrat campuran minyak jelanta dan metil asetat (Marno , 2008). Reaksi dilakukan diatas *shaker water bath* dengan pegadukan 150 rpm dan pengambilan sampel dilakukan pada waktu reaksi selama 0 jam, 3 jam, 6 jam, 9 jam, 12 jam, 15 jam, 20 jam, 25 jam, 30 jam, 40 jam dan 50 jam. Prosedur pembuatannya pada Gambar 3-5.

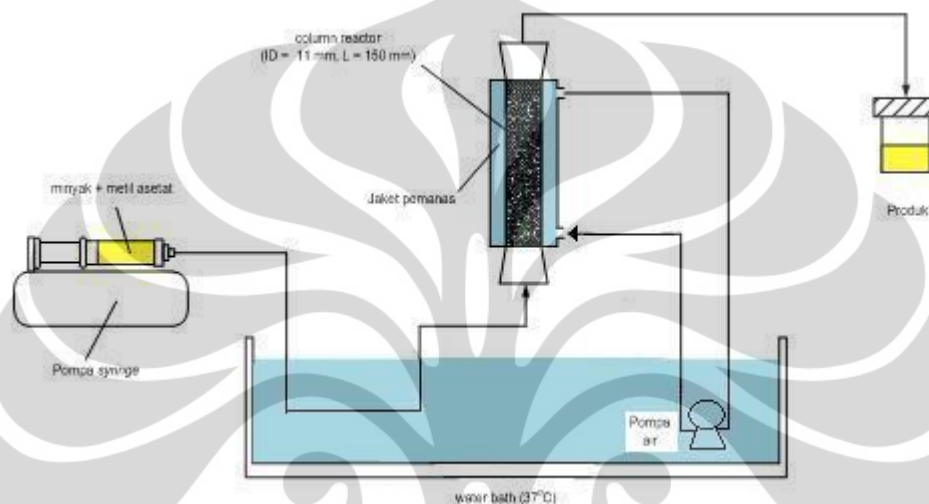


Gambar 3- 5 Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem *batch*

3.4.3 Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor Kontinyu

3.4.3.1 Set Up Reaktor Kontinyu

Pada reaksi kontinyu, sistem reaktor *packed bed* yang digunakan diadopsi dari pembuatan sistem reaktor oleh penelitian sebelumnya (Ayu, 2009; Wafa, 2009) dimana reaktor *packed bed* yang digunakan memiliki ketinggian 15 cm dan diameter 1,1 cm sebagai reaktor *packed bed* skala lab.

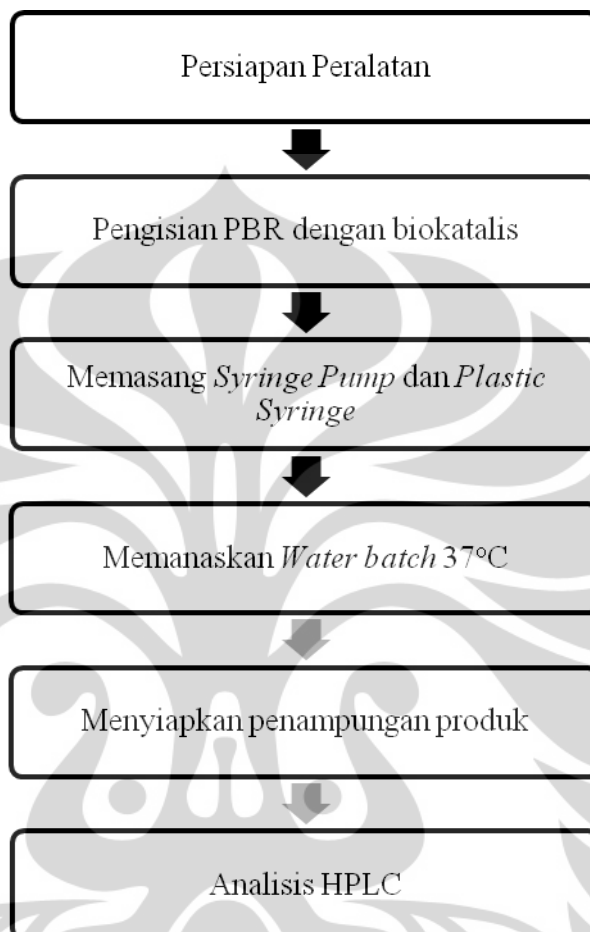


Gambar 3- 6 Skema alat yang digunakan untuk sintesis biodiesel kontinyu (Ayu, 2009)

Reaktor dibuat jaket dengan aliran air sebesar 37°C berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Risan (Surendro, 2008). Berikut ini adalah langkah-langkah dalam set-up reaktor kontinyu.

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

Untuk lebih jelasnya mengenai *set-up* reaktor kontinyu yang dilakukan, perhatikan Gambar 3-7



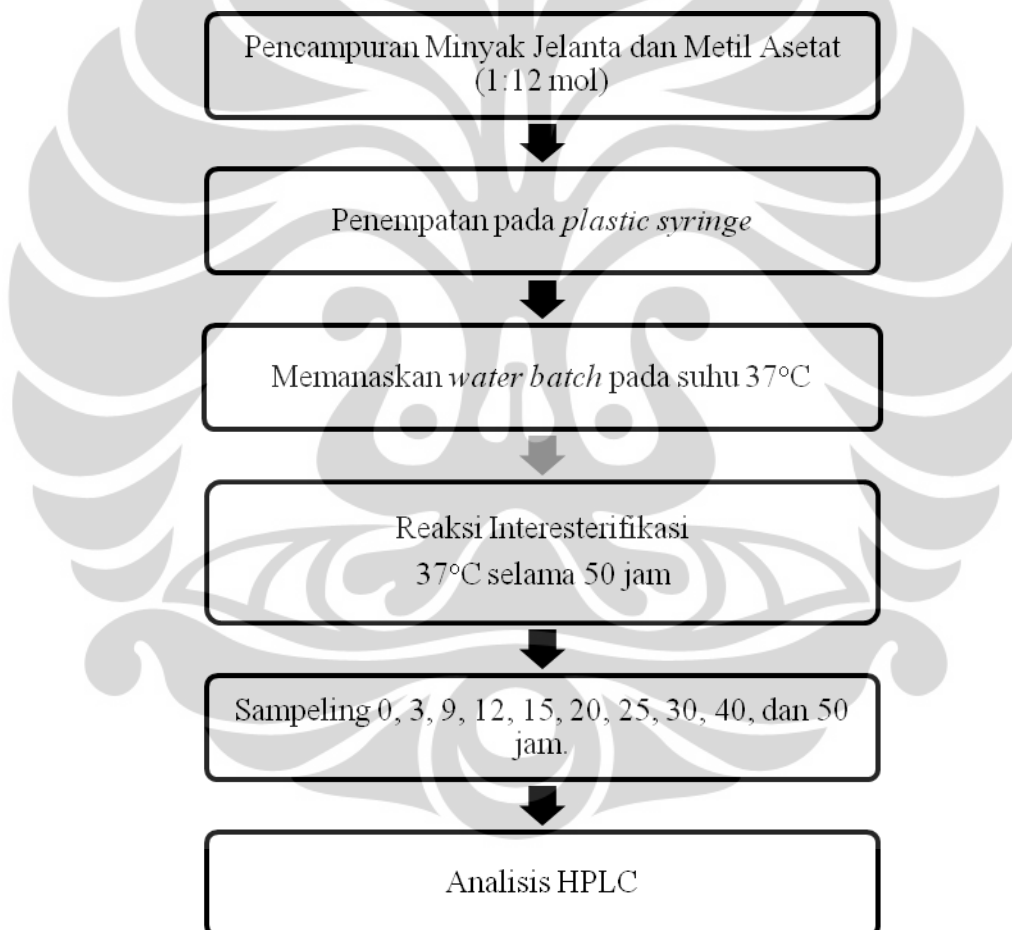
Gambar 3- 7 *Set up* reaktor kontinyu

3.4.3.2 Sintesis Biodiesel dalam Reaktor Kontinyu

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

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 2) Menyiapkan campuran substrat minyak jelanta dan metil asetat dengan perbandingan mol 1:12.

- 3) Mencampurkan minyak jelanta dan metil asetat kemudian dimasukan ke dalam *plastic syringe*.
- 4) Memanaskan larutan yang terbentuk dalam *water bath* yang suhunya 37°C .
- 5) Menguji stabilitas biokatalis dalam waktu 50 jam dengan aliran konstan 1 mL/jam. Sampel diambil pada waktu (jam) : 0, 3, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 40, dan 50 jam.
- 6) Setelah selesai, sampel dianalisa dengan HPLC untuk mengetahui konsentrasi dari biodiesel. Untuk lebih jelas lagi, dapat melihat bagan alir percobaan yang ditampilkan pada Gambar 3- 8.



Gambar 3- 8 Bagan prosedur pembuatan biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu

3.4.4 Variasi

Dalam penelitian ini, variasi dilakukan pada saat melakukan reaksi imobilisasi lipase dan dan pada tahap sintesis biodiesel rute non-alkohol. Pada Tabel 3-5 ditunjukkan keseluruhan dari variasi yang dilakukan.

Tabel 3- 5 Variasi yang dilakukan dalam penelitian

Imobilisasi dengan <i>Support</i> Kitin		
Variasi Rasio Massa	Variasi Waktu Imobilisasi	Variasi Konsentrasi TPP
Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 120menit; 1:8	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 1:7; 100 menit	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 1:7; 120 menit; 1%
Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 120menit; 1:7	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 1:7; 120 menit	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 1:7; 120 menit; 4%
Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 120menit; 1:6	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 1:7; 140 menit	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 1:7; 120 menit; 5%
Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 120menit; 1:5	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 1:7; 160 menit	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 1:7; 120 menit; 6%
Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 120menit; 1:4	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 8%; 1:7; 180 menit	Kitin 40mg/ml; lipase 35mg/ml; 1:7; 120 menit; 7%
Imobilisasi dengan <i>Support</i> Kitosan		
Variasi Rasio Massa	Variasi Waktu Imobilisasi	Variasi Konsentrasi TPP
Lipase 30mg/ml; 2%; 120menit; 1:8	Lipase 30mg/ml; 2%; 1:6; 50 menit	Lipase 30mg/ml; 1:6; 120 menit; 0,6%
Lipase 30mg/ml; 2%; 120menit; 1:7	Lipase 30mg/ml; 2%; 1:6; 75 menit	Lipase 30mg/ml; 1:6; 120 menit; 0,8%
Lipase 30mg/ml; 2%; 120menit; 1:6	Lipase 30mg/ml; 2%; 1:6; 100 menit	Lipase 30mg/ml; 1:6; 120 menit; 1%
Lipase 30mg/ml; 2%; 120menit; 1:5	Lipase 30mg/ml; 2%; 1:6; 120 menit	Lipase 30mg/ml; 1:6; 120 menit; 2%
Lipase 30mg/ml; 2%; 120menit; 1:4	Lipase 30mg/ml; 2%; 1:6; 150 menit	Lipase 30mg/ml; 1:6; 120 menit; 3%

Imobilisasi dengan <i>Support Zeolit</i> Variasi Perbandingan Enzim dan Zeolit	
2% Massa Enzim	
3% Massa Enzim	
4% Massa Enzim	
5% Massa Enzim	
6% Massa Enzim	
Sintesis Biodiesel	
Sistem Reaktor <i>Batch</i>	Sistem Reaktor Kontinyu
Lipase Terimobilisasi <i>Support Kitin</i>	Lipase Terimobilisasi <i>Support Kitin</i>
Lipase Terimobilisasi <i>Support Kitosan</i>	Lipase Terimobilisasi <i>Support Kitosan</i>
Lipase Terimobilisasi <i>Support Zeolit</i>	Lipase Terimobilisasi <i>Support Zeolit</i>

3.4.5 Analisa

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan biokatalis yang diperoleh melalui imobilisasi lipase menggunakan metode *entrapment* dengan *support kitin*, *support kitosan* dan *support zeolit* dan mendapatkan (%) yield biodiesel dari sintesis biodiesel. Analisa dilakukan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Pada kromatografi ini yang akan dideteksi adalah konversi dan *yield* produk yang dihasilkan pada sintesis biodiesel untuk mengetahui efektivitas penggunaan enzim dan variasi yang dilakukan. Banyaknya (%) *yield* biodiesel yang terbentuk dilihat dari kandungan metil-oleatnya. Komponen oleat digunakan karena mewakili jumlah komponen asam lemak terbesar didalam kandungan trigliserida. Tes analisa sampel menggunakan HPLC yang dilakukan di PUSPITEK (Pusat Penelitian dan Teknologi), Serpong-Tangerang. Data-data yang diperoleh dengan menggunakan HPLC kemudian dilakukan pengolahan data.

Tabel 3- 6 Data standar HPLC untuk sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol

Standar		Rute non-Alkohol	
Zat	Luas Area	Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi (mol/l)
T	282910	10,0000	0,00980027
D	180245	10,0000	0,014080144
M	2299722	10,0000	0,024909082
F	361909	100,0000	0,098002705

Keterangan :

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

$$\text{Konsentrasi (Trioleat)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Trioleat)}}{\text{Mr Trioleat}} \quad (3.3)$$

$$\text{Konsentrasi (Dioleat)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Dioleat)}}{\text{Mr Dioleat}} \quad (3.4)$$

$$\text{Konsentrasi (Mono-oleat)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Mono-oleat)}}{\text{Mr Mono-oleat}} \quad (3.5)$$

$$\text{Konsentrasi (Fatty Acid Metyl Ester)} = \frac{\text{Konsentrasi mg/L (Fatty Acid Metyl Ester)}}{\text{Mr Trioleat (Fatty Acid Metyl Ester)}} \quad (3.6)$$

Berikutnya adalah melakukan interpolasi terhadap luas area yang diperoleh dari percobaan terhadap luas area standar yang digunakan. Interpolasi dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi sampel secara akurat. Interpolasi dilakukan secara sederhana dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi sampel (mol/L)} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \text{konsentrasi standar (mol/L)} \quad (3.7)$$

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

$$\% \text{ mol balance} = \frac{3 \times C_{T,t=t} + 2 \times C_{D,t=t} + C_{M,t=t} + C_{B,t=t}}{3 \times C_{T,t=0} + 2 \times C_{D,t=0} + C_{M,t=0} + C_{B,t=0}} \times 100\% \quad (3.8)$$

Dari persamaan tersebut diperoleh konsentrasi biodiesel saat $t = t$. Untuk mendapatkan % *yield* biodiesel yang terbentuk maka konsentrasi biodiesel yang

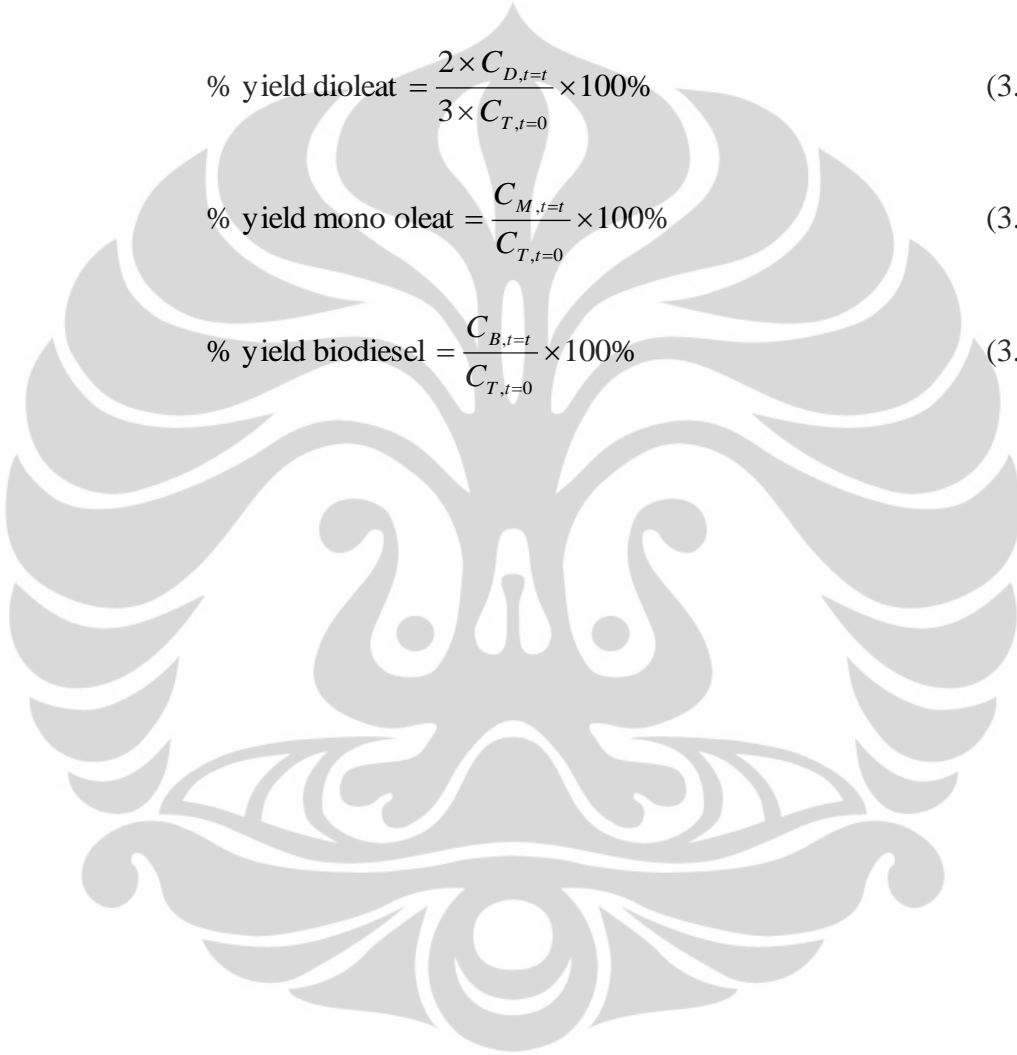
terbentuk dibandingkan dengan konsentrasi awal substrat. Pengertian % *yield* konsentrasi disini merupakan perbandingan konsentrasi produk terhadap konsentrasi awal substrat. Untuk mengetahui % konversi trioleat dan % *yield* untuk masing-masing komponen dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$\% \text{ konversi trioleat} = \frac{C_{T,t=0} - C_{T,t=t}}{C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (3.9)$$

$$\% \text{ yield dioleat} = \frac{2 \times C_{D,t=t}}{3 \times C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (3.10)$$

$$\% \text{ yield mono oleat} = \frac{C_{M,t=t}}{C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (3.11)$$

$$\% \text{ yield biodiesel} = \frac{C_{B,t=t}}{C_{T,t=0}} \times 100\% \quad (3.12)$$



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dibahas mengenai hasil imobilisasi lipase, penentuan enzim *loading*, sintesis *biodiesel*, hasil HPLC, dan penentuan *yield* *biodiesel*.

4.1 Hasil Imobilisasi Biokatalis Metode *Entrapment*

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mendapatkan kondisi operasi terbaik untuk melakukan imobilisasi *entrapment* dengan menggunakan setiap *support*, dimana lipase terimobilisasi yang terbaik akan diaplikasikan sebagai biokatalis dalam reaksi interesterifikasi untuk mensintesis *biodiesel* sistem *batch*.

4.1.1 Hasil *Entrapment Candida rugosa* lipase dalam Kitin

Penelitian ini menggunakan metode *entrapment* dalam *support*. Imobilisasi enzim dalam *support* merupakan metode untuk memaksimalkan penggunaan enzim agar dapat digunakan secara efektif. *Support* yang dipakai adalah kitin. Kitin digunakan sebagai *support* karena kitin merupakan senyawa organik yang waktu imobilisasi yang dibutuhkan memerlukan waktu beberapa jam untuk mengimobilisasi dan lebih singkat dibandingkan dengan *support* lain seperti zeolit (Daudi, 2012) dan karbon aktif (Bestari, 2012) yang membutuhkan waktu sekitar 5 hari untuk mengimobilisasi. Dalam penelitian ini, konsentrasi kitin dalam pelarut yang digunakan adalah 40 mg/mL. Konsentrasi ini dipilih karena merupakan konsentrasi yang paling ideal. Jika menggunakan kitin dengan konsentrasi di bawah 40 mg/ml, proses pembentukan gel yang terjadi tidak sempurna, artinya ketika campuran larutan enzim dan larutan kitin diteteskan ke dalam larutan TPP, bead tidak berhasil menggumpal dan akan langsung tercampur dengan larutan TPP. Selain itu, konsentrasi kitin di bawah 40 mg/ml juga membuat kitin kurang dapat menjerat enzim dengan sempurna.

Kitin diketahui sulit larut dalam pelarut yang umum digunakan akibat strukturnya yang kristalin (Dong et al., 2000) dan kitin tidak dapat larut dalam air, asam encer dan alkali dingin (Robert, 1990). Pelarut dengan asam organik adalah pelarut yang baik untuk melarutkan kitin (Muzarelli, 1998) dan (Austin, 1998). Maka pada saat melarutkan kitin, pelarut yang dipakai adalah asam fosfat 100%.

Ketika ditambahkan asam fosfat, kitin tidak langsung melarut. Oleh karena itu, dibutuhkan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 40°C. Pengadukan ini dilakukan dalam waktu yang cukup singkat, yaitu 5 menit, ini dilakukan agar kitin yang dihasilkan tidak terlalu encer (larutan dengan viskositas yang baik).

Sedangkan untuk enzim, dalam percobaan imobilisasi lipase ini, digunakan *Candida rugosa lipase* karena memiliki aktivitas yang baik. Hal ini telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Muharza (2011). Pada penelitian tersebut, digunakan *Candida rugosa lipase* dan *porcine pancreatic lipase*. Hasil yang didapatkan pada penelitian tersebut adalah konversi maksimum dari reaksi yang menggunakan katalis *Candida rugosa lipase* lebih besar yaitu 60,59% dibandingkan dengan *porcine pancreatic lipase* sebesar 24,01%. Pada penelitian ini, lipase yang akan diimobilisasi dilarutkan dalam buffer fosfat sebanyak 2ml dengan konsentrasi 35 mg/mL.

Larutan enzim dan larutan *support* kemudian dicampurkan sesuai dengan perbandingan dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 5 menit. Kemudian ditetaskan dalam larutan tripoliposfat (TPP). Berikut ini merupakan gambar campuran larutan enzim dan *support* pada awal penetesan ke dalam larutan TPP.



Gambar 4-1 Campuran larutan enzim dan *support* dalam TPP

Proses imobilisasi berlangsung selama beberapa menit, kemudian bead kitin hasil imobilisasi disaring dan disimpan di dalam kulkas untuk untuk sintesis biodiesel. Sedangkan filtrat dari proses ini akan diukur enzim *loadingnya*. Pada Gambar 4-2 ditunjukkan hasil imobilisasi dalam *support* kitin.



Gambar 4-2 Lipase terimobilisasi dalam kitin

Pengukuran enzim *loading* ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar enzim yang terjebak pada *support* dalam proses imobilisasi. Cara yang digunakan untuk mengetahui enzim yang terimobilisasi adalah dengan mengukur konsentrasi enzim sebelum dan sesudah imobilisasi. Penentuan konsentrasi ini dilakukan dengan metode Lowry dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm, dimana nilai yang diukur adalah nilai absorbansi konsentrasi enzim yang terdapat pada filtrat (tidak terimobilisasi). Setelah nilai absorbansi pada filtrat diketahui, konsentrasi enzim sesudah imobilisasi dapat diketahui dari kurva kalibrasi yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian untuk menghitung seberapa besar enzim yang terimobilisasi digunakan Persamaan (3.1). Dan persentase enzim *loading* dapat dicari dengan dengan Persamaan (3.2).

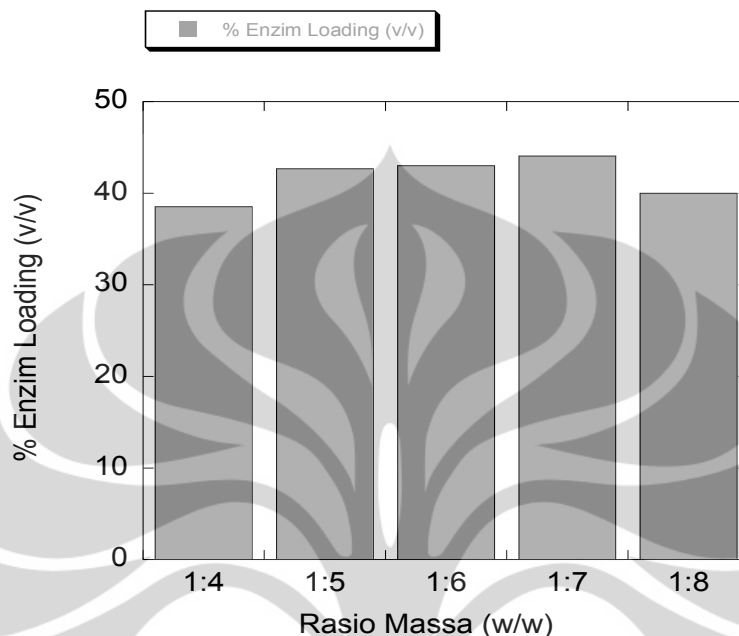
4.1.1.1 Efek Variasi Massa

Pada penelitian ini, dilakukan beberapa variasi rasio massa yaitu: 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, dan 1:4. Variasi ini dilakukan pada kondisi konsentrasi kitin 40 mg/ml, konsentrasi lipase 35 mg/ml, konsentrasi TPP 8% dan waktu imobilisasi 120 menit. Berikut ini merupakan hasil enzim *loading* yang didapatkan:

Tabel 4-1 Enzim *loading* pada *support* kitin dengan variasi rasio massa

Rasio massa (w/w)	% enzim <i>loading</i> (v/v)
1:8	39,98
1:7	44,07
1:6	42,99
1:5	42,67
1:4	38,53

Keberhasilan imobilisasi dapat dilihat dari besarnya enzim *loading* yang terukur. Berikut ini merupakan grafik rasio massa dengan enzim *loading* yang didapatkan :



Gambar 4- 3 Hasil enzim *loading* dengan *support* kitin pada variasi rasio massa

Dari Tabel 4-1 dan Gambar 4-3, dapat dilihat bahwa persentase enzim *loading* yang paling besar berasal dari variasi massa 1:7. Dimana pada variasi ini, enzim *loading* yang didapatkan adalah 44,07%. Pada nilai ini dapat diketahui bahwa imobilisasi yang paling optimum dilakukan pada rasio 1:7. Kitin yang digunakan pada rasio 1:7 dapat menjerat lebih banyak enzim dibandingkan dengan pada rasio lain karena jumlah jaringan polimerik pada kitin yang sesuai dengan jumlah enzim. Pada rasio 1:4 sampai 1:7, ketika semakin banyak jumlah *support*, enzim *loading* akan semakin besar. Ini disebabkan oleh semakin banyak pori-pori sebagai tempat tertahannya enzim. Enzim akan terperangkap di dalam kisi-kisi matriks polimer dan tertahan saat terjadi penetrasi substrat. Pada rasio massa di atas 1:7, kemampuan kitin menjerat enzim mulai kurang baik, ini dapat dilihat dari enzim *loading* yang semakin menurun, yaitu 39,983%. Penurunan ini juga terjadi karena banyaknya jumlah asam fosfat yang dipakai sehingga dapat merusak jaringan polimerik pada kitin. Jaringan kitin akan terbuka lebar dan menyatu dengan jaringan lain, enzim yang terjerat juga ikut keluar dari pori-pori sehingga kitin tidak dapat menjerat enzim dengan baik.

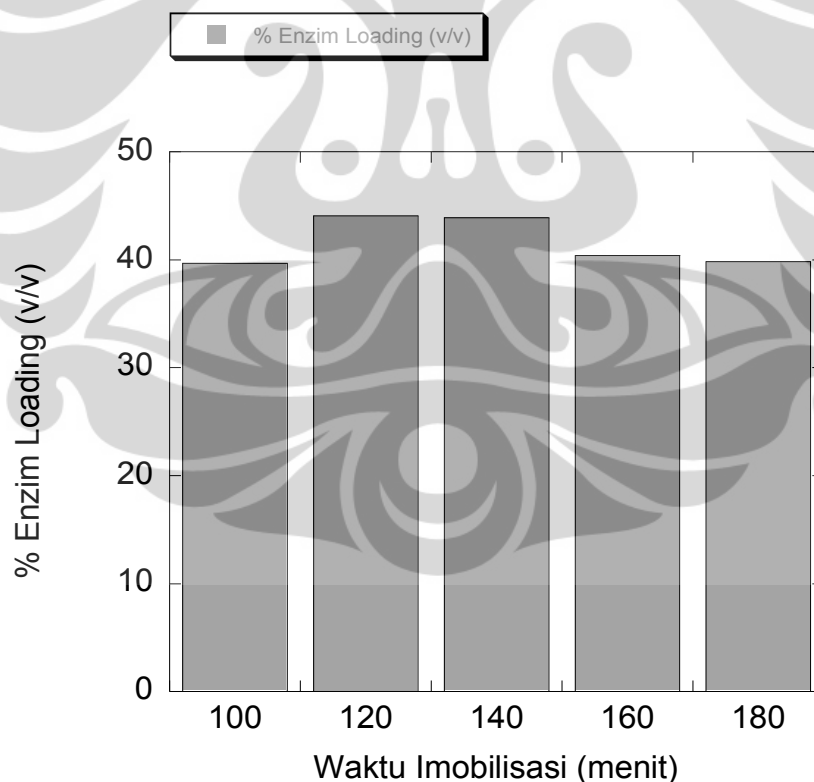
4.1.1.2 Efek Variasi Waktu

Selain variasi rasio massa, dilakukan juga variasi waktu imobilisasi, dimana ada 5 titik yang dilakukan, yaitu : 100 menit, 120 menit, 140 menit, 160 menit, dan 180 menit. Variasi ini dilakukan pada kondisi konsentrasi kitin 40 mg/ml, konsentrasi lipase 35 mg/ml, rasio massa 1:7 dan konsentrasi TPP 8%. Berikut ini merupakan hasil enzim *loading* yang didapatkan untuk setiap variasi :

Tabel 4-2 Enzim *loading* pada *support* kitin dengan variasi waktu imobilisasi

Waktu imobilisasi (menit)	% enzim <i>loading</i> (v/v)
100	39,68
120	44,07
140	43,90
160	40,38
180	39,83

Berikut ini merupakan gambar hasil enzim *loading* yang dihasilkan :



Gambar 4- 4 Hasil enzim *loading* dengan *support* kitin pada variasi waktu imobilisasi

Waktu imobilisasi terbaik yang dihasilkan adalah 120 menit. Pada titik ini, kitin dapat menjebak enzim lipase dengan baik. Selain itu pada waktu imobilisasi 120 menit, proses *gelation* (proses pembentukan bead terjadi dengan sempurna). Ini dapat dilihat dari hasil bead kitin yang tidak mudah hancur. Pada waktu imobilisasi yang lebih besar dari 120 menit, kemampuan kitin dalam menjerat lipase lama kelamaan akan berkurang. Lamanya waktu imobilisasi juga membuat terjadinya difusi dan kebocoran pada sistem *gel entrapped*. Enzim lipase yang sudah terjat di dalam jaringan polimerik kitin akan lepas seiring dengan bertambahnya waktu imobilisasi. Untuk itu waktu imobilisasi yang tepat sangat diperlukan untuk mengoptimasi distribusi lipase di dalam bead.

4.1.1.3 Efek Variasi Konsentrasi TPP

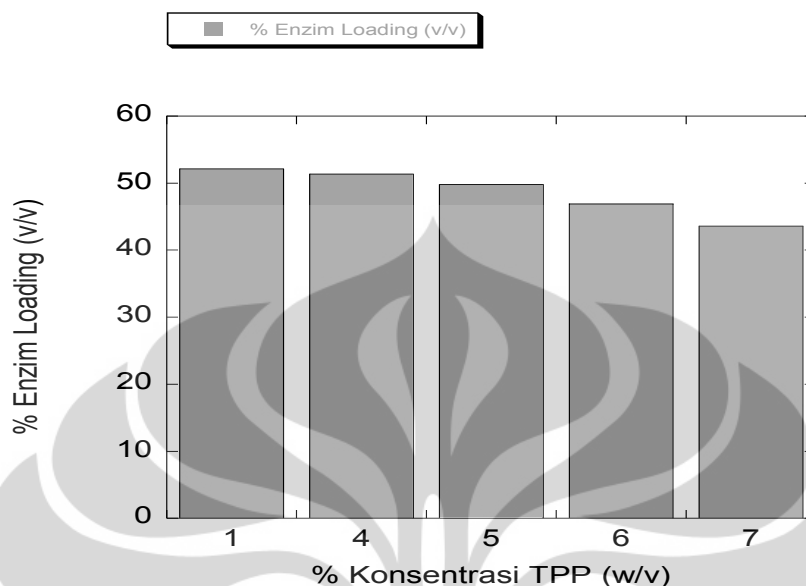
Pada variasi konsentrasi TPP dilakukan 5 variasi yaitu: 1%, 4%, 5%, 6%, dan 7%. Variasi ini dilakukan pada kondisi konsentrasi kitin 40 mg/ml, konsentrasi lipase 35 mg/ml, rasio massa 1:7 dan waktu imobilisasi 120 menit. Berikut ini merupakan hasil enzim *loading* yang didapatkan untuk setiap variasi :

Tabel 4-3 Enzim *loading* pada *support* kitin dengan variasi konsentrasi TPP

% Konsentrasi TPP (w/v)	% enzim <i>loading</i> (v/v)
1	52,14
4	51,36
5	49,81
6	46,90
7	43,58

Enzim *loading* terbesar yang dihasilkan pada variasi konsentrasi TPP adalah 52,141%. Enzim *loading* ini dihasilkan pada konsentrasi TPP 1%. Pada konsentrasi TPP 1%, proses imobilisasi berlangsung dengan optimal, dimana bead dapat terbentuk dan enzim *loading* yang dihasilkan juga merupakan enzim *loading* yang terbesar. Ketika konsentrasi kitin dinaikkan, enzim *loading* yang didapatkan akan semakin menurun. Ini disebabkan karena jumlah TPP yang berlebihan, yang membuat TPP ikut menarik enzim lipase pada kitin.

Berikut ini merupakan grafik konsentrasi TPP dengan enzim *loading* yang didapatkan:



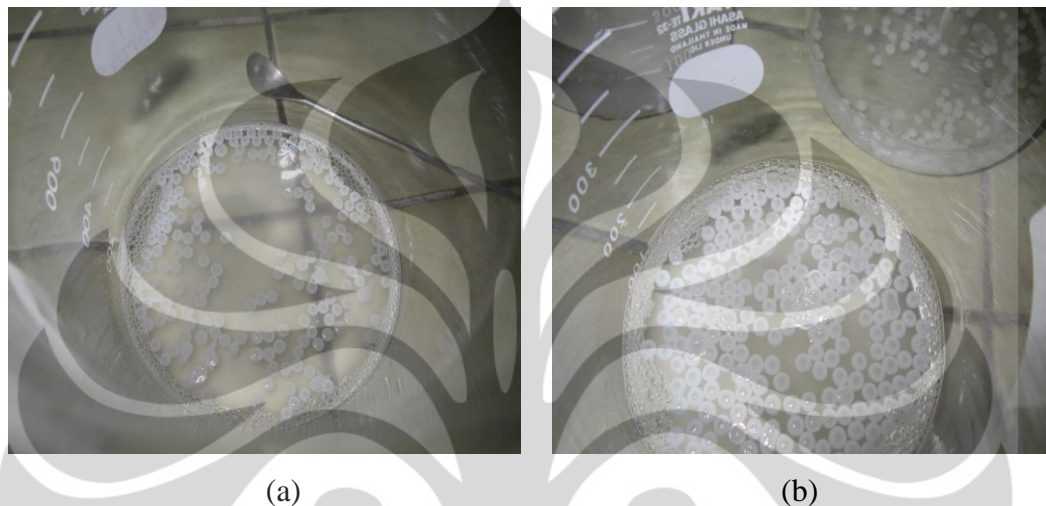
Gambar 4- 5 Hasil enzim *loading* dengan *support* kitin pada variasi konsentrasi TPP

4.1.2 Hasil *Entrapment Candida rugosa* lipase dalam Kitosan

Imobilisasi dengan *support* kitosan, sebelumnya sudah dilakukan oleh Kharistiananda (2012). Pada pembahasan awal, kitosan dipakai sebagai *support* karena kitosan memiliki suatu kemampuan menyerap yang baik dan memiliki kemampuan untuk melindungi (Neau et al., 2002). Selain itu, waktu imobilisasi yang dibutuhkan lebih singkat daripada *support lain* seperti zeolit atau karbon aktif yang membutuhkan waktu sekitar tujuh hari untuk mengimobilisasi sedangkan waktu yang dibutuhkan kitosan yang hanya beberapa jam (Kharistiananda, 2012). Aktivitas kitosan juga lebih baik dibandingkan dengan polisakarida lain seperti agarosa dan Ca-alginat *bead*, dimana aktivitas Ca-alginat *bead* hanya 240 unit/mL, kitosan mencapai 1110 unit/mL (Neau et al., 2002).

Pada percobaan imobilisasi dengan *support* kitosan, prosedur yang dilakukan hampir sama dengan prosedur untuk kitin. Ini disebabkan oleh struktur kitosan yang hampir sama dengan kitin karena kitosan itu sendiri merupakan turunan dari kitin yang diperoleh dari deasetilasi kitin (Neau et al., 2002). Pada imobilisasi dengan kitosan, pelarut yang digunakan adalah asam atetat 2% (m/v) (Kharistiananda, 2012) dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*

pada suhu 40°C. Pengadukan ini dilakukan untuk mempercepat yang dilakukan pada suhu 40°C agar ikatan yang terdapat pada kitosan tidak putus. Sedangkan konsentrasi lipase yang dipakai sebesar 30mg/ml, yang dilarutkan dalam asam fosfat ber-pH 7. Berikut ini merupakan gambar campuran larutan enzim dan larutan *support* pada awal penetesan ke dalam larutan TPP dan setelah waktu imobilisasi beberapa menit.



Gambar 4- 6 Campuran larutan enzim dan larutan *support* (a) awal penetesan dalam larutan TPP (b) setelah penetesan beberapa menit dalam larutan TPP

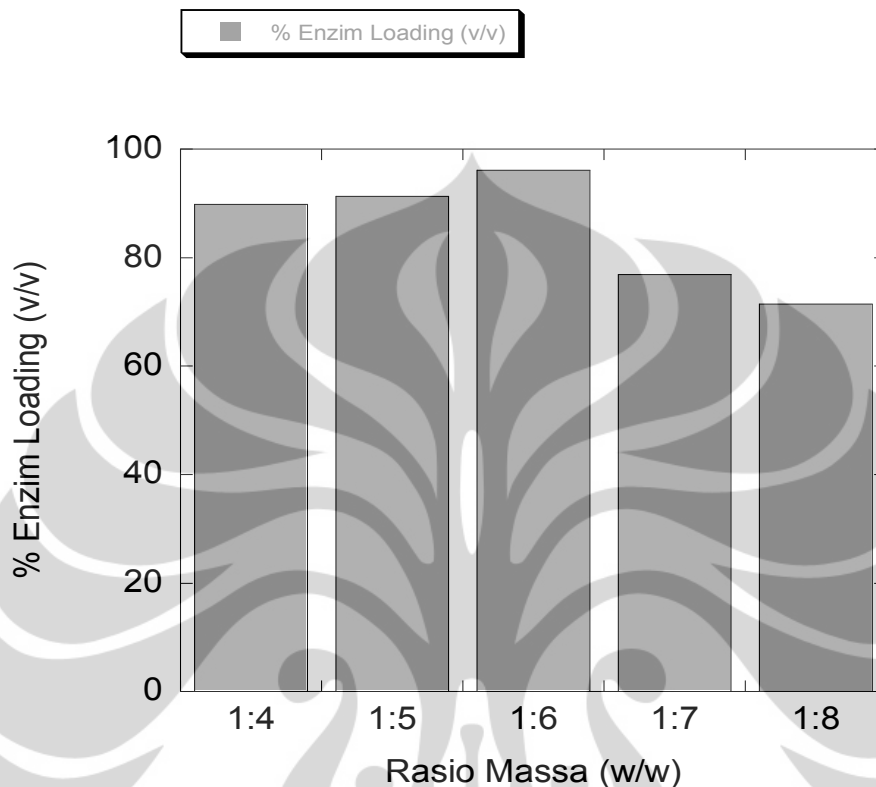
4.1.2.1 Efek Variasi Massa

Pada penelitian ini, dilakukan beberapa variasi rasio massa yaitu: 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, dan 1:8. Variasi ini dilakukan pada konsentrasi lipase 30 mg/ml, konsentrasi TPP 2% dan waktu imobilisasi 120 menit. Berikut ini merupakan hasil enzim *loading* yang didapatkan:

Tabel 4-4 Enzim *loading* pada *support* kitosan dengan variasi rasio massa

Rasio Massa	% Enzim <i>Loading</i>
(w/w)	(v/v)
1:4	89,83
1:5	91,34
1:6	96,13
1:7	76,87
1:8	71,47

Keberhasilan imobilisasi dapat dilihat dari besarnya enzim *loading* yang terukur. Pada Gambar 4-7 ditunjukkan pengaruh rasio massa pada enzim *loading* yang didapatkan :



Gambar 4- 7 Hasil enzim *loading* dengan *support* kitosan pada variasi rasio massa

Pada Gambar 4-7, dapat dilihat bahwa enzim *loading* yang terbesar didapatkan pada variasi 1:6. Pada kondisi dengan variasi 1:4 dan 1:5, enzim *loading* yang dihasilkan sudah cukup besar, tetapi range kenaikan enzim *loading* yang didapat kecil. Pada percobaan sebelumnya yang dilakukan oleh Kharistiananda (2012), pada konsentrasi yang sama dengan kenaikan jumlah *support*, kenaikan (range) enzim *loading* yang didapatkan juga kecil (tidak terlalu signifikan). Selain itu, pada percobaan (Neau, 2002) juga dihasilkan range yang kecil. Maka, pada keadaan 1:4 sampai 1:6, semakin banyak *support* yang digunakan, semakin besar juga enzim *loading*-nya.

Pada kondisi dengan variasi 1:7 dan 1:8, ketika massa kitosan dinaikkan, enzim *loading* yang dihasilkan akan semakin berkurang. Pengurangan ini disebabkan karena banyaknya pori-pori dalam kitin, sehingga antar pori-pori akan tertutupi oleh pori-pori lain dan enzim tidak dapat masuk/terjerat.

4.1.2.2 Efek Variasi Waktu

Selain variasi rasio massa, dilakukan juga variasi waktu imobilisasi, dimana ada 5 titik yang dilakukan, yaitu : 50 menit, 75 menit, 100 menit, 120 menit, dan 150 menit. Variasi ini dilakukan pada konsentrasi lipase 30 mg/ml, rasio massa 1:6 dan konsentrasi TPP 2%. Berikut ini merupakan hasil enzim *loading* yang didapatkan untuk setiap variasi :

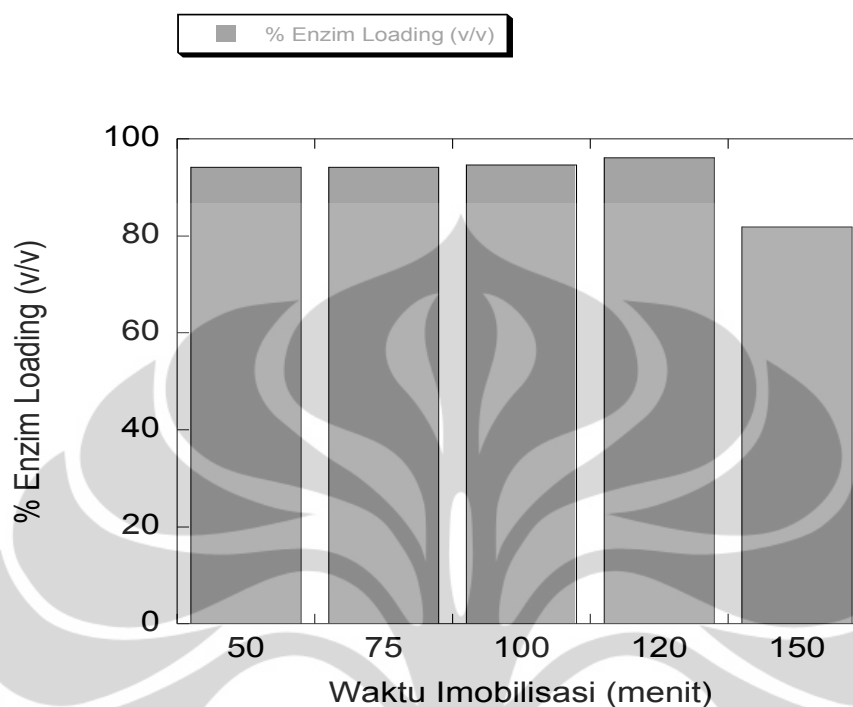
Tabel 4-5 Enzim *loading* pada *support* kitosan dengan variasi waktu imobilisasi

Waktu Imobilisasi (menit)	% Enzim Loading (v/v)
50	94,15
75	94,15
100	94,65
120	96,13
150	81,87

Dari tabel diatas, dapat diketahui bahwa pada waktu imobilisasi 50 menit enzim *loading* yang didapatkan adalah 94,15%, waktu imobilisasi 75 menit enzim *loading* yang didapatkan adalah 94,15%, waktu imobilisasi 100 menit enzim *loading* yang didapatkan adalah 94,65%, waktu imobilisasi 120 menit enzim *loading* yang didapatkan adalah 96,13%, dan pada waktu imobilisasi 150 menit enzim *loading* yang didapatkan adalah 81,87%.

Waktu imobilisasi terbaik yang dihasilkan adalah 120 menit. Pada titik ini, kitosan dapat menjebak enzim lipase dengan baik. Selain itu pada waktu imobilisasi 120 menit, proses *gelation* (proses pembentukan bead terjadi dengan sempurna). Ini dapat dilihat dari hasil bead kitosan yang tidak mudah hancur. Pada waktu imobilisasi yang lebih besar dari 120 menit, kemampuan kitosan dalam menjerat lipase lama kelamaan akan berkurang. Lamanya waktu imobilisasi juga membuat terjadinya difusi dan kebocoran pada sistem *gel entrapped*. Enzim lipase yang sudah terjat di dalam jaringan polimerik kitosan akan lepas seiring dengan bertambahnya waktu imobilisasi.

Berikut ini merupakan grafik waktu imobilisasi dengan enzim *loading* yang didapatkan :



Gambar 4- 8 Hasil enzim *loading* dengan *support* kitosan pada variasi waktu imobilisasi

4.1.2.3 Efek Variasi Konsentrasi TPP

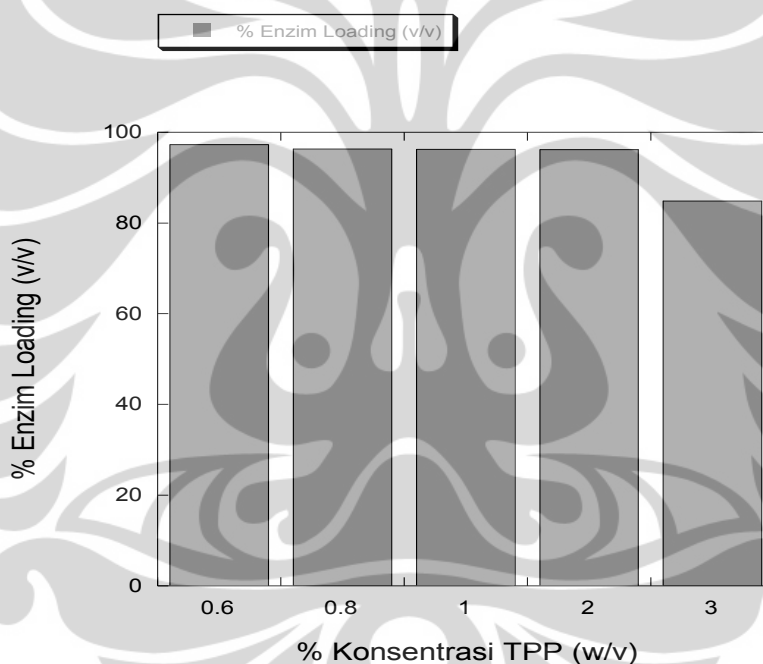
Pada variasi konsentrasi TPP dilakukan 5 variasi yaitu: 0.6%, 0.8%, 1%, 2%, dan 3%. Variasi ini dilakukan konsentrasi lipase 30 mg/ml, rasio massa 1:6 dan waktu imobilisasi 120 menit. Berikut ini merupakan hasil enzim *loading* yang didapatkan untuk setiap variasi :

Tabel 4-6 Enzim *loading* pada *support* kitosan dengan variasi konsentrasi TPP

% Konsentrasi TPP (w/v)	% Enzim Loading (v/v)
0,6	97,24
0,8	96,34
1	96,24
2	96,13
3	84,82

Enzim *loading* terbesar yang dihasilkan pada variasi konsentrasi TPP adalah 97,24%. Enzim *loading* ini dihasilkan pada konsentrasi TPP 0,6%. Pada konsentrasi TPP 0,6%, proses imobilisasi berlangsung dengan optimal, dimana bead dapat terbentuk dan enzim *loading* yang dihasilkan juga besar. Proses terbentuknya bead ini terjadi karena terjadi *cross-linking* antara kitosan yang bermuatan positif dengan TPP yang bermuatan negatif (Neau., et al, 2004). Ketika konsentrasi kitosan dinaikkan, enzim *loading* yang didapatkan akan semakin menurun. Ini disebabkan karena jumlah TPP yang berlebihan, yang membuat TPP ikut menarik enzim lipase pada kitosan.

Berikut ini merupakan grafik konsentrasi TPP dengan enzim *loading* yang didapatkan:

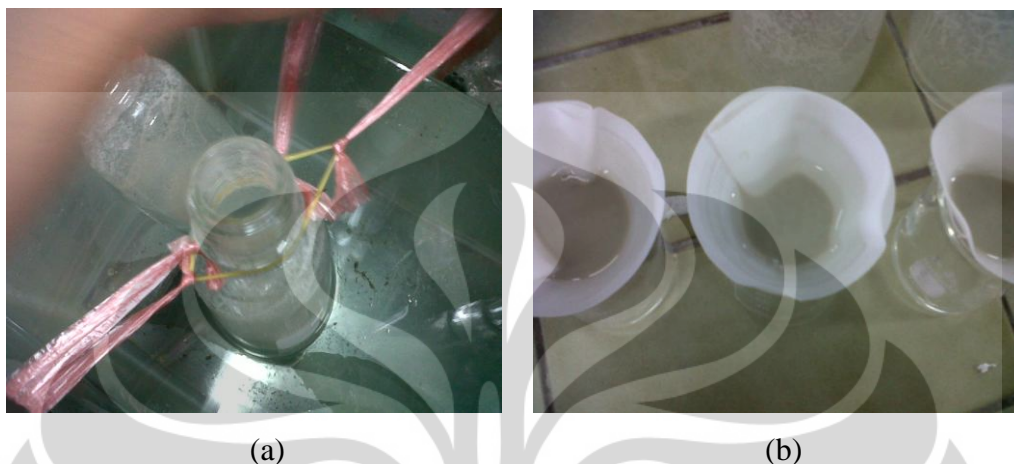


Gambar 4- 9 Hasil enzim *loading* dengan *support* kitosan pada variasi konsentrasi TPP

4.1.3 Hasil *Entrapment Candida rugosa* lipase dalam Zeolit

Pada imobilisasi lipase menggunakan *support* zeolit, variasi yang dilakukan berupa variasi perbandingan enzim dan zeolit. Rasio enzim dan *support* yang diujikan dalam percobaan ini dimulai dari 2% , 3%, 4%, 5%, dan 6% dari massa enzim, sedangkan massa *support* merupakan sisanya. Enzim yang digunakan sebelumnya telah dilarutkan dengan buffer fosfat dengan pH 7 dan untuk agen

pengemulsinya digunakan larutan NaF 0.05 M. Agen pengemulsi ini berfungsi untuk mengemulsi enzim agar dapat melekat sempurna pada pori-pori zeolit sehingga proses imobilisasi dapat berlangsung dengan baik. Berikut ini merupakan gambar percobaan imobilisasi dengan *support* zeolit.



Gambar 4- 10 Prosedur percobaan (a) inkubasi dalam *water bath* (b) filtrasi lipase terimobilisasi dalam larutan

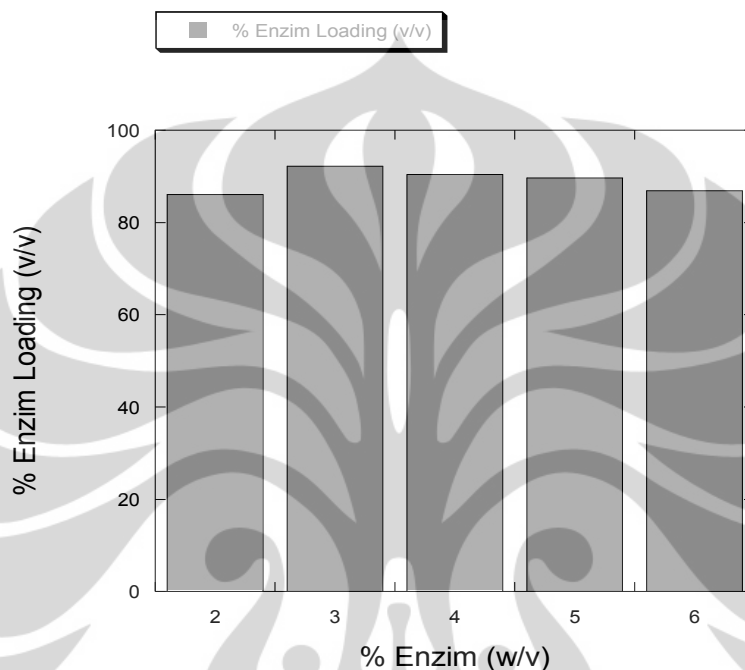
Enzim lipase akan terperangkap sempurna pada pori-pori zeolit. Pada tabel berikut ini ditampilkan nilai enzim *loading* untuk masing-masing kondisi:

Tabel 4-7 Enzim *loading* pada *support* zeolit dengan variasi massa enzim

% Enzim (w/v)	% Enzim Loading (v/v)
2	86,06
3	92,16
4	90,41
5	89,70
6	86,89

Ketika massa enzim mulai dinaikkan lebih dari 3%, enzim *loading* yang dihasilkan semakin berkurang seiring dengan besar massa enzim yang ditambahkan. Ini menunjukkan bahwa pada rasio massa enzim lebih dari 3%, pori-pori zeolit sudah mengalami penurunan kekuatan menjerat sehingga tidak mampu lagi menjerat enzim dengan baik.

Selain itu, jumlah enzim yang dipakai berlebihan, tidak sebanding dengan jumlah pori-pori pada zeolit, sehingga ada enzim yang dapat terperjat dan ada enzim yang tidak dapat terperjat karena pori-pori zeolit sudah dipenuhi oleh enzim. Gambar4-11 menunjukkan grafik perubahan massa enzim terhadap enzim *loading* yang dihasilkan :



Gambar 4- 11 Hasil enzim *loading* pada imobilisasi dengan *support* zeolit

Pada Gambar4-11 dapat dilihat, bahwa hasil enzim *loading* terbesar berada pada rasio enzim 3% massa enzim dan 97% massa *support* dengan enzim *loading* sebesar 92,16%. Enzim *loading* yang dihasilkan pada penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan enzim *loading* yang dihasilkan pada penelitian sebelumnya (Daudi, 2012). Pada penelitian Daudi (2012), enzim *loading* yang dihasilkan sebesar 79,78%, dimana nilai ini juga dihasilkan pada rasio enzim yang sama, yaitu 3% massa enzim dan 97% massa *support*. Rasio enzim ini merupakan kondisi optimal dari imobilisasi yang dilakukan. Pada kondisi ini, pori-pori zeolit dapat menjerat enzim lipase dan menahannya dengan baik.

4.2 Hasil Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor *Batch*

Tujuan dari sintesis biodiesel adalah untuk mengetahui *yield* biodiesel yang dihasilkan melalui rute non-alkohol. Enzim yang dipakai berupa lipase

terimobilisasi pada *support* kitin, *support* kitosan dan *support* zeolit. Berikut ini merupakan gambar lipase terimobilisasi dalam *support* kitosan.



(a)

(b)

Gambar 4-12 Lipase terimobilisasi (a) dalam *support* kitosan (b) dalam *support* zeolit

Pada tahap sintesis biodiesel, trigliserida yang dipakai berasal dari minyak jelantah dengan satu kali penggorengan. Minyak jelantah merupakan limbah dan bila ditinjau dari komposisi kimianya, minyak jelantah mengandung senyawa-senyawa yang bersifat karsinogenik, yang terjadi selama proses penggorengan. Pemakaian minyak jelantah yang berkelanjutan dapat merusak kesehatan manusia, menimbulkan penyakit kanker, dan akibat selanjutnya dapat mengurangi kecerdasan generasi berikutnya. Untuk itu lah dipakai minyak jelantah, agar limbah ini dapat bermanfaat dan tidak menimbulkan kerugian dari aspek kesehatan manusia dan lingkungan. Sementara itu, pensuplai gugus metil digantikan dengan metil asetat. Penggantian alkohol dengan metil asetat ini mampu meningkatkan stabilitas enzim selama proses reaksi secara signifikan.

Pada penelitian ini dilakukan variasi waktu reaksi, yaitu pada waktu 0 jam, 3 jam, 6 jam, 9 jam, 12 jam, 15 jam, 20 jam, 25 jam, 30 jam, 40 jam dan 50 jam dan hasil dari reaksi dalam sintesis ini akan dianalisis untuk mengetahui *yield* biodiesel yang dihasilkan. Analisis yang dipakai adalah HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) yang didasarkan oleh sifat fasa sampel yang berbentuk liquid. Aktivitas enzim sebagai biokatalis dapat dilihat pada banyaknya biodiesel yang terbentuk, dimana pada kurva hasil HPLC biodiesel ditandai dengan luas area dari kandungan metil oleat. Oleat dipakai sebagai acuan karena oleat merupakan komponen asam lemak terbesar dari senyawa trigliserida.

Berikut ini ditampilkan gambar dari sintesis biodiesel dalam reaktor *batch* :



(a)

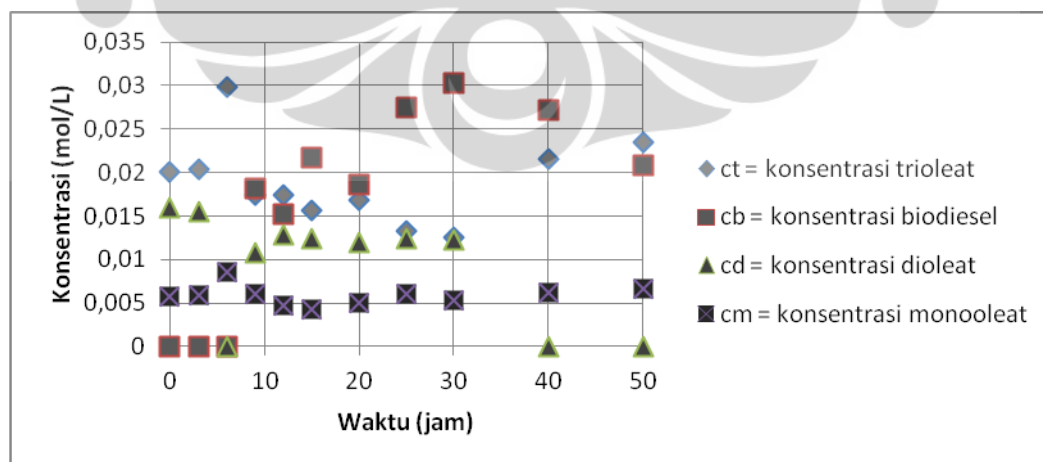
(b)

Gambar 4-13 Sintesis biodiesel dalam reaktor *batch* (a) minyak jelanta, metil asetat dan lipase terimobilisasi yang dicampurkan dalam Scotch Duran (b) reaksi interesterifikasi pada suhu 37°C dalam *shaking water bath*

4.2.1 Sintesis Biodiesel dengan Lipase Terimobilisasi dalam Kitin

Pada tahap ini, enzim yang dipakai berasal dari lipase terimobilisasi dalam *support* kitin. Lipase terimobilisasi yang dipakai merupakan lipase dengan enzim *loading* yang terbesar pada tahap imobilisasi dengan *entrapment*, dimana enzim *loading* yang dihasilkan 52,141 %. Lipase terimobilisasi ini dihasilkan pada *entrapment* dengan kondisi konsentrasi kitin 40 mg/ml, lipase 35 mg/ml, rasio massa 1:7, waktu imobilisasi 120 menit dan pada konsentrasi TPP 1%.

Pada Gambar 4-14 berikut ini ditunjukkan banyaknya komponen trioleat, dioleat, monooleat dan biodiesel yang terbentuk :



Gambar 4- 14 Konsentrasi masing-masing komponen dalam reaksi sintesis biodiesel menggunakan *support* kitin

Konsentrasi trioleat mengalami penurunan dan konsentrasi biodiesel mengalami kenaikan seiring waktu reaksi. Pada teori laju reaksi pembentukan produk, suatu produk yang terbentuk semakin besar jika waktu reaksi yang digunakan semakin lama. Ini menunjukkan bahwa terjadi pembentukan biodiesel, dimana trioleat bereaksi menjadi metil oleat. Tabel 4-8 menunjukkan *yield* biodiesel hasil sintesis dengan lipase terimobilisasi dalam kitin.

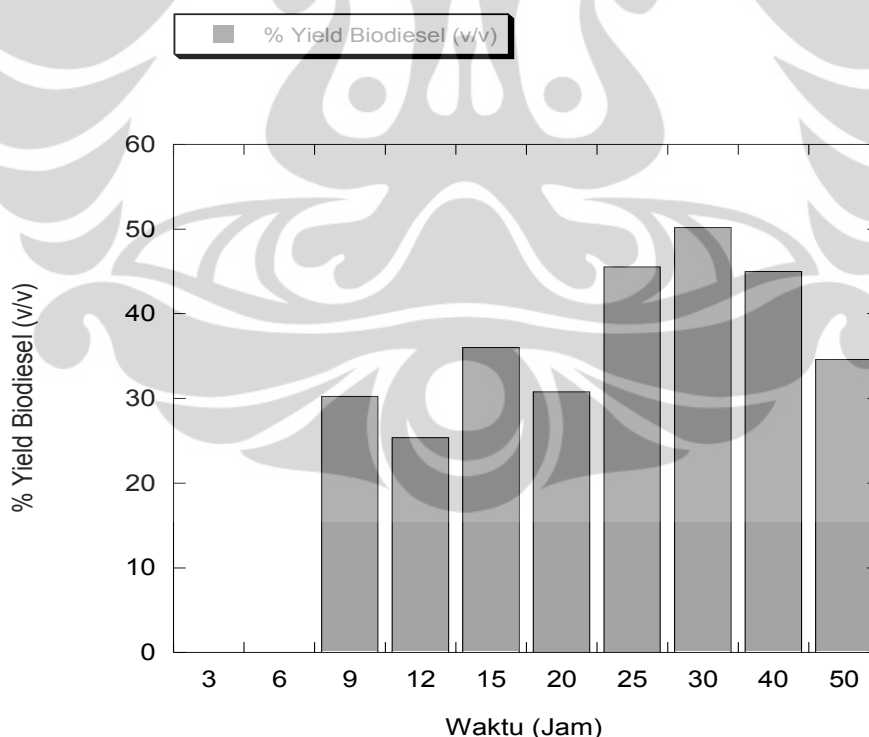
Tabel 4- 8 *Yield* biodiesel yang dihasilkan pada sintesis lipase terimobilisasi dalam kitin

Waktu Reaksi (jam)	% <i>Yield</i> Biodiesel (v/v)
3	0
6	0
9	30,23
12	25,34
15	36,02
20	30,80
25	45,57
30	50,17
40	45,00
50	34,59

Pada waktu reaksi 3 dan 6 jam, belum terjadi reaksi pembentukan biodiesel. Ini dilihat dari hasil HPLC, dimana pada waktu reaksi 3 dan 6 jam, metil oleat belum terbentuk. Biodiesel terbentuk pada waktu reaksi 9 jam ketika luas area metil oleat telah terbentuk dan reaksi interesterifikasi mulai berlangsung. Kitin sudah memperkenankan substrat minyak jelanta dan metil asetat melewati pori-pori kitin sehingga dapat berhubungan langsung dengan lipase, namun kitin juga tetap menahan lipase. Lipase yang terjebak pada kitin mulai bekerja sebagai katalis, yaitu mempercepat reaksi interesterifikasi. Minyak jelanta akan bereaksi dengan metil asetat dan membentuk metil oleat dan triasetilgliserol.

Pada hasil sintesis biodiesel, *yield* biodiesel terbesar dihasilkan pada waktu reaksi 30 jam, yaitu 50,17%. Pada waktu 30 jam, reaksi interesterifikasi berlangsung secara maksimal. Semua pori-pori kitin telah terbuka secara optimal, jadi minyak jelanta dan metil asetat berhubungan dengan lipase secara maksimal dan enzim lipase juga bekerja secara optimal, sehingga laju reaksi interesterifikasi berjalan optimal. Pada waktu setelah 30 jam, lama kelamaan *yield* biodiesel akan tetap atau tidak mengalami pembentukan lagi yang dapat dilihat pada *yield* biodiesel waktu reaksi 40 jam yaitu 45% dan *yield* biodiesel waktu reaksi 50 jam yaitu 34,59%. Biokatalis telah mengalami deaktivasi sehingga tidak memiliki kemampuan untuk membentuk biodiesel. (Christopel, 2012).

Sintesis biodiesel dengan *support* kitin juga dinilai memiliki kestabilan yang buruk. Ini dapat dilihat pada Gambar 4-15, *yield* biodiesel yang dihasilkan terkadang naik dan terkadang turun. Ini disebabkan karena enzim terimobilisasi yang kurang baik pada kitin, pengikatan/terperangkapnya enzim menggunakan kitin mudah membuka, sehingga stabilisasi konformasi enzimnya buruk.

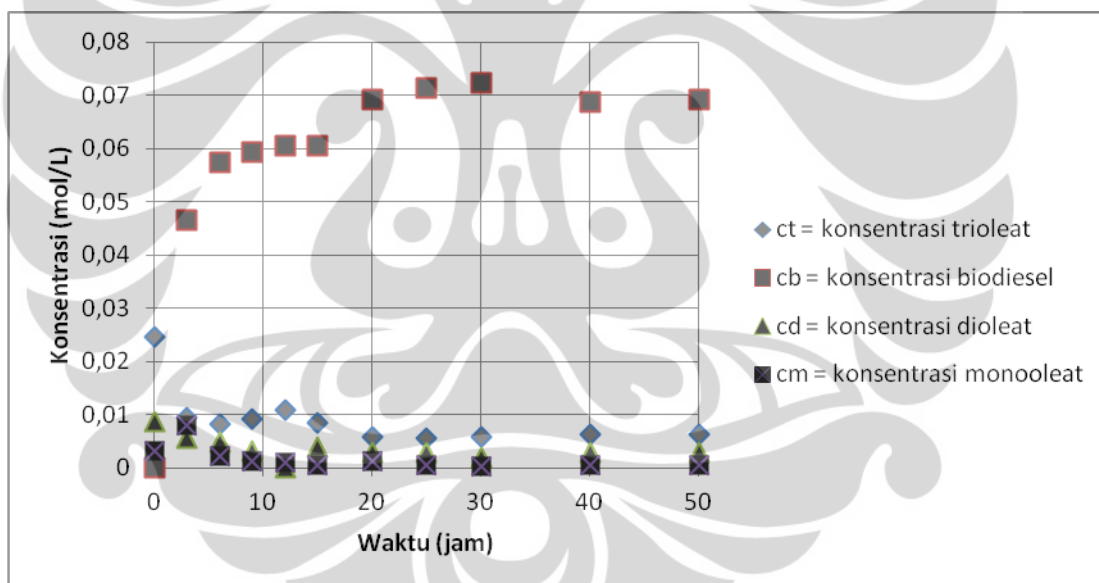


Gambar 4-15 *Yield* biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam kitin

4.2.2 Sintesis Biodiesel dengan Lipase Terimobilisasi dalam Kitosan

Pada tahap ini, enzim yang dipakai berasal dari lipase terimobilisasi dalam *support* kitosan. Lipase terimobilisasi yang dipakai merupakan lipase dengan enzim *loading* yang terbesar pada tahap imobilisasi dengan *entrapment support* kitosan, dimana enzim *loading* yang dihasilkan 97,24 %. Enzim *loading* ini menunjukkan keberhasilan imobilisasi terbaik dan optimal, dimana lipase yang terperangkap dalam kitosan memiliki jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan lipase yang dihasilkan pada kondisi lain. Lipase terimobilisasi ini dihasilkan pada *entrapment* dengan konsentrasi lipase 30 mg/ml, rasio massa 1:6, waktu imobilisasi 120 menit dan pada konsentrasi TPP 0,6%.

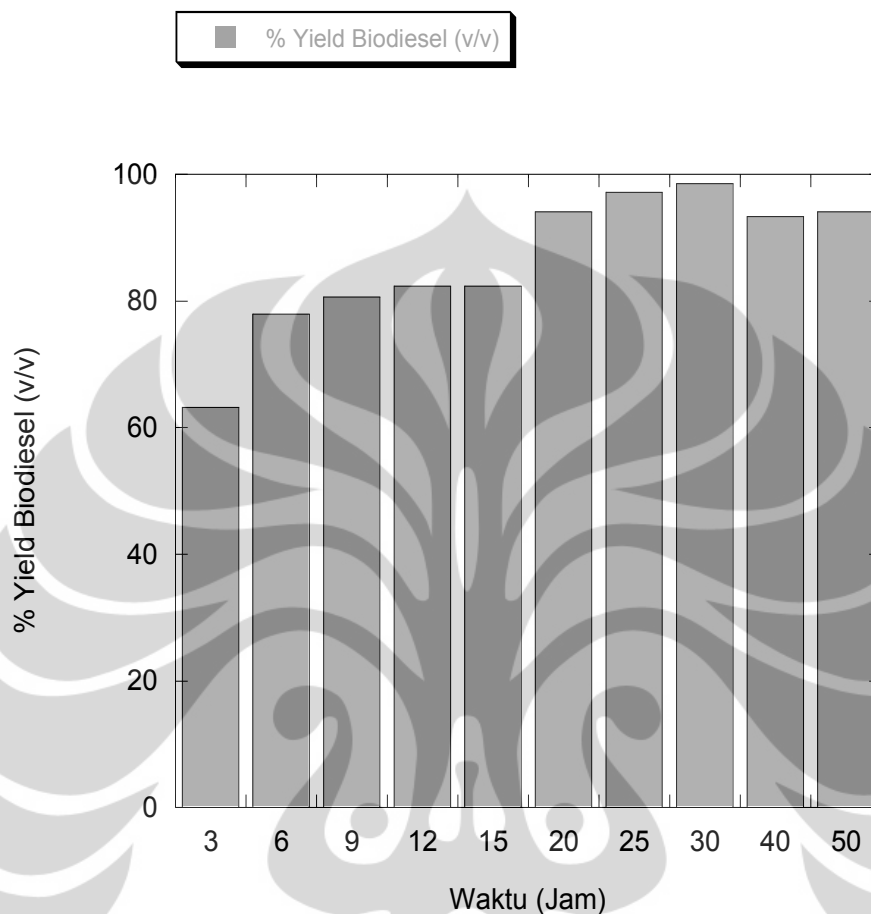
Aktivitas enzim sebagai biokatalis dapat dilihat pada banyaknya metil oleat yang terbentuk. Pada Gambar 4-16 ditunjukkan banyaknya komponen trioleat, dioleat, monooleat dan metil oleat (biodiesel) yang terbentuk.



Gambar 4-16 Konsentrasi masing-masing komponen dalam reaksi sintesis biodiesel menggunakan *support* kitosan

Gambar 4-16 menunjukkan adanya pembentukan biodiesel yang ditandai dengan kenaikan konsentrasi metil oleat dan penurunan konsentrasi trioleat. Trioleat telah beraksi membentuk metil oleat, ini ditunjukkan dengan konsentrasi awal trioleat yang pada awal reaksi bernilai tinggi berubah menjadi kecil. Untuk komponen monooleat dan dioleat, konsentrasinya tidak terlalu mengalami perubahan. Ini disebabkan karena tidak ada lagi reaksi pembentukan monooleat

ataupun dioleat. Pada Gambar 4-17 ditunjukkan *yield* biodiesel yang dihasilkan pada sintesis dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan.



Gambar 4-17 *Yield* biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan

Pada Gambar 4-17, dapat dilihat bahwa semakin bertambahnya waktu reaksi, *yield* biodiesel yang dihasilkan cenderung akan semakin besar. Ini menunjukkan bahwa sintesis yang menggunakan kitosan jauh lebih stabil dibandingkan dengan yang menggunakan kitin. Kitosan memiliki sifat penjeratan yang baik, enzim *loading* yang tinggi dan aktivitas yang tinggi (Neau et al., 2002). Imobilisasi kitosan lebih baik dibandingkan dengan kitin, sehingga konformasi enzimnya terlindungi oleh proses kopolimerisasi gel.

Pada sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan, reaksi pembentukan biodiesel sudah dimulai pada waktu reaksi 3 jam. Dan, sampai waktu reaksi 30 jam, semakin lama waktu reaksi dalam sintesis biodiesel, *yield* biodiesel yang dihasilkan akan semakin besar. Ini menunjukkan selama waktu

reaksi tersebut, reaksi interseterifikasi yang terjadi maksimal. Metil ester yang dihasilkan akan semakin banyak, dan puncak reaksi (penghasilan metil ester yang paling besar terjadi ketika waktu reaksi 30 jam). Setelah waktu reaksi 30 jam, lama kelamaan tidak akan terjadi lagi pembentukan. Ini disebabkan karena semakin berkurangnya kemampuan enzim pada *support* kitosan dalam mengkatalis reaksi. Selain itu, kandungan reaktan semakin sedikit, yang menyebabkan produk yang dihasilkan semakin sedikit juga. Pada Tabel 4-9 akan ditampilkan *yield* biodiesel yang dihasilkan pada sintesis dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan.

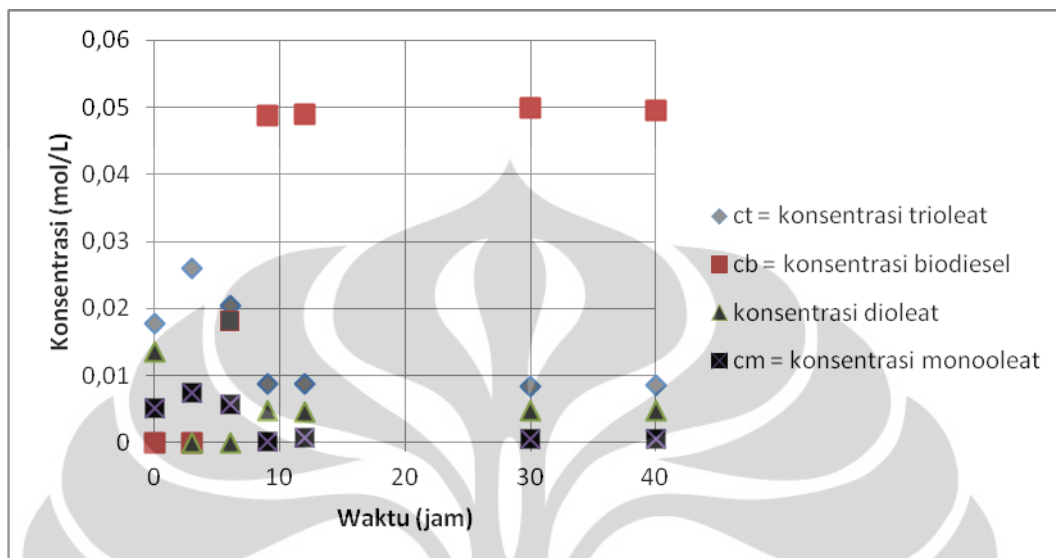
Tabel 4- 9 Yield biodiesel yang dihasilkan pada sintesis lipase terimobilisasi dalam kitosan

Waktu Reaksi (jam)	% Yield Biodiesel (v/v)
3	63,20
6	77,91
9	80,64
12	82,37
15	82,32
20	94,08
25	97,21
30	98,54
40	93,35
50	94,06

4.2.3 Sintesis Biodiesel dengan Lipase Terimobilisasi dalam Zeolit

Pada tahap ini, enzim yang dipakai dalam sintesis berasal dari lipase terimobilisasi dalam *support* zeolit. Lipase terimobilisasi yang dipakai merupakan hasil dari imobilisasi dengan *support* zeolit pada kondisi 3% rasio massa dan 97% rasio enzim, dimana enzim *loading* yang dihasilkan sebesar 92,16%.

Aktivitas enzim sebagai biokatalis dapat dilihat pada banyaknya metil oleat yang terbentuk. Pada Gambar 4-18 berikut ini ditunjukkan banyaknya komponen trioleat, dioleat, monooleat dan metil oleat (biodiesel) yang terbentuk:



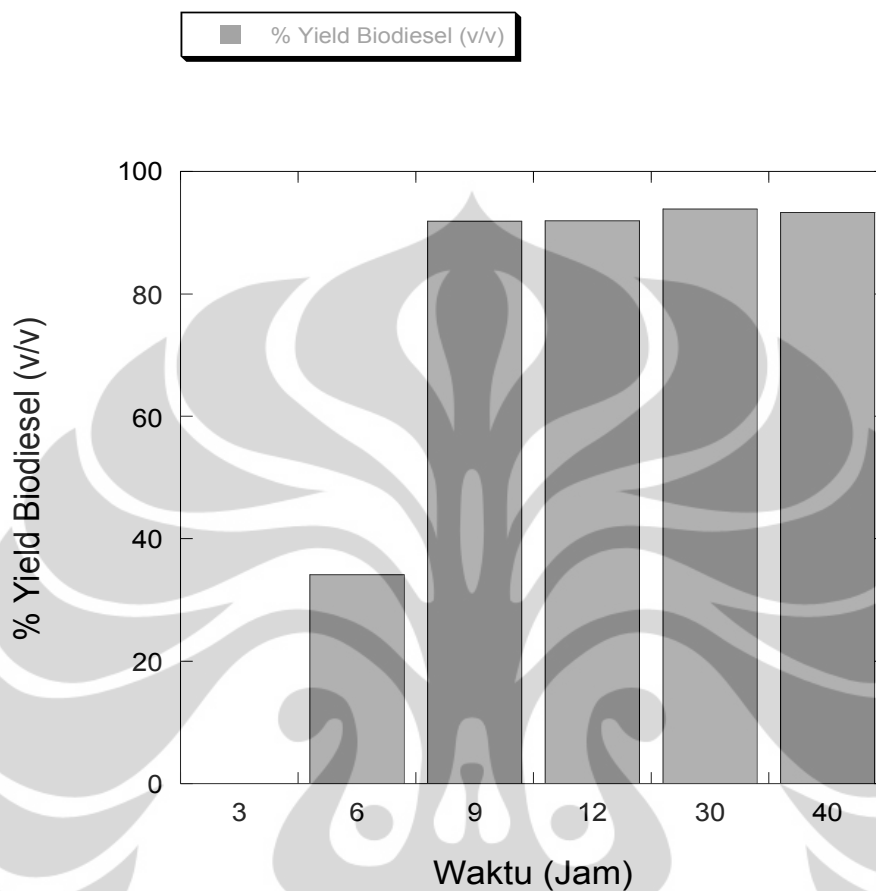
Gambar 4-18 Konsentrasi masing-masing komponen dalam reaksi sintesis biodiesel menggunakan *support* zeolit

Berikut Tabel 4-10 yang menunjukkan *yield* biodiesel pada sintesis lipase terimobilisasi dalam zeolit.

Tabel 4- 10 *Yield* biodiesel yang dihasilkan pada sintesis lipase terimobilisasi dalam zeolit

Waktu Reaksi (jam)	% <i>Yield</i> Biodiesel (v/v)
3	0
6	34,15
9	91,89
12	91,97
30	93,91
40	93,30

Pada Gambar 4-19 ditunjukkan *yield* biodiesel yang dihasilkan pada sintesis dengan lipase terimobilisasi pada *support* zeolit.



Gambar 4-19 *Yield* biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel dengan lipase terimobilisasi dalam zeolit

Pada sintesis biodiesel menggunakan *support* zeolit, pada awal pembentukan, *yield* biodiesel yang dihasilkan akan meningkat hingga titik puncak, dan lama kelamaan *yield* biodieselnnya akan tetap dan tidak mengalami kenaikan lagi. Kenaikan *yield* biodiesel pada awal sintesis disebabkan karena sisi aktif enzim yang terikat pada *support* zeolit pada awal reaksi bekerja dengan baik. Semakin lama kekuatan enzim akan semakin berkurang sehingga tidak terjadi pembentukan produk lagi.

4.3 Hasil Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol dalam Reaktor Kontinyu

Tujuan dari sintesis biodiesel rute non-alkohol pada reaktor kontinyu adalah untuk mengetahui stabilitas lipase terimobilisasi pada *support* kitin, kitosan dan

juga zeolit. Berikut ini merupakan gambar proses sintesis biodiesel dalam reaktor kontinyu :



(a)

(b)

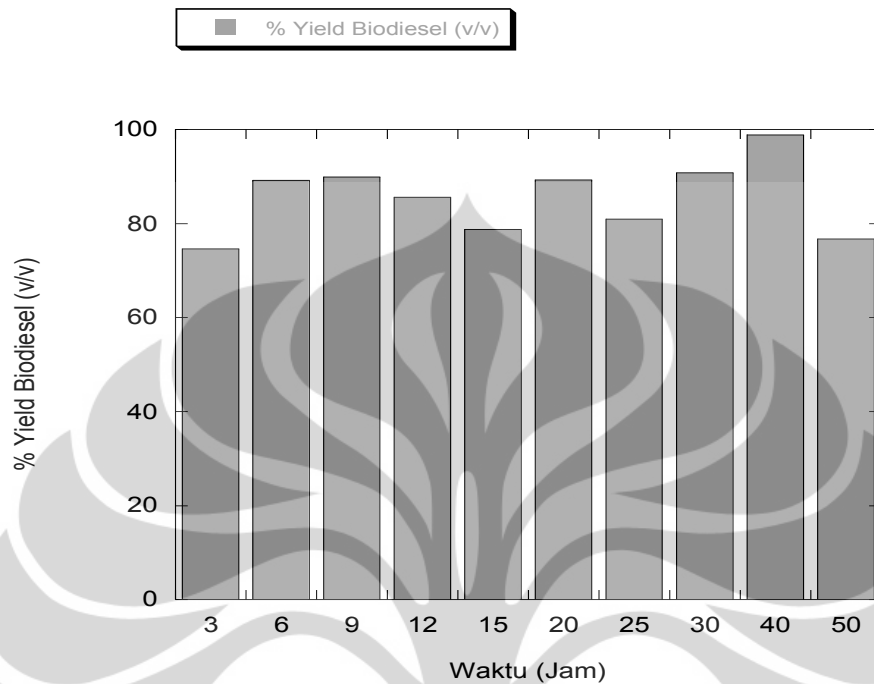
Gambar 4-20 Sintesis biodiesel dalam reaktor kontinyu (a) minyak jelanta, metil asetat dan lipase terimobilisasi pada reaktor *packed bed* skala lab (b) keseluruhan proses sintesis biodiesel dalam reaktor kontinyu

Tabel 4-11 menunjukkan *yield* biodiesel yang dihasilkan dari masing-masing *support*.

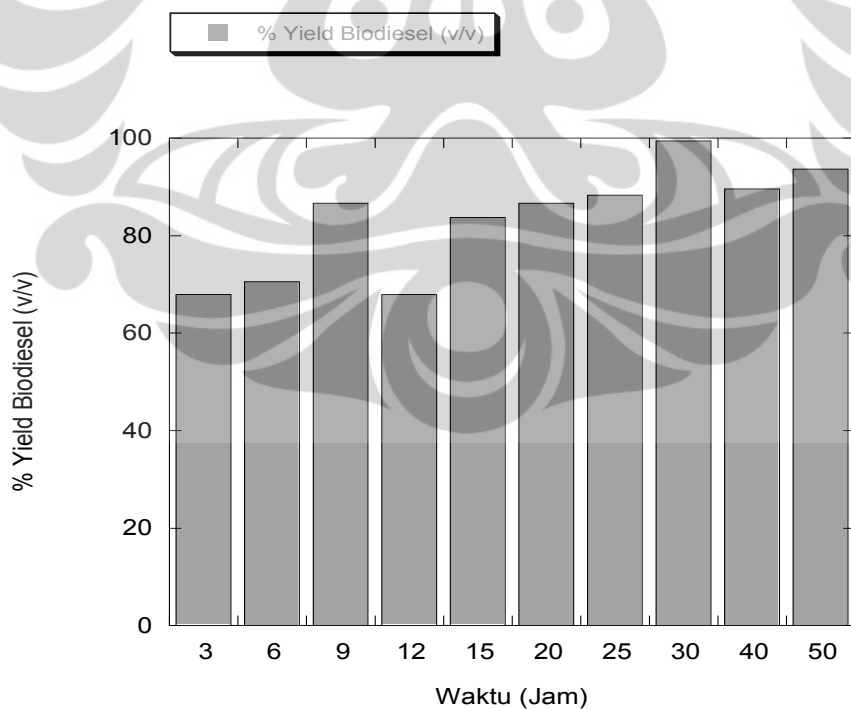
Tabel 4- 11 *Yield* biodiesel yang dihasilkan pada sintesis biodiesel sistem kontinyu

Waktu Reaksi (jam)	% <i>Yield</i> Biodiesel (v/v)		
	<i>Support</i> kitin	<i>Support</i> kitosan	<i>Support</i> zeolit
3	74,59	67,91	51,65
6	89,20	70,52	56,57
9	89,89	86,65	81,80
12	85,62	67,91	81,80
20	89,26	86,65	88,49
25	80,93	88,33	91,87
30	90,84	99,43	98,67
40	98,89	89,57	99,08
50	76,72	93,67	85,97

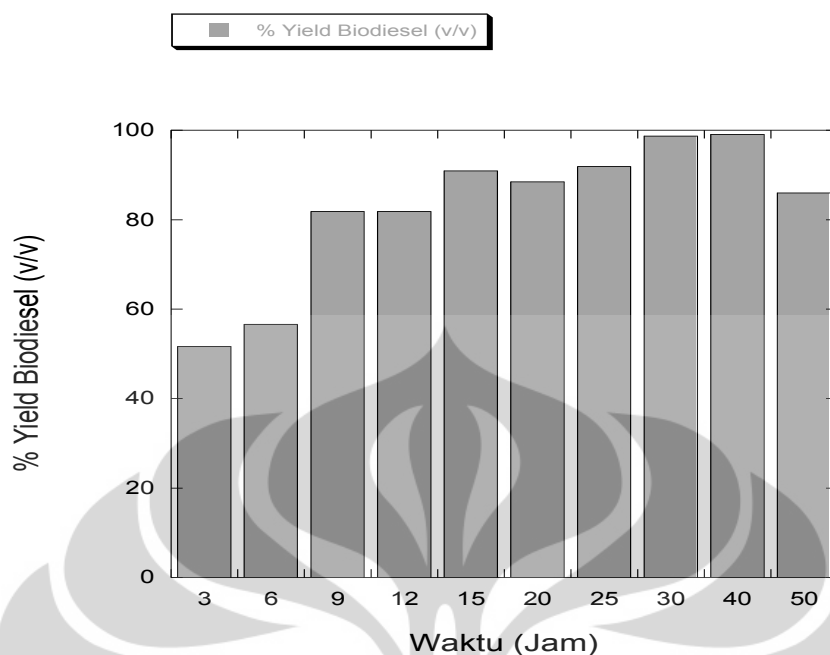
Berikut ini juga ditampilkan gambar yang menunjukkan *yield* biodiesel yang dihasilkan dalam setiap sintesis biodiesel menggunakan masing-masing *support*.



Gambar 4-21 *Yield* biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel sistem kontinu dengan lipase terimobilisasi dalam kitin



Gambar 4-22 *Yield* biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel sistem kontinu dengan lipase terimobilisasi dalam kitosan



Gambar 4-23 Yield biodiesel (%) hasil sintesis biodiesel sistem kontinyu dengan lipase terimobilisasi dalam zeolit

Dari Tabel 4-11, dapat dilihat bahwa sintesis biodiesel dengan *support* kitin dinilai memiliki kestabilan yang buruk diantara kitosan maupun zeolit. Ini dapat dilihat pada Gambar 4-21, *yield* biodiesel yang dihasilkan terkadang naik dan terkadang turun. Ini disebabkan karena enzim terimobilisasi yang kurang baik pada kitin, pengikatan/terperangkapnya enzim menggunakan kitin mudah membuka, sehingga stabilisasi konformasi enzimnya buruk.

Yield biodiesel terbaik dihasilkan dari sintesis biodiesel dengan menggunakan lipase terimobilisasi pada *support* kitosan. Selain itu, Gambar 4-22 juga menunjukkan bahwa *yield* biodiesel pada sintesis dengan menggunakan lipase terimobilisasi pada *support* kitosan cenderung stabil dibandingkan dengan *yield* biodiesel pada sintesis dengan menggunakan lipase terimobilisasi pada *support* kitin dan *support* zeolit. Kitosan memiliki sifat penjeratan yang baik, enzim *loading* yang tinggi dan aktivitas yang tinggi (Neau et al., 2002). Selain itu kitosan juga konformasi enzimnya terlindungi oleh proses kopolimerisasi gel.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah

- Dari segi enzim *loading* yang dihasilkan, metode *entrapment* dengan *support* kitosan lebih unggul dibandingkan *support* kitin dan zeolit.
- Pada imobilisasi dengan *support* kitin, rasio massa optimal didapatkan pada kondisi 1:7 dan waktu imobilisasi optimal didapatkan pada waktu 120 menit dengan enzim *loading* sebesar 44,07%
- Pada imobilisasi dengan *support* kitin, konsentrasi TPP optimal didapatkan pada konsentrasi TPP 1% dengan enzim *loading* sebesar 52,141%
- Pada imobilisasi dengan *support* kitosan, rasio massa optimal didapatkan pada kondisi 1:6 dan waktu imobilisasi optimal didapatkan pada waktu 120 menit dengan enzim *loading* sebesar 96,13%
- Pada imobilisasi dengan *support* kitin, konsentrasi TPP optimal didapatkan pada konsentrasi TPP 0,6% dengan enzim *loading* sebesar 97,24%
- Semakin besar konsentrasi TPP yang dipakai dalam imobilisasi dengan *support* kitin dan kitosan, maka enzim *loading* yang dihasilkan akan semakin berkurang.
- Pada imobilisasi dengan *support* zeolit, massa enzim optimal yaitu 3%, yang menghasilkan enzim *loading* 92,1622.
- Pada sintesis biodiesel rute non-alkohol pada sistem *batch* dengan lipase terimobilisasi, *yield* biodiesel terbesar dihasilkan dengan menggunakan lipase terimobilisasi dalam *support* zeolit.
- Pada sintesis biodiesel rute non-alkohol pada sistem kontinyu dengan lipase terimobilisasi, *yield* biodiesel

terbesar dihasilkan dengan menggunakan lipase terimobilisasi dalam *support* kitosan.

5.2 Saran

Pengembangan biodiesel sebagai bahan bakar terbarukan berbasis minyak jelanta merupakan suatu peluang yang bagus dan belum terlalu dimanfaatkan, oleh sebab itu perlu dilakukan pemanfaatan dengan baik dan biodiesel berbasis minyak jelanta memerlukan penelitian lebih lanjut khususnya mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi peningkatan *yield* metil ester karena mungkin saja ada kandungan karsinogenik yang terdapat pada minyak jelanta yang memungkinkan penghambatan metil ester. Selain itu, penelitian tentang pemanfaatan produk samping berupa triasetilgliserida perlu diperbanyak lagi guna memberikan *by-product* bernilai ekonomis yang dapat menurunkan biaya produksi pembuatan biodiesel dan tidak menjadi limbah dari sintesis biodiesel.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayu, D. (2009). *Sintesis Biodiesel Dari Minyak Goreng Bekas Melalui Rute Non-Alkohol Menggunakan Biokatalis Terimobilisasi Pada Reaktor Packed Bed*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Bestari, M. (2012). *Sintesis Human Milk Fat Substitute (HMFS) Melalui Selektif Interesterifikasi Etil Oleat Susu Sapi Dengan Tripalmitin Minyak Sawit Menggunakan Biokatalis*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Christophel, E. (2012). *Scale Up Produksi Biodiesel Rute Non-Alkohol Dalam Reaktor Unggun Isian*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Daudi, R. (2012). *Sintesis Biodiesel Rute Non-Alkohol Dari Minyak Goreng Dengan Biokatalis Melalui Terimobilisasi Entrapment Pada Reaktor Batch dan Pada Reaktor Packed Bed*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Demirbas Ayhan Biodiesel. (2008). *A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*. London : Springer-Verlag London Limited.
- Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K., Jiang, Y. (2003). *Effect of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit*. Journal of Food Engineering. 64, 355-358.
- Du Wei. (2004). *Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic . - Beijing : Elsevier B.V. All rights reserved. - Vol. 30. - hal. 125–129. - doi:10.1016/j.molcatb.2004.04.004.
- Elisabeth, J.: Jatmika, A. ; E. Nainggolan, dan D.M Malau. (1998). *Preparasi Mono-dan Digliserida Dari Minyak Sawit Dengan Gliserolisis Enzimatik*. Jurnal Penelitian Kelapa Sawit 6(1): 79-94

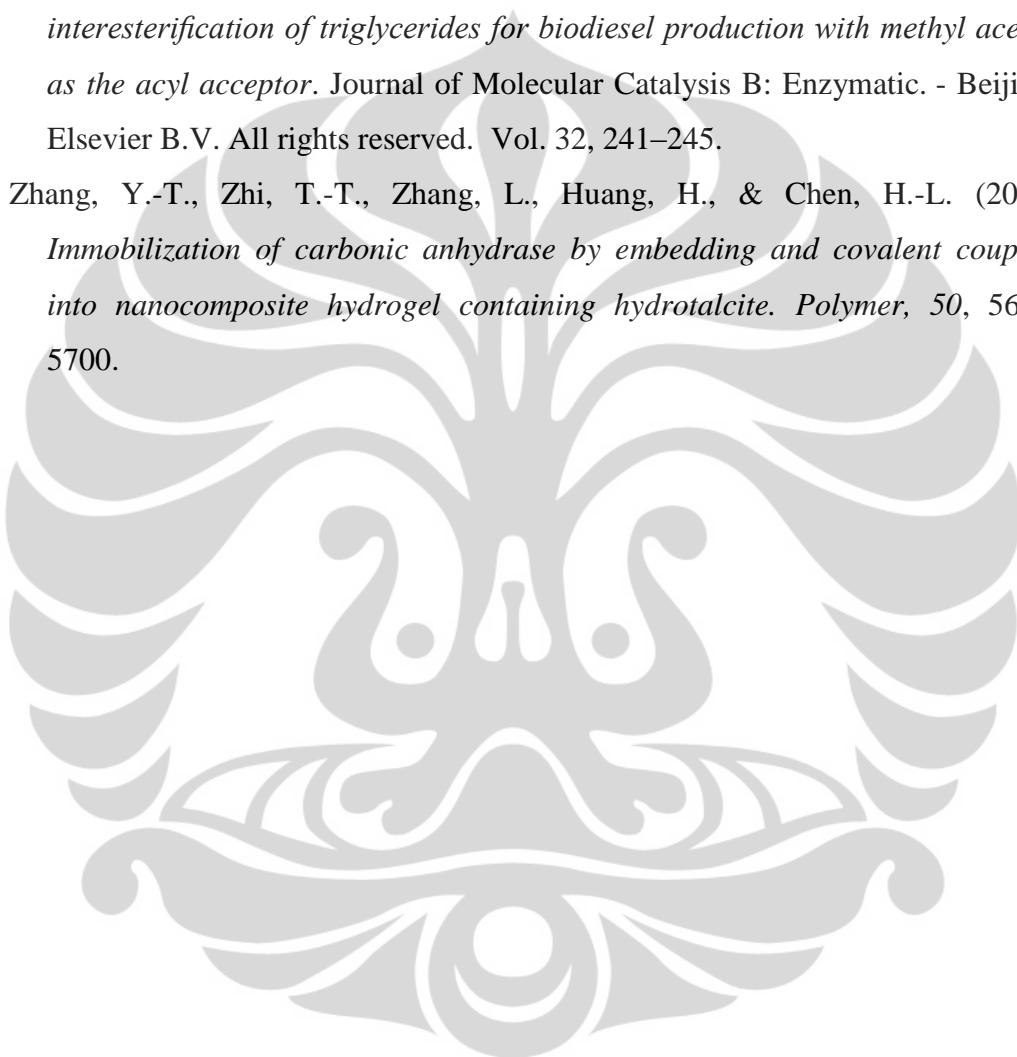
- Fatimah et al., (2009). *Continuous Biosynthesis of Biodiesel from Waste Cooking Oil in a Packed Bed Reactor: Optimization Using Response Surface Methodology (RSM) and mass transfer studies*. Bioresource Technology.
- Freedman, B., E.H. Pryde and T.L. Mounts, (1984), *Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils*, dalam: *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol.61.1638-1643.
- Fukuda, H., A. Kondo, and H.Noda, (2001), *Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils*, dalam: *J. Biosci. Bioeng.* Vol.92.405-416.
- Ghosh, S. and D. Bhattacharyya (1995). *Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology*. Journal of the American Oil Chemists' Society 72(12): 1541-1544.
- Hasan, T.; E. Nuryanto, dan P. Guritno. (1999). *Penggunaan Asam Lemak Sawit Distilat sebagai Bahan Baku Superpalpamamida*. Jurnal Penelitian Kelapa Sawit 7(1): 33-42
- Hermansyah Heri, Anondho Wijanarko, Rita Arbianti. (2009). *Interesterification of triglyceride with methyl acetate using lipase to produce biodiesel*. Journal of Bioscience and Bioengineering . - Depok : Elsevier B.V.
- Hermansyah Heri, Rita Arbianti, Dyah Ayu Prameshwari. (2011). *Non-Alcohol Route Of Biodiesel Synthesis From Used Cooking Oil Using Immobilized Biocatalyst In Packed Bed Reactor*, Journal of Sustainable Energy and Environment.
- Hermansyah Heri, Rita Arbianti, Muhammad Ekky Rizkiyadi. (2011). *Non-Alcohol route of Biodiesel Synthesis from Fried Palm Oil using Immobilized Candida rugosa Lipase*, Journal of Chemistry and Chemical Engineering, J. Chem. Chem. Eng.
- Illanes Andres Enzyme Biocatalysis: *Principles and Applications*. Chile : Springer Science + Business Media B.V., 2008. - ISBN 978-1-4020-8360-0.
- Kaieda, M., T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtuka, E. Izumoto, and A.H. Fukuda, (1999). *Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by Rhizopus oryzae Lipase in a Water-Containing System without an Organic Solvent*. J. Biosci. Bioeng., 88: 627-631.

- Kaieda, M., Samukawa T, Kondo A, Fukuda H., (2001). *Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel from Plant Oil Catalyzed by Various Lipases in a Solvent-Free Systemt*. J. Biosci. Bioeng. , 91: 12-5.
- Kim, M., Salley, S. O., Ng, K. Y. S.(2008). *Transesterification of Glycerides Using a Heterogeneous Resin Catalyst Combined with a Homogeneous Catalyst*. Energy Fuels, 22 (6), 3594-3599.
- Kharistiananda, P. (2012). *Imobilisasi Candida Rugosa Lipase dengan Metode Sol-Gel menggunakan Support Kitosan sebagai Biokatalis dalam Sintesis Wax Ester*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Kim Sok Joong, Sang-Ming Jung, Yong-cheol Pane. (2007). *Lipase Catalyzed transesterification of Soybean Oil Using Ethyl Acetate, an Alternative Acyl Acceptor*, Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12 : 441-445. Kyungmoon Park.
- Kirk, O., Vedel, T., & Crone, C. (2002). *Industrial Enzyme Application*. Current opinion on biotechnology , 13, 345-351.
- Knežević Zorica D., Šiler-Marinković Slavica S. and Mojović Ljiljana V. (2004). *Immobilized Lipases As Practical Catalysist*. APTEFF. – Belgrade.
- Lehninger, A. L. (1982). *Dasar-Dasar Biokimia*. Terj, dari principles of biochemistry, oleh Thenawidjaja, M. Penerbit Erlangga, Jakarta:xv+369 hlm.
- Manitto, P. (1981). *Biosynthesis of Natural Product*. Editor Moeljono Judoamidjojo. Ellis Horwood Limited
- Moon, S., Kim, K., Kim, S., Park, H.W., Won, K.(2005). *Optimization of Lipase Entrapment in Ca-alginate Bead*. Process Biochemistry, 40, 2149–2154.
- Muzzarelli, R.A.A., Rochetti, R. (1985). *Journal of Carbohydrate Polymers*. 5, 461–72.
- Muzzarelli, R.A.A, (1985), “*Chitin*”, Pergamon Press, New York
- Noureddini, H., Wagner, P., & Gutsman, M. (2002). Immobilization of Pseudomonas cepacia Lipase by Sol-Gel entrapment and its application in the hydrolysis of Soybean Oil. *Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications*.

- Ochidea, R., Ju, Hsu. (2012). *Biodiesel Berbahan Baku Minyak Mentah Dedak Padi*. Surabaya: Institut Teknologi Sebelas Maret.
- Ognjanovic Nevena, Bezbradica Dejan dan Knezevic-Jugovic Zorica. (2009). *Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability*. Bioresource Technology. - Belgrade : Elsevier Ltd. All rights reserved. Vol. 100. - hal. 5146–5154. - doi:10.1016/j.biortech.2009.05.068.
- Orcaire Olivier, Buisson Paulette dan Pierre Alain C. (2006). *Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. - Villeurbanne Cedex : Elsevier B.V. All rights reserved. Vol. 42. - hal. 106–113.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V.T. (1999). *The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 119-131.
- Poedjiadi, A., (1994). *Dasar-Dasar Biokimia*. Penerbit Universitas Indonesia Rini,dkk. *Transesterifikasi Ester Asam Lemak Melalui Pemanfaatan Teknologi Lipase*. BIODIVERSITAS 6(3): 164-167.
- Rizkiyadi, M. (2008). *Reaksi Interesterifikasi Minyak Jelantah Dengan Metil Asetat Menggunakan Biokatalis Candida Rugosa Lipase Untuk Memproduksi Biodiesel*. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik universitas Indonesia.
- Salunkhe, D.K,dkk. *World Oilseeds, Chemistry, Technology and Utilization*. Published by Van Nostrand Reinhold, New York, 1992.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., (1999). *Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized Candida Antartica Lipase*, *JAACS*. 76 (7): 789-793.
- Togar, Y. M. (2011). *Optimasi Reaksi Perekahan Dan Isomerisasi Katalis Praseodimium (III)/ Zeolit Klipnotilolit Untuk Meningkatkan Bilangan Oktan Pada Gasoline*. Depok: Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia.
- Wafa, A. (2009). *Sintesis Biodiesel Dari Berbagai Minyak Goreng Melalui Rute Non-Alkohol Menggunakan Biokatalis Terimobilisasi Pada Reaktor Packed*

Bed. Depok: Skripsi Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

- Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y., (2000). *Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized Candida Antartica Lipase*, JAOCS :7:355-8.
- Xu Yuanyuan, Du Wei dan Liu Dehua. (2005). *Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. - Beijing : Elsevier B.V. All rights reserved. Vol. 32, 241–245.
- Zhang, Y.-T., Zhi, T.-T., Zhang, L., Huang, H., & Chen, H.-L. (2009). *Immobilization of carbonic anhydrase by embedding and covalent coupling into nanocomposite hydrogel containing hydrotalcite*. Polymer, 50, 5693–5700.



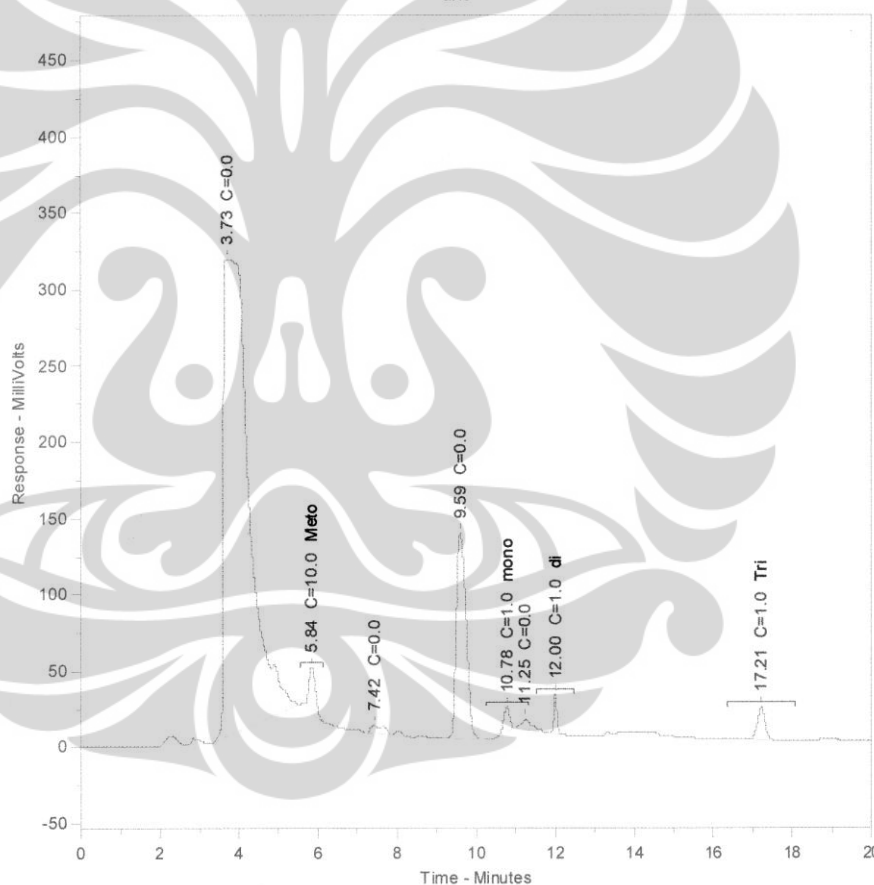
Lampiran 1: Data Kromatogram Hasil Analisa HPLC

Variasi waktu reaksi sintesis biodiesel sistem *batch* dengan *support* kitin

a. Data kromatogram hasil analisa sebagai standar biodiesel

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Desi / Standar
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 30 April 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.729	14041570	0.000	
2	5.845	361909	10.000	Meto
3	7.425	124212	0.000	
4	9.595	2299722	0.000	
5	10.777	180245	1.000	mono
6	11.252	129195	0.000	
7	12.002	146687	1.000	di
8	17.213	282910	1.000	Tri

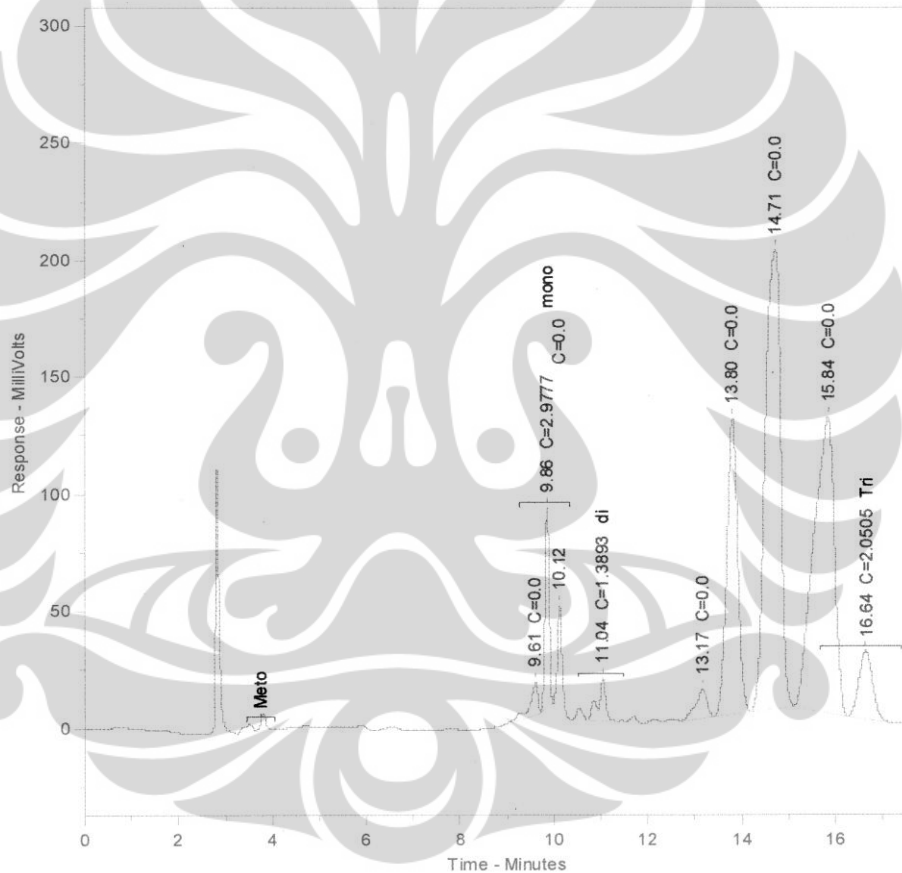
Gambar i. Kromatogram hasil analisa sebagai standar biodiesel

(Lanjutan)

b. 37⁰C; 0 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *klain 0*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	9.614	167074	0.000	
2	9.857	536713 ✓	2.978	mono
3	10.122	306508	0.000	
4	11.040	203791 ✓	1.389	di
5	13.173	206373	0.000	
6	13.804	2022206	0.000	
7	14.714	4462968	0.000	
8	15.841	3840142	0.000	
9	16.642	580110	2.051	Tri

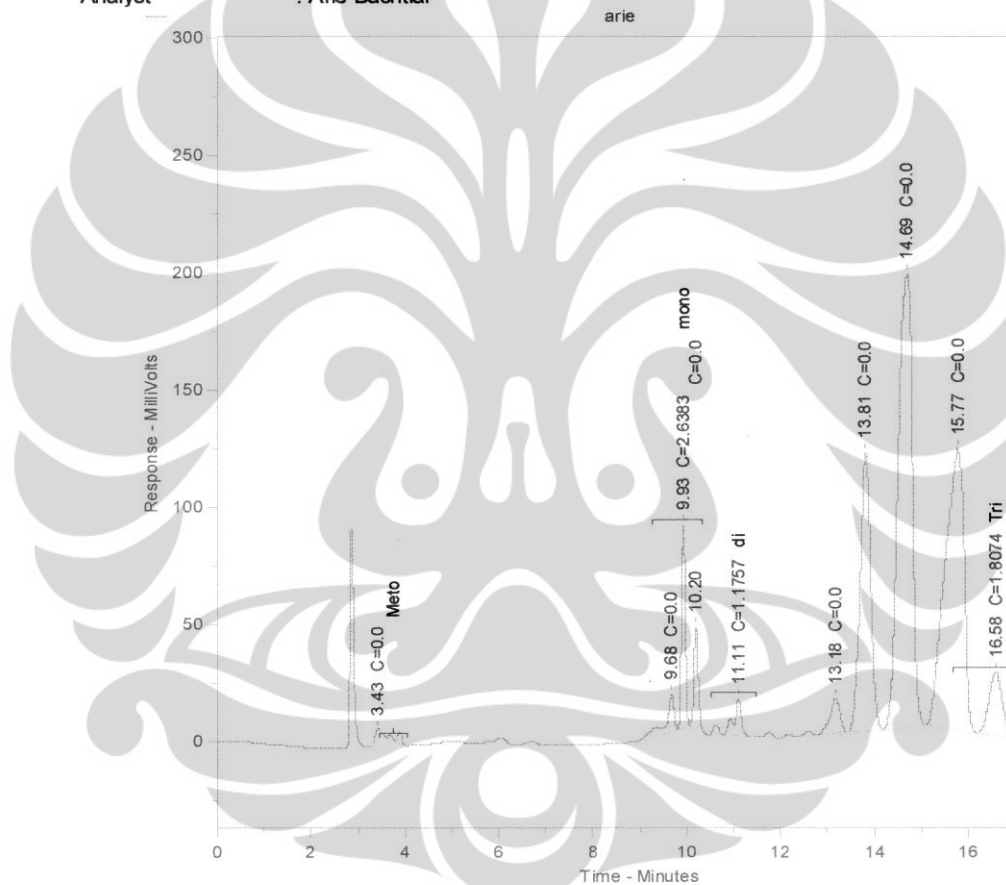
Gambar ii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 0 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

c. 37⁰C; 3 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly *1 kitan 3*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.432	180551	0.000	
2	9.682	191001	0.000	
3	9.931	475544	2.638	mono
4	10.197	265493	0.000	
5	11.107	172454	1.176	di
6	13.176	226266	0.000	
7	13.809	1824463	0.000	
8	14.689	4058064	0.000	
9	15.770	3387797	0.000	
10	16.582	511342	1.807	Tri

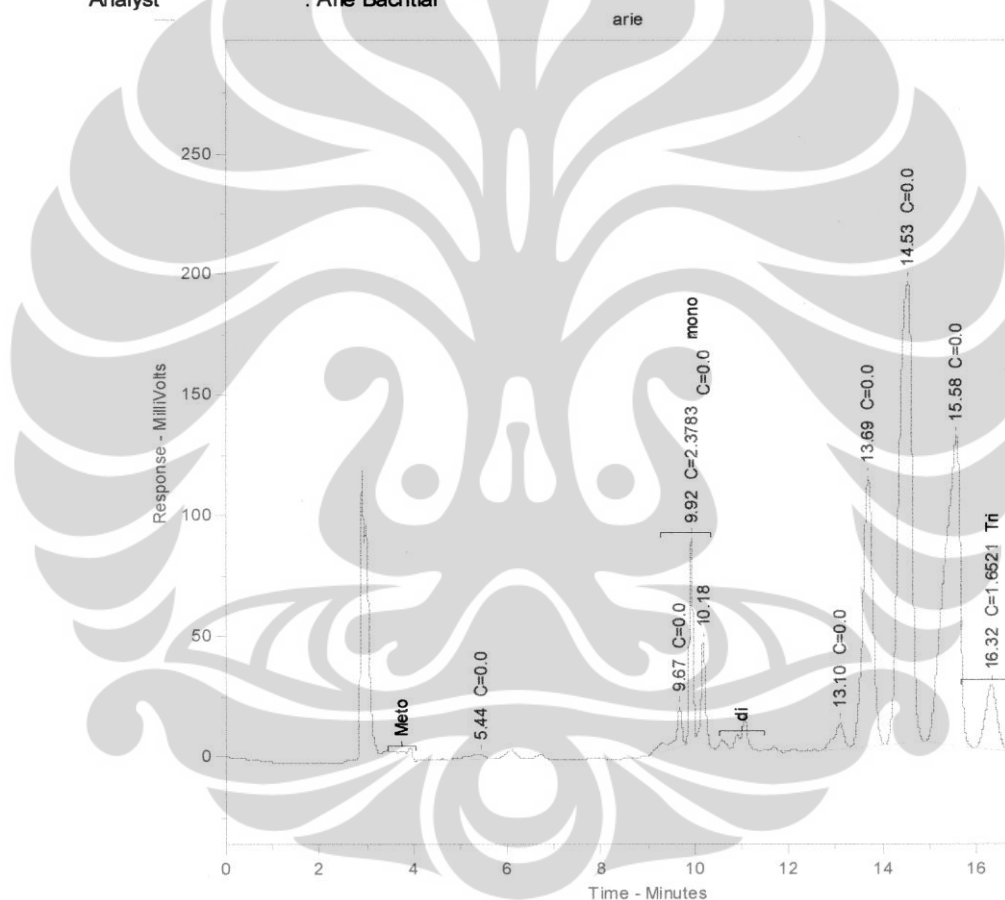
Gambar iii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 3 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

d. 37⁰C; 6 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 11/11/12
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	5.438	44845	0.000	
2	9.674	176746	0.000	
3	9.919	428672	2.378	mono
4	10.178	250278	0.000	
5	13.097	156147	0.000	
6	13.690	1629288	0.000	
7	14.532	3646241	0.000	
8	15.576	3004156	0.000	
9	16.318	467405	1.652	Tri

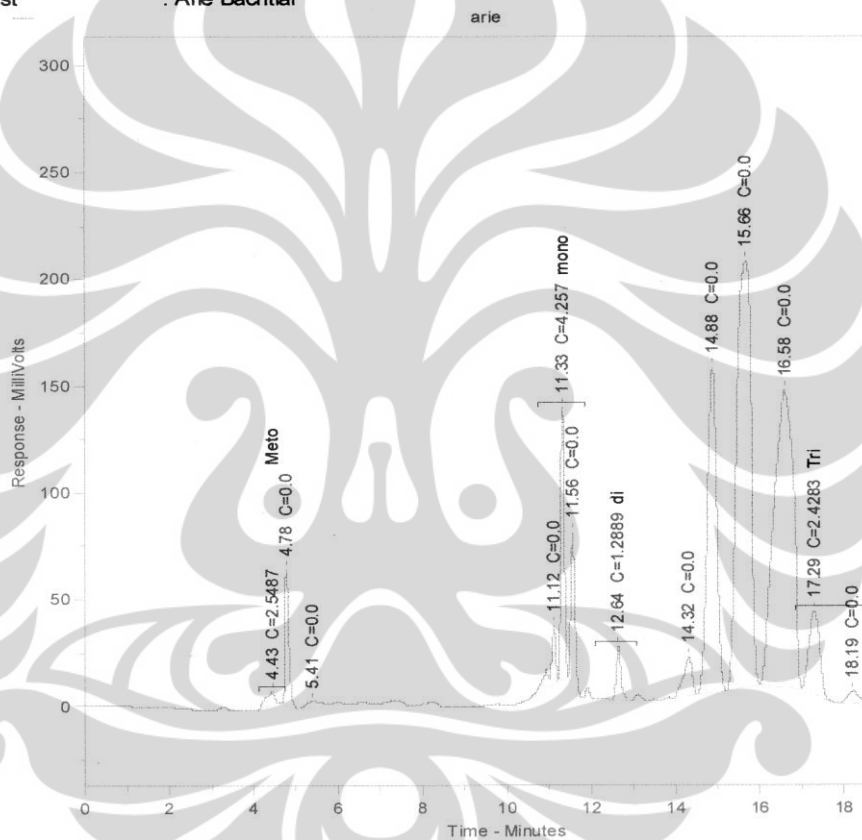
Gambar iv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 6 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

e. 37⁰C; 9 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *Kita g*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.435	92240	2.549	Meto
2	4.775	401935	0.000	
3	5.407	86722	0.000	
4	11.120	259615	0.000	
5	11.328	767311	4.257	mono
6	11.563	463926	0.000	
7	12.644	189063	1.289	di
8	14.318	273214	0.000	
9	14.875	2349686	0.000	
10	15.660	4667726	0.000	
11	16.580	4480789	0.000	
12	17.292	686983	2.428	Tri
13	18.189	101615	0.000	

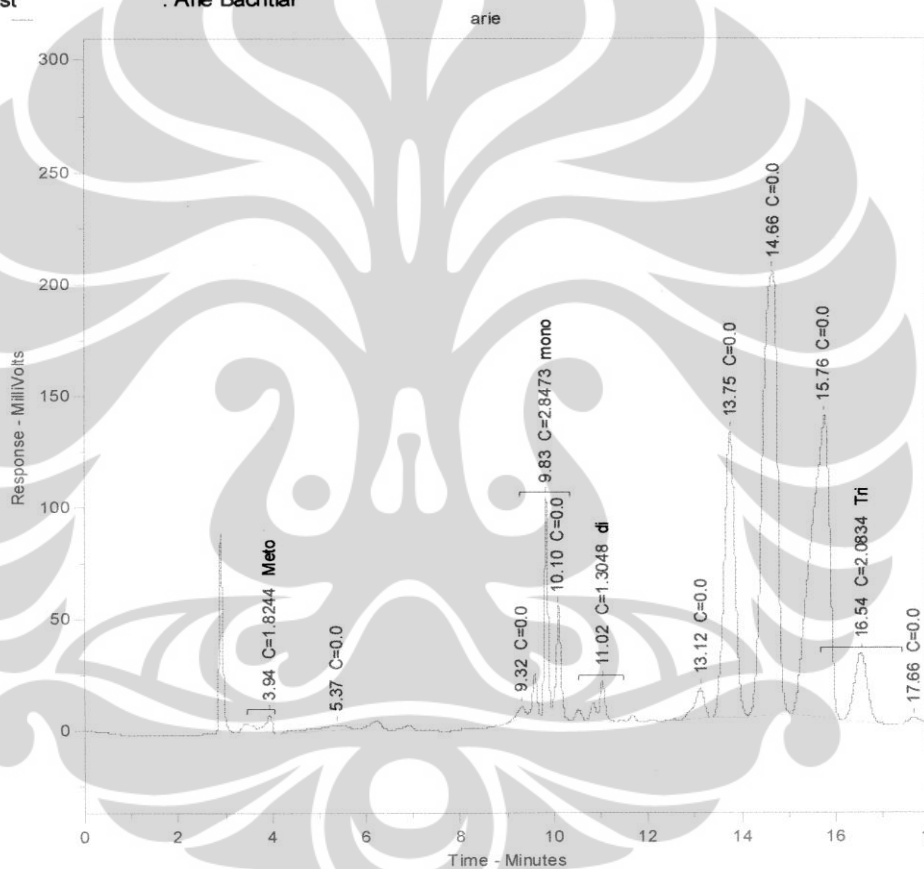
Gambar v. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 9 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

f. 37⁰C; 12 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / Kitin 12
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.935	66028	1.824	Meto
2	5.371	122091	0.000	
3	9.322	47538	0.000	
4	9.832	513205	2.847	mono
5	10.095	309243	0.000	
6	11.025	191398	1.305	di
7	13.117	210542	0.000	
8	13.747	2014791	0.000	
9	14.658	4332958	0.000	
10	15.764	3756655	0.000	
11	16.537	589420	2.083	Tri
12	17.664	57074	0.000	

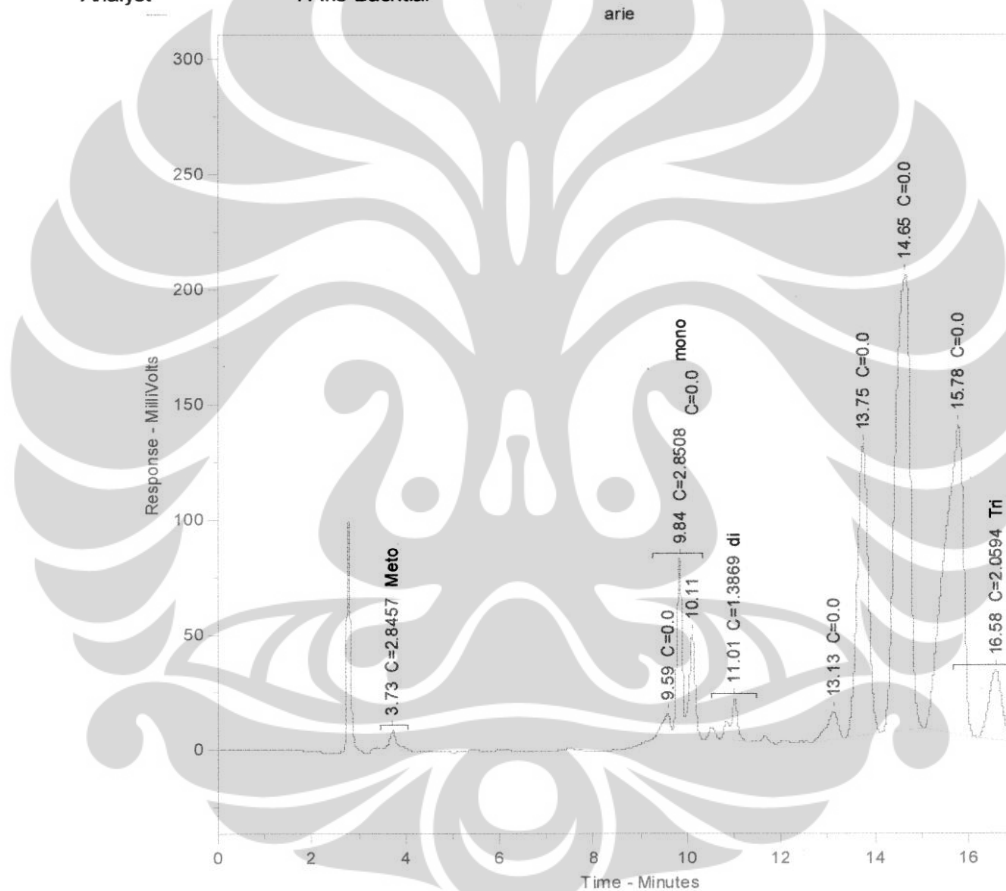
Gambar vi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 12 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

g.37⁰C; 15 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / K₁₂ 15
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



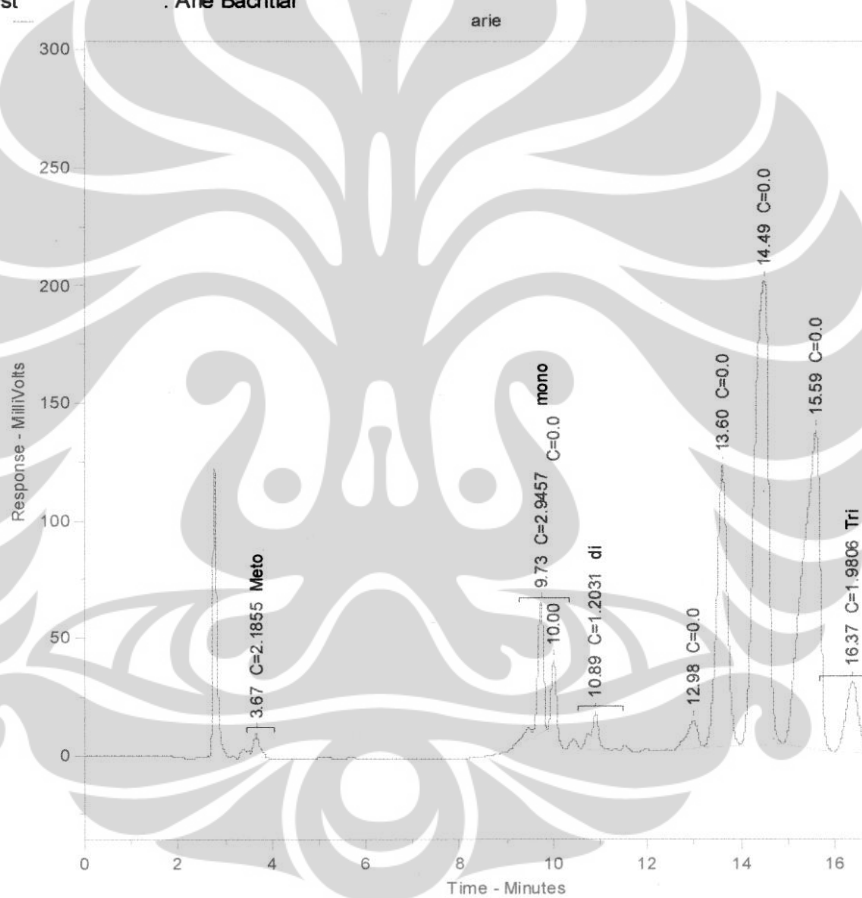
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.728	102990	2.846	Meto
2	9.587	95783	0.000	
3	9.844	513851	2.851	mono
4	10.112	297128	0.000	
5	11.015	203442	1.387	di
6	13.126	201235	0.000	
7	13.752	2035994	0.000	
8	14.653	4376793	0.000	
9	15.784	3807255	0.000	
10	16.578	582614	2.059	Tri

Gambar ivii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 15 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

h. 37⁰C; 20 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 11/4/12 18 20
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.667	79096	2.186	Meto
2	9.734	530945	2.946	mono
3	10.004	251367	0.000	
4	10.893	176475	1.203	di
5	12.982	185774	0.000	
6	13.597	1877663	0.000	
7	14.486	4139251	0.000	
8	15.595	3493071	0.000	
9	16.371	560332	1.981	Tri

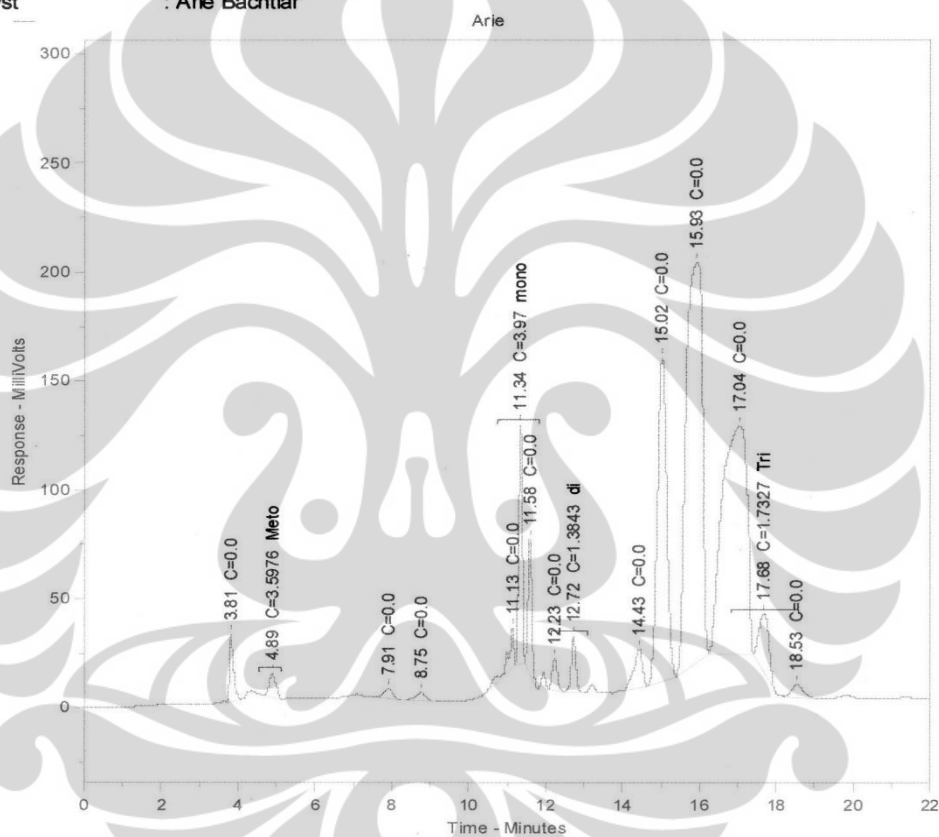
Gambar viii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 20 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

i. 37⁰C; 25 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly *11 Mei 2012*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



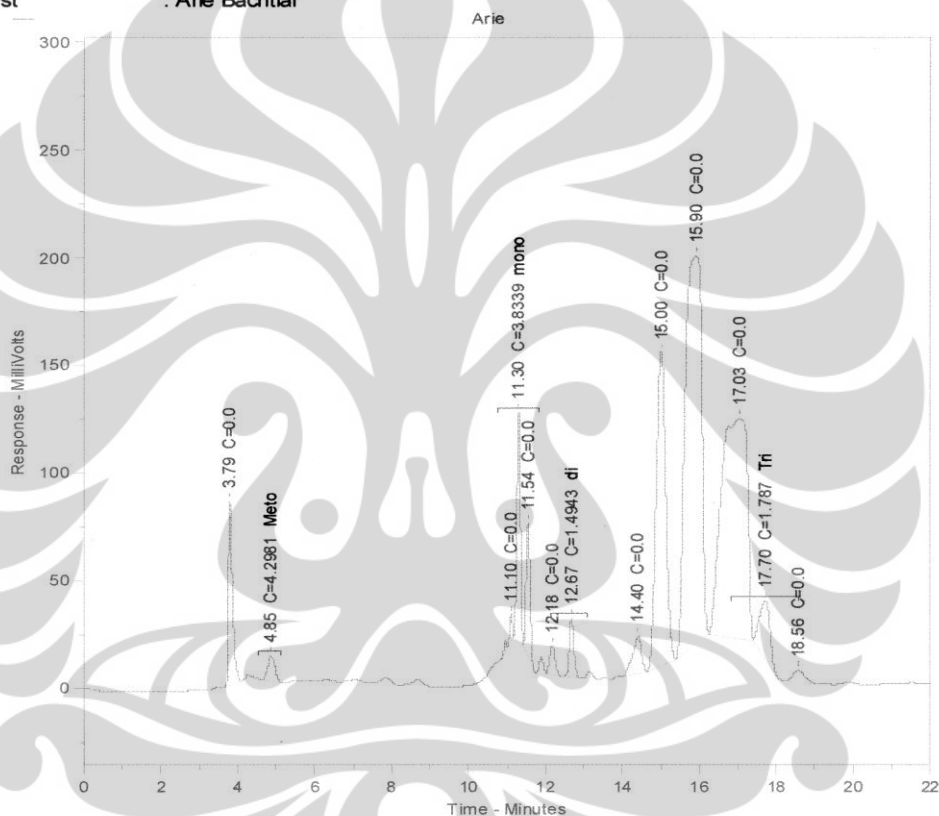
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.810	224497	0.000	
2	4.889	130199	3.598	Meto
3	7.909	72034	0.000	
4	8.754	66245	0.000	
5	11.135	181447	0.000	
6	11.341	715573	3.970	mono
7	11.582	423015	0.000	
8	12.232	137809	0.000	
9	12.716	203060	1.384	di
10	14.428	285962	0.000	
11	15.021	2534739	0.000	
12	15.926	5364384	0.000	
13	17.043	4714969	0.000	
14	17.678	490209	1.733	Tri
15	18.527	114434	0.000	

Gambar ix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 25 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

j. 37⁰C; 30 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly *11/11/12 25 30*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.787	645044	0.000	
2	4.850	155551	4.298	Meto
3	11.098	85083	0.000	
4	11.304	691035	3.834	mono
5	11.542	436205	0.000	
6	12.178	127785	0.000	
7	12.673	219192	1.494	di
8	14.398	284087	0.000	
9	14.998	2550944	0.000	
10	15.902	5359950	0.000	
11	17.032	4714933	0.000	
12	17.703	505552	1.787	Tri
13	18.558	110810	0.000	

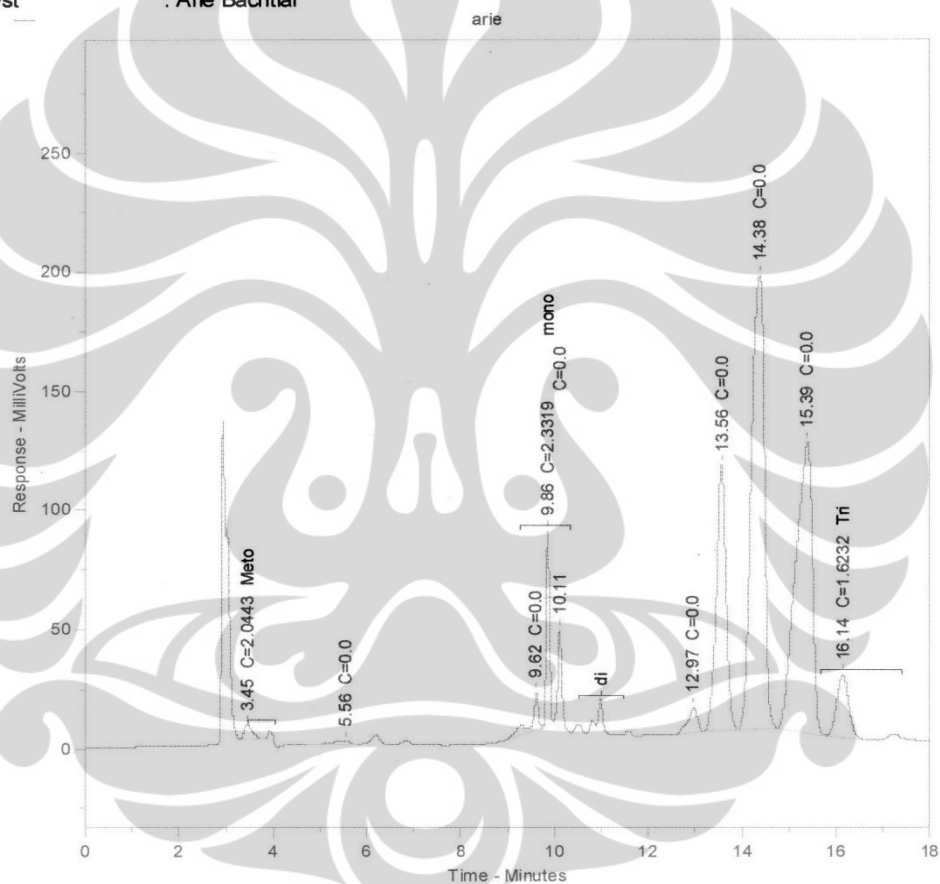
Gambar x. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 30 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

k. 37⁰C; 40 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *Kita 40*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.448	73985	2.044	Meto
2	5.557	35731	0.000	
3	9.617	167725	0.000	
4	9.856	420308	2.332	mono
5	10.108	240107	0.000	
6	12.967	156362	0.000	
7	13.555	1613218	0.000	
8	14.376	3617978	0.000	
9	15.387	3033996	0.000	
10	16.143	459232	1.623	Tri

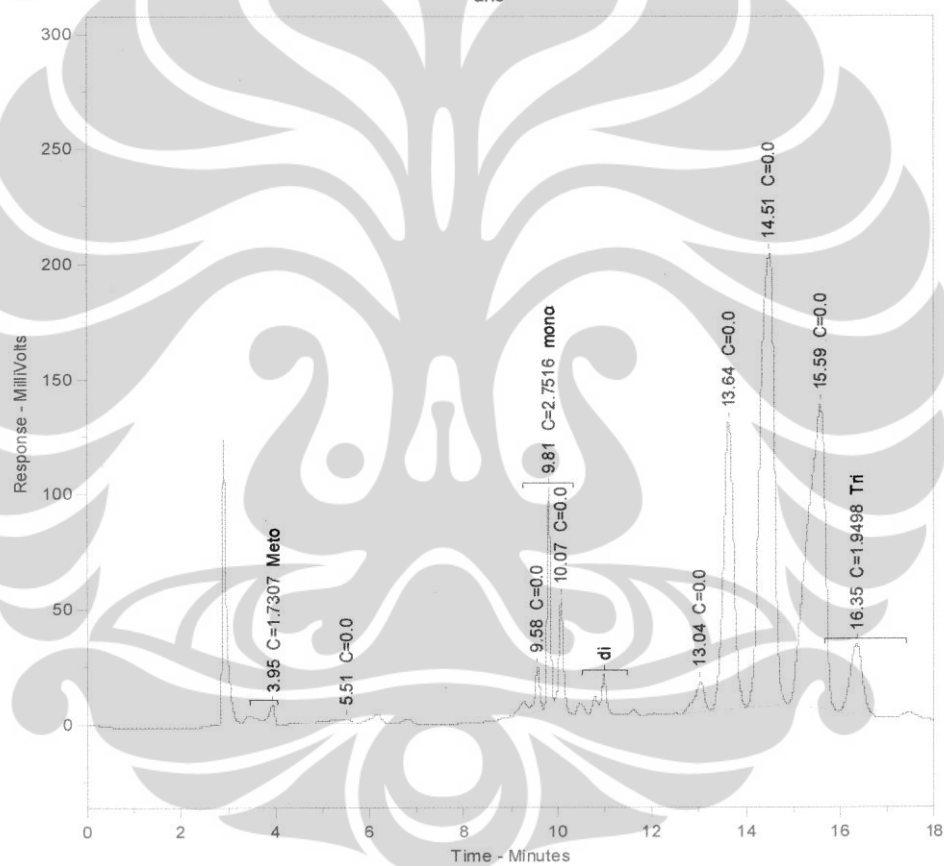
Gambar xi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 40 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

1. 37⁰C; 50 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 1k4in 50
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 14 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.950	62635	1.731	Meto
2	5.510	50042	0.000	
3	9.575	193955	0.000	
4	9.814	495967	2.752	mono
5	10.072	288904	0.000	
6	13.038	190760	0.000	
7	13.639	1890532	0.000	
8	14.509	4089215	0.000	
9	15.588	3520064	0.000	
10	16.350	551606	1.950	Tri

Gambar vii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 50 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

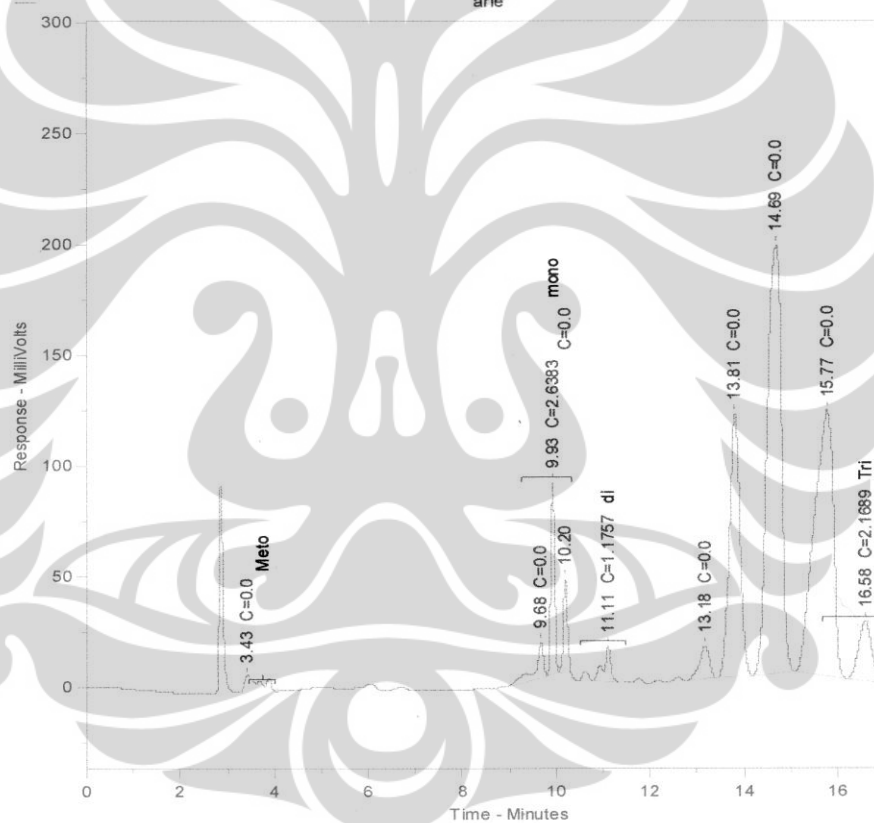
Variasi waktu reaksi sintesis biodiesel sistem *batch* dengan *support* zeolit

a. 37⁰C; 0 Jam; 1:12

Immobilized CRL

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly /zeolit 0
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.432	180551	0.000	
2	9.682	191001	0.000	
3	9.931	475544	2.638	mono
4	10.197	265493	0.000	
5	11.107	172454	1.176	di
6	13.176	226266	0.000	
7	13.809	1824463	0.000	
8	14.689	4058064	0.000	
9	15.770	3387797	0.000	
10	16.582	511342	2.169	Tri

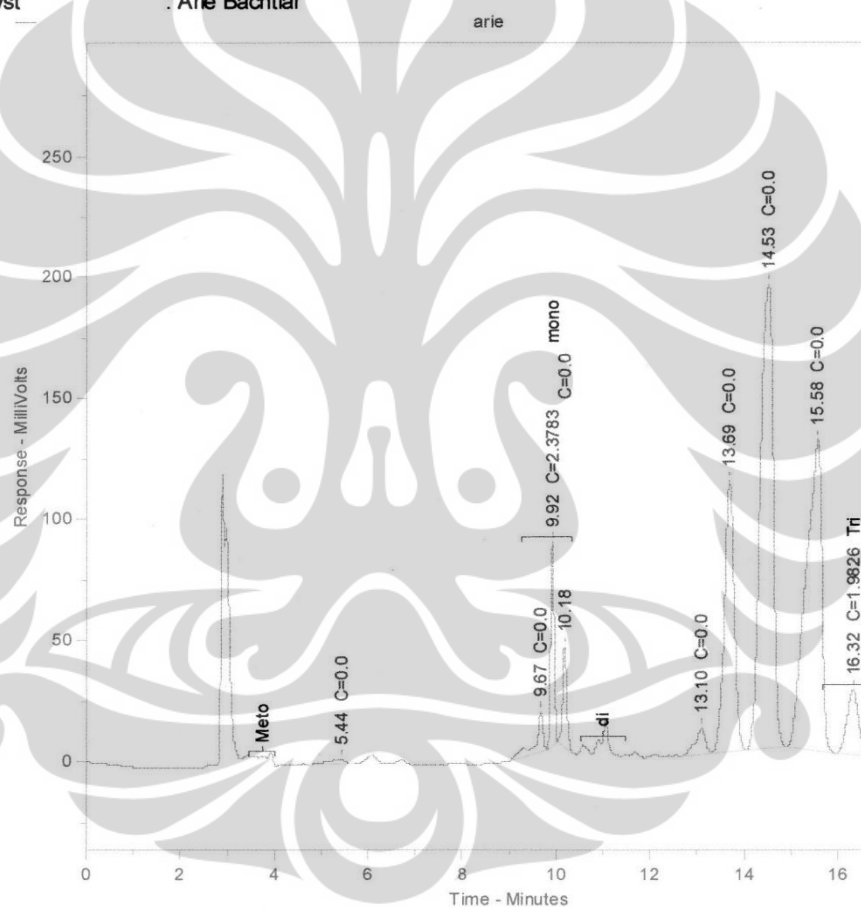
Gambar vii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 0 Jam; 1:12; *Immobilized* CRL

(Lanjutan)

b. 37⁰C; 3 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly *12edix 3*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



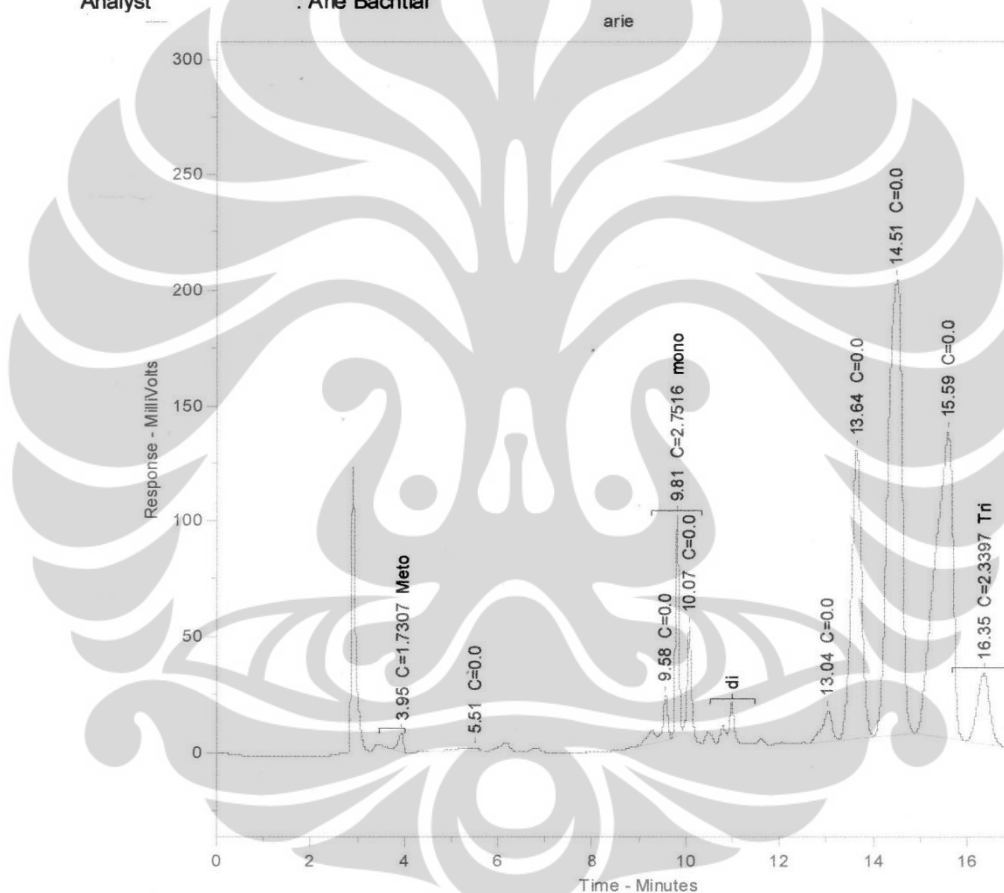
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	5.438	44845	0.000	
2	9.674	176746	0.000	
3	9.919	428672	2.378	mono
4	10.178	250278	0.000	
5	13.097	156147	0.000	
6	13.690	1629288	0.000	
7	14.532	3646241	0.000	
8	15.576	3004156	0.000	
9	16.318	467405	1.983	Tri

Gambar viiiiv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 3 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

c. 37⁰C; 6 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly *12edlx 6*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



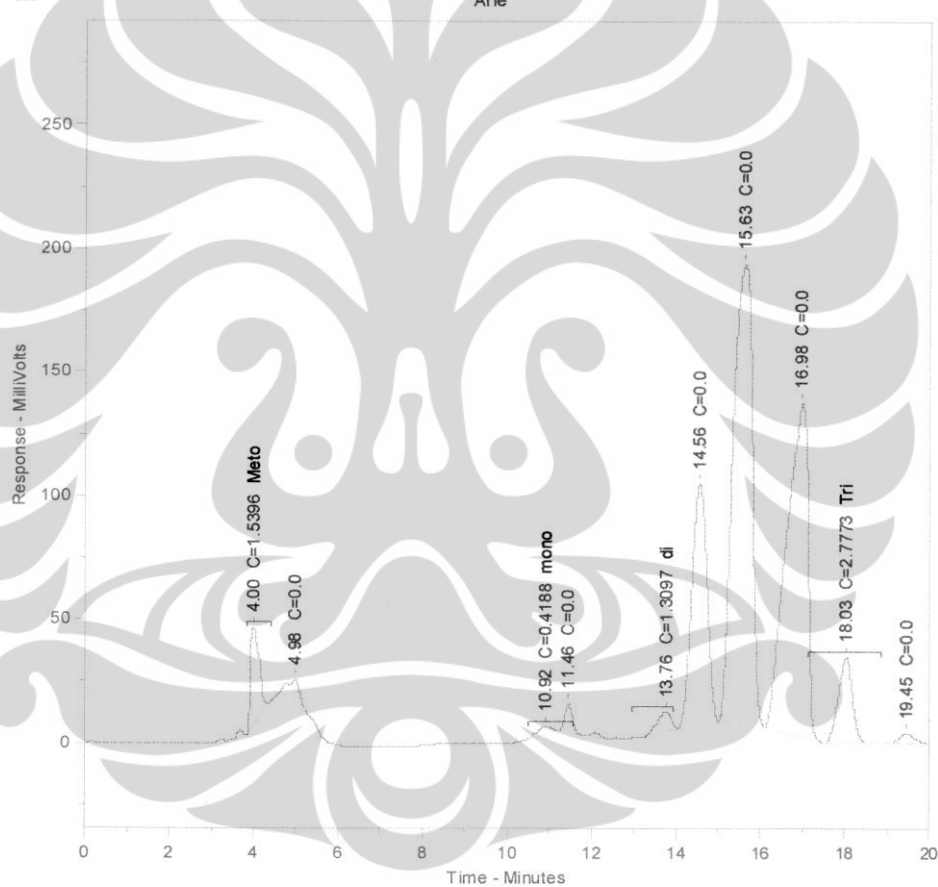
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.950	62635	1.731	Meto
2	5.510	50042	0.000	
3	9.575	193955	0.000	
4	9.814	495967	2.752	mono
5	10.072	288904	0.000	
6	13.038	190760	0.000	
7	13.639	1890532	0.000	
8	14.509	4089215	0.000	
9	15.588	3520064	0.000	
10	16.350	551606	2.340	Tri

Gambar xv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 6 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

d. 37⁰C; 9 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *result 9*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



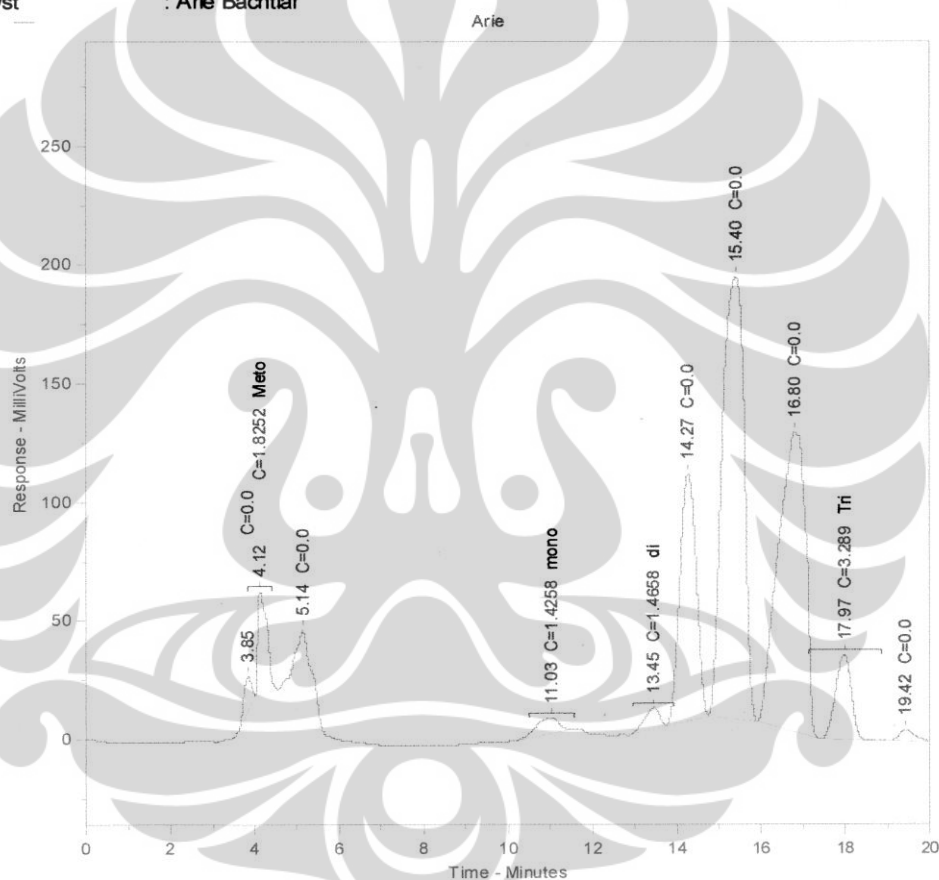
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.002	557205	1.540	Meto
2	4.979	608274	0.000	
3	10.925	75485	0.419	mono
4	11.456	148936	0.000	
5	13.764	192109	1.310	di
6	14.556	2450581	0.000	
7	15.634	5873142	0.000	
8	16.983	4823733	0.000	
9	18.029	785736	2.777	Tri
10	19.447	93623	0.000	

Gambar xvi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 9 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

e. 37⁰C; 12 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / 2011 + 12
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.846	184175	0.000	
2	4.125	660539	1.825	Meto
3	5.141	1041975	0.000	
4	11.025	256997	1.426	mono
5	13.448	215017	1.466	di
6	14.272	2805250	0.000	
7	15.397	6669904	0.000	
8	16.796	5712977	0.000	
9	17.967	930486	3.289	Tri
10	19.419	112651	0.000	

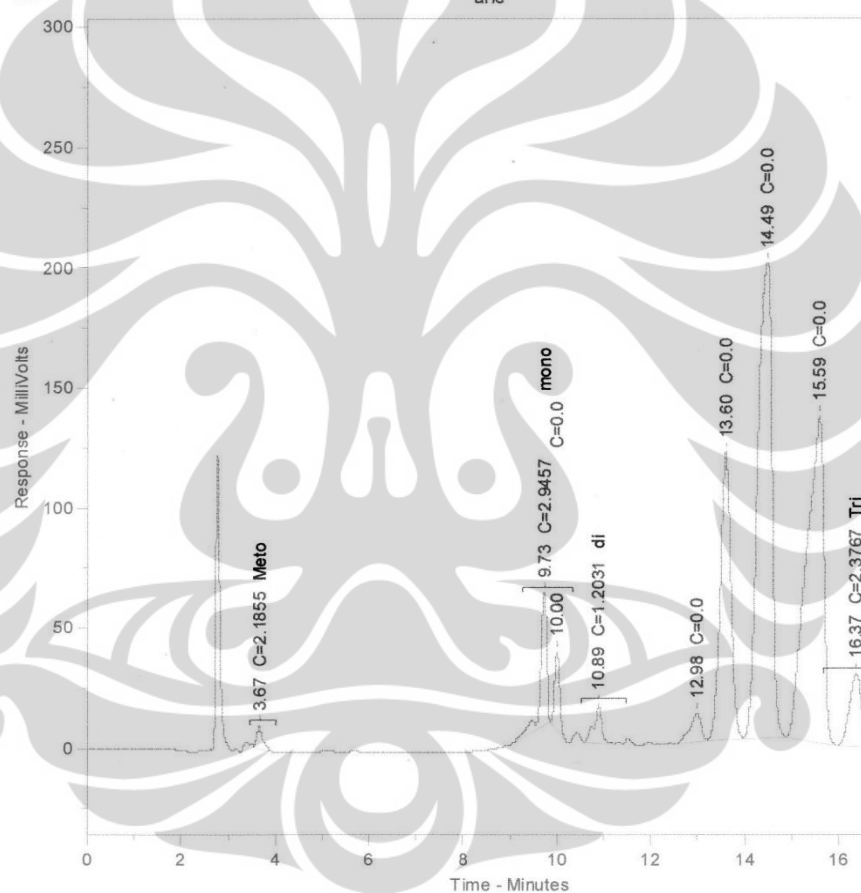
Gambar xvii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 12 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

f.37⁰C; 15 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *reol + 15*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



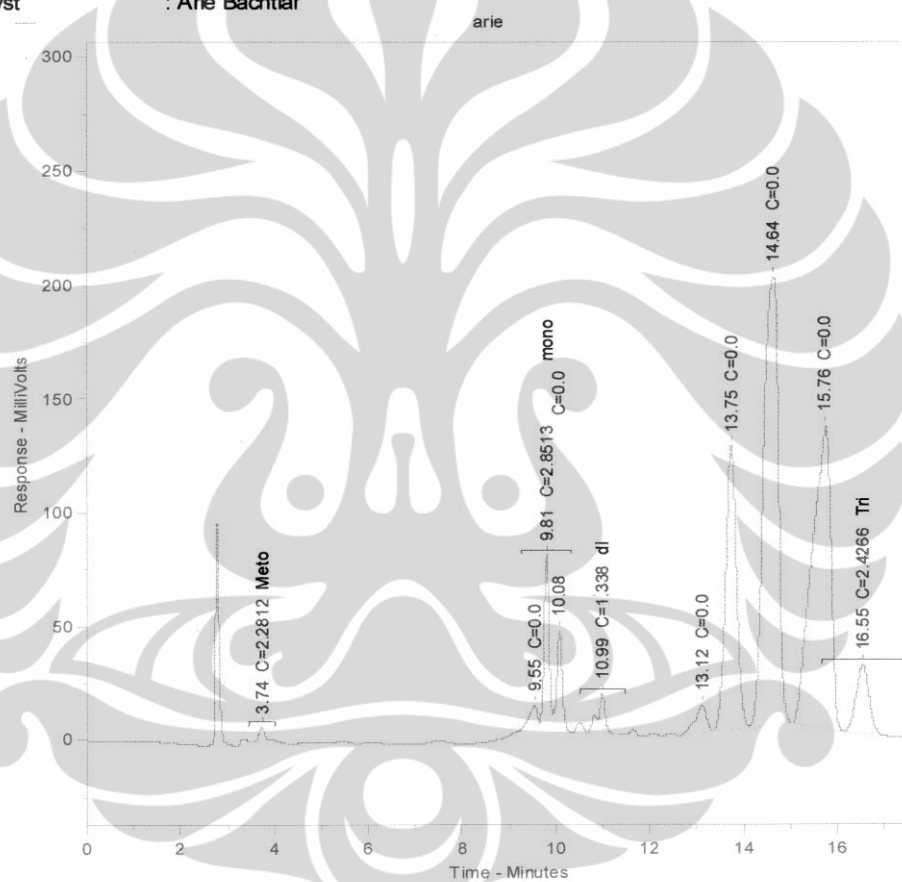
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.667	79096	2.186	Meto
2	9.734	530945	2.946	mono
3	10.004	251367	0.000	
4	10.893	176475	1.203	di
5	12.982	185774	0.000	
6	13.597	1877663	0.000	
7	14.486	4139251	0.000	
8	15.595	3493071	0.000	
9	16.371	560332	2.377	Tri

Gambar xviii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 15 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

g. 37⁰C; 20 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *realy 20*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.735	82560	2.281	Meto
2	9.552	105041	0.000	
3	9.810	513930	2.851	mono
4	10.082	288897	0.000	
5	10.991	196269	1.338	di
6	13.124	194059	0.000	
7	13.745	1983390	0.000	
8	14.643	4302630	0.000	
9	15.761	3704716	0.000	
10	16.546	572096	2.427	Tri

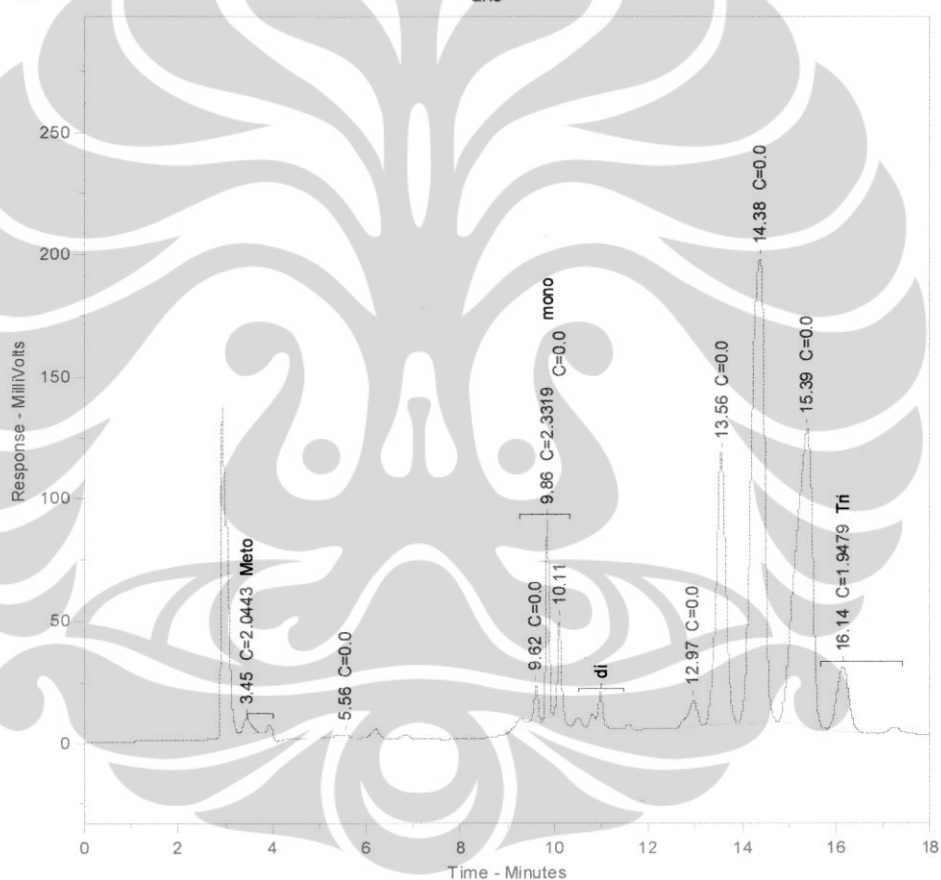
Gambar xix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 20 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

h. 37⁰C; 25 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / *renly 25*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.448	73985	2.044	Meto
2	5.557	35731	0.000	
3	9.617	167725	0.000	
4	9.856	420308	2.332	mono
5	10.108	240107	0.000	
6	12.967	156362	0.000	
7	13.555	1613218	0.000	
8	14.376	3617978	0.000	
9	15.387	3033996	0.000	
10	16.143	459232	1.948	Tri

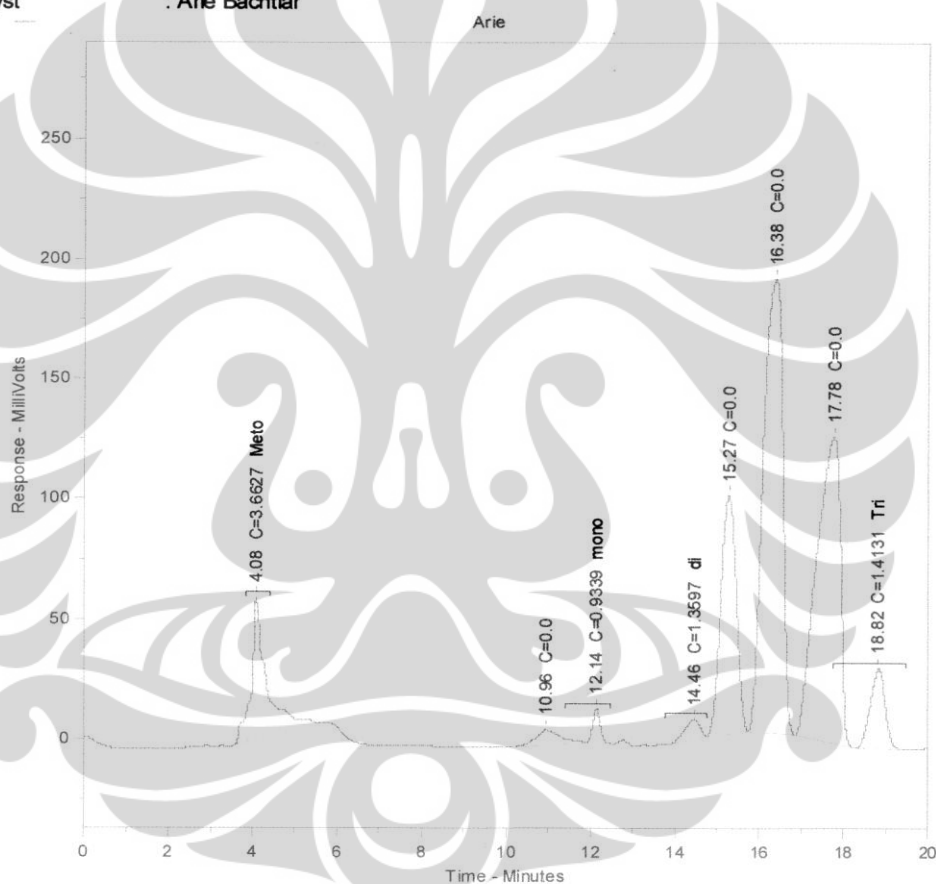
Gambar xx. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 25 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

i. 37⁰C; 30 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly *1204 30*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.081	1325564	3.663	Meto
2	10.961	237225	0.000	
3	12.145	168327	0.934	mono
4	14.455	199448	1.360	di
5	15.271	2503390	0.000	
6	16.375	6006258	0.000	
7	17.780	4999906	0.000	
8	18.822	799546	1.413	Tri

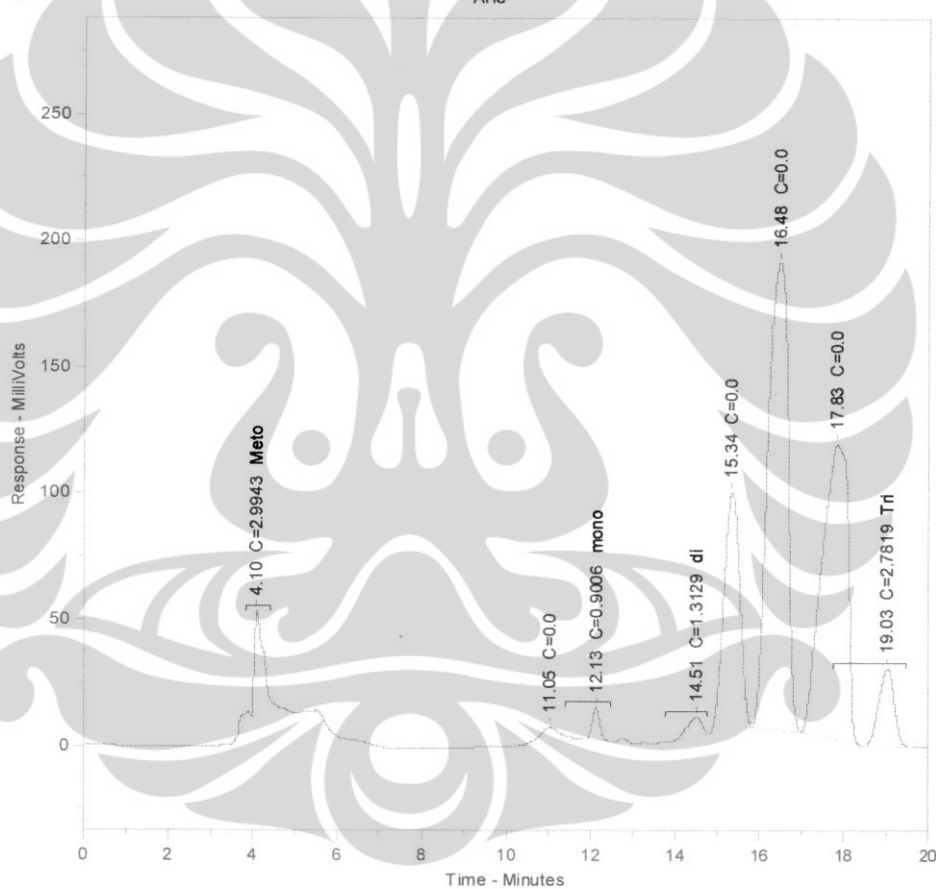
Gambar xxi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 30 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

j. 37⁰C; 40 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly (2012 40)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.103	1083653	2.994	Meto
2	11.049	214941	0.000	
3	12.130	162335	0.901	mono
4	14.509	192580	1.313	di
5	15.345	2459265	0.000	
6	16.475	6102663	0.000	
7	17.831	5001151	0.000	
8	19.029	787026	2.782	Tri

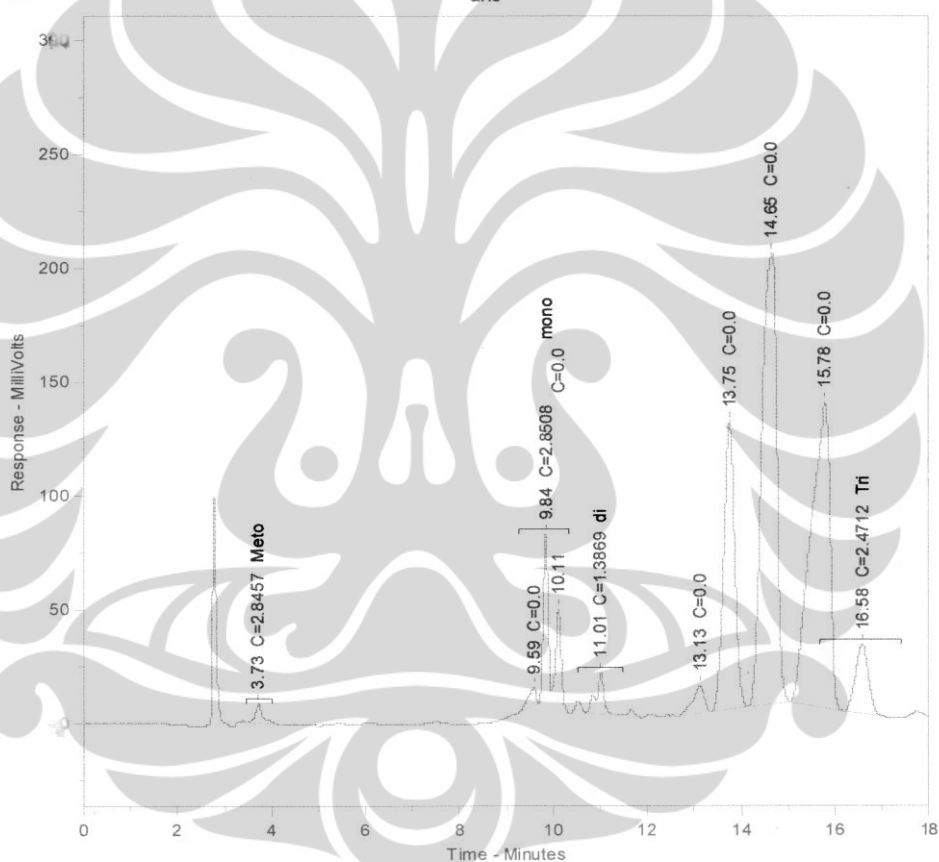
Gambar xxii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 40 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

k. 37⁰C; 50 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / 2012 50
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 29 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.728	102990	2.846	Meto
2	9.587	95783	0.000	
3	9.844	513851	2.851	mono
4	10.112	297128	0.000	
5	11.015	203442	1.387	di
6	13.126	201235	0.000	
7	13.752	2035994	0.000	
8	14.653	4376793	0.000	
9	15.784	3807255	0.000	
10	16.578	582614	2.471	Tri

Gambar xixiii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 50 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

Variasi waktu reaksi sintesis biodiesel sistem *batch* dengan *support* kitosan

a. 37⁰C; 0 Jam; 1:12

Immobilized CRL

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / ~~16.05.12~~ 0,6 % (o)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



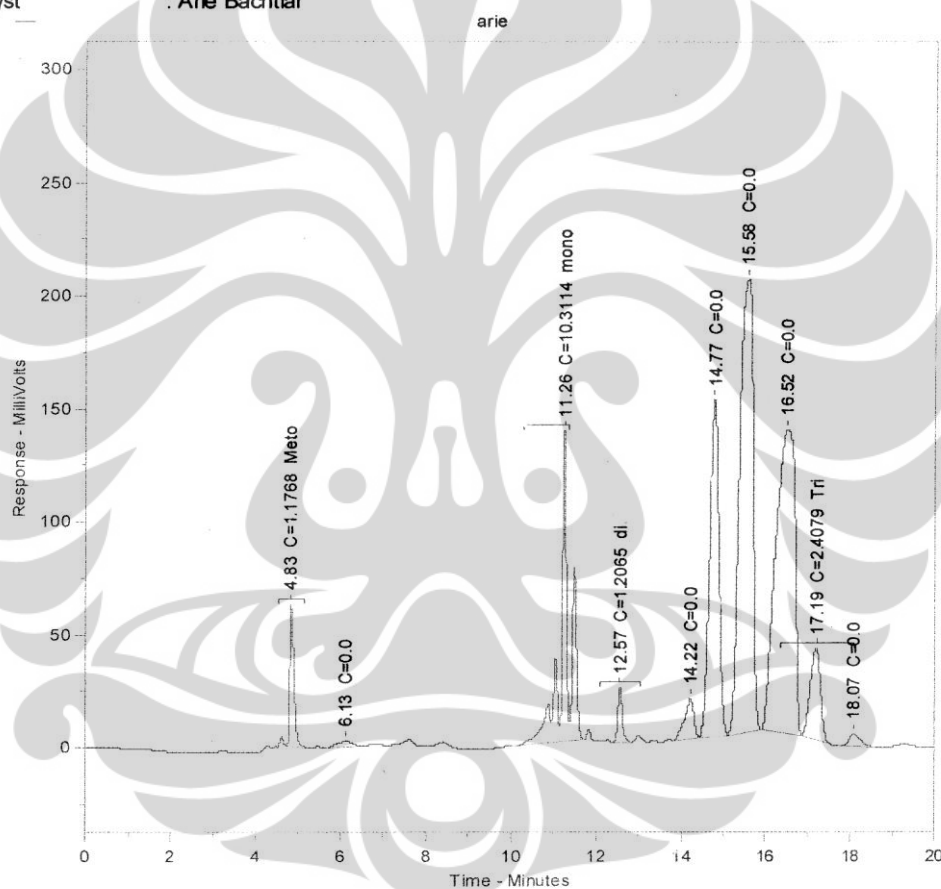
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.886	1039097	0.000	
2	4.575	590286	0.000	
3	10.835	298428	1.656	mono
4	12.548	111916	0.763	di
5	13.129	1881298	0.000	
6	13.863	4594110	0.000	
7	14.761	3899069	0.000	
8	15.513	707294	3.000	Tri
9	16.455	104894	0.000	

Gambar xxv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 0 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

b. 37⁰C; 3 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 10,6% (3)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



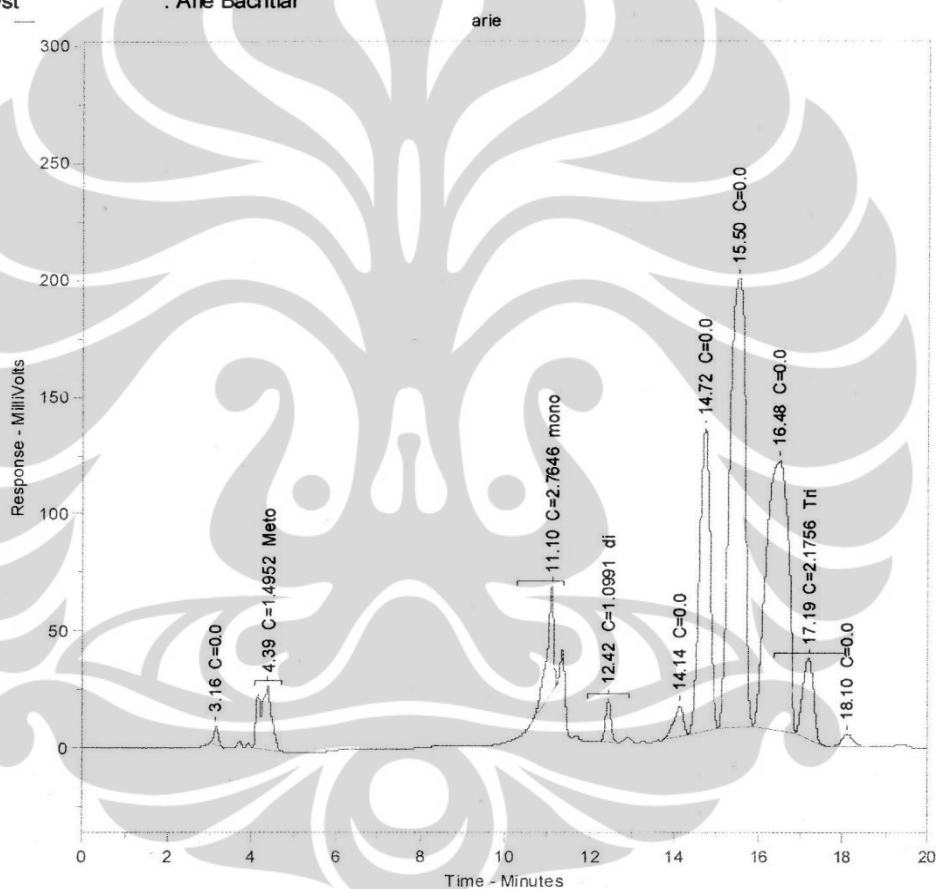
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.835	425906	1.177	Meto
2	6.132	58241	0.000	
3	11.260	1858586	10.311	mono
4	12.568	176984	1.207	di
5	14.216	257719	0.000	
6	14.772	2257836	0.000	
7	15.579	4495085	0.000	
8	16.524	4285756	0.000	
9	17.187	681215	2.408	Tri
10	18.074	97644	0.000	

Gambar xxv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 3 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

c. 37⁰C; 6 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly (0.6⁰W) (6)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



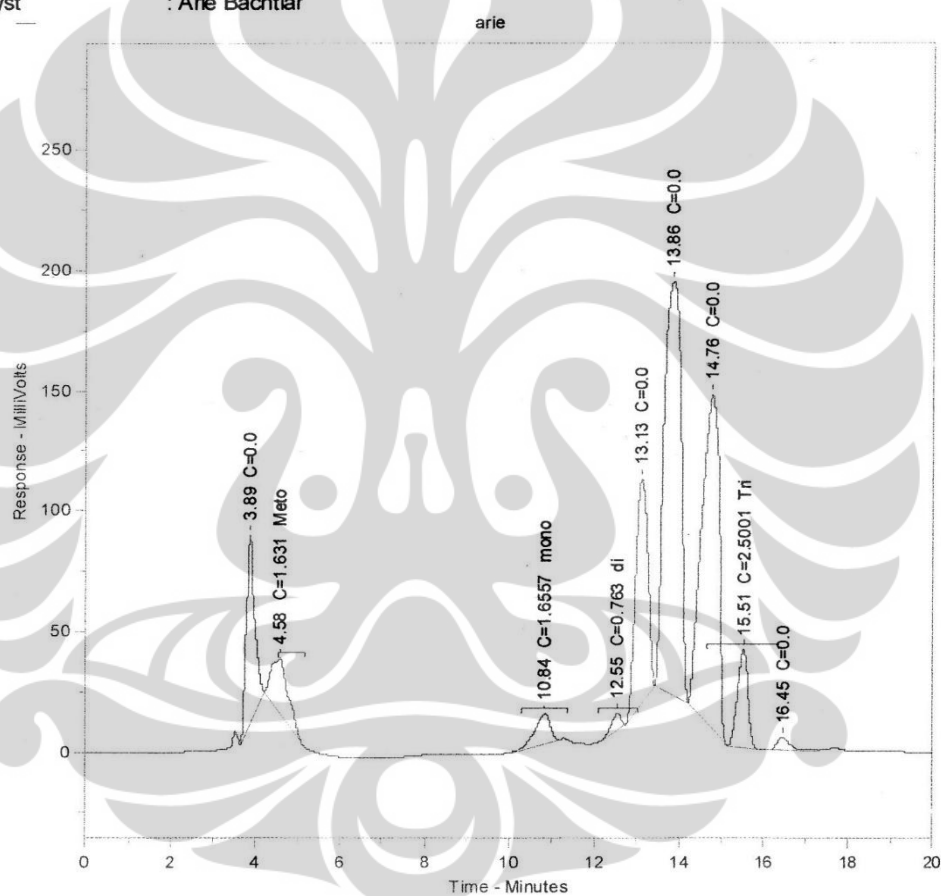
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.162	63036	0.000	
2	4.390	541143	1.495	Meto
3	11.103	498303	2.765	mono
4	12.422	161229	1.099	di
5	14.143	210679	0.000	
6	14.718	2171414	0.000	
7	15.495	4773396	0.000	
8	16.477	4288989	0.000	
9	17.188	615511	2.176	Tri
10	18.104	97259	0.000	

Gambar xxvi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 6 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

d. 37⁰C; 9 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 10,6% (9)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



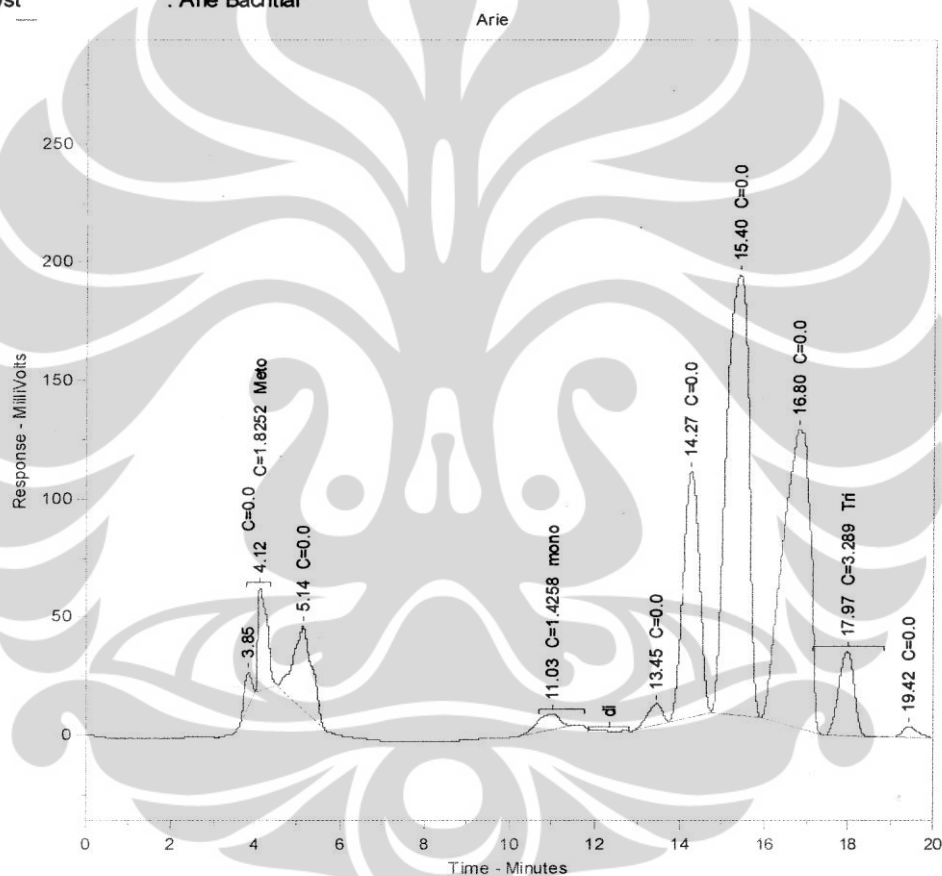
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.886	1039097	0.000	
2	4.575	590286	1.631	Meto
3	10.835	298428	1.656	mono
4	12.548	111916	0.763	di
5	13.129	1881298	0.000	
6	13.863	4594110	0.000	
7	14.761	3899069	0.000	
8	15.513	707294	2.500	Tri
9	16.455	104894	0.000	

Gambar xxvii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 9 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

e. 37⁰C; 12 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 10,6% (12)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtar



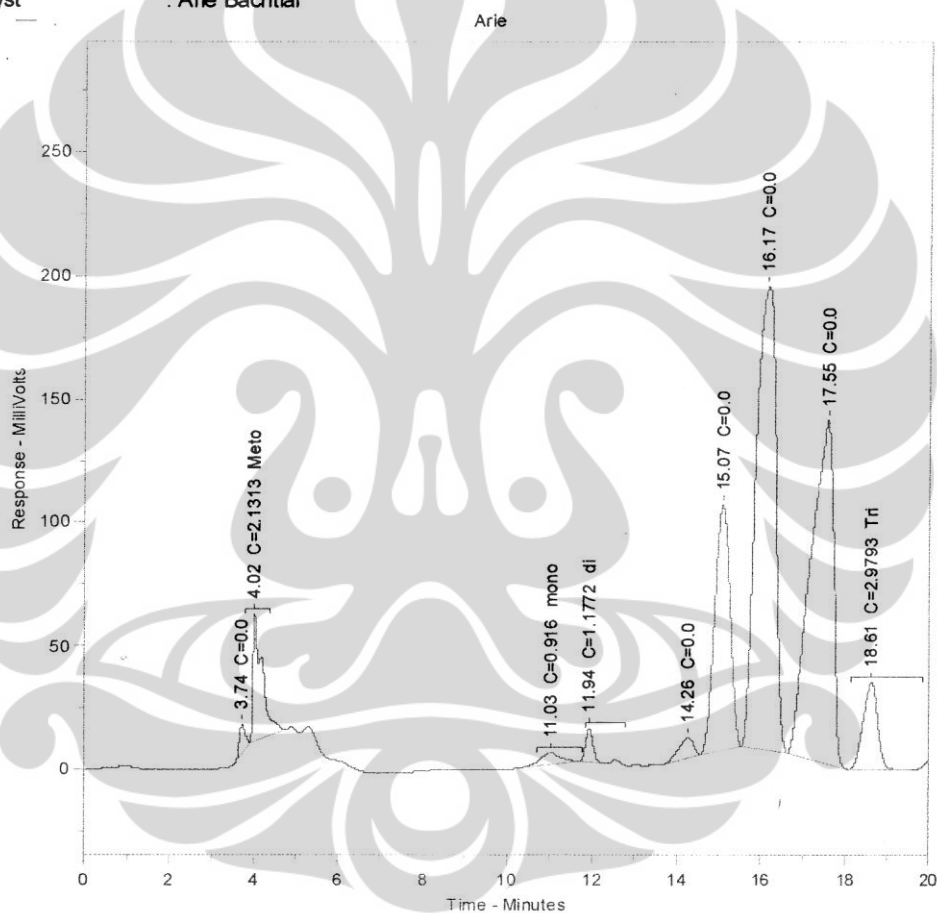
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.846	184175	0.000	
2	4.125	660539	1.825	Meto
3	5.141	1041975	0.000	
4	11.025	256997	1.426	mono
5	13.448	215017	0.000	
6	14.272	2805250	0.000	
7	15.397	6669904	0.000	
8	16.796	5712977	0.000	
9	17.967	930486	3.289	Tri
10	19.419	112651	0.000	

Gambar xxviii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 12 Jam; 1:12;*Immobilized CRL*

f.37⁰C; 15 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / 0.6 % (15)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



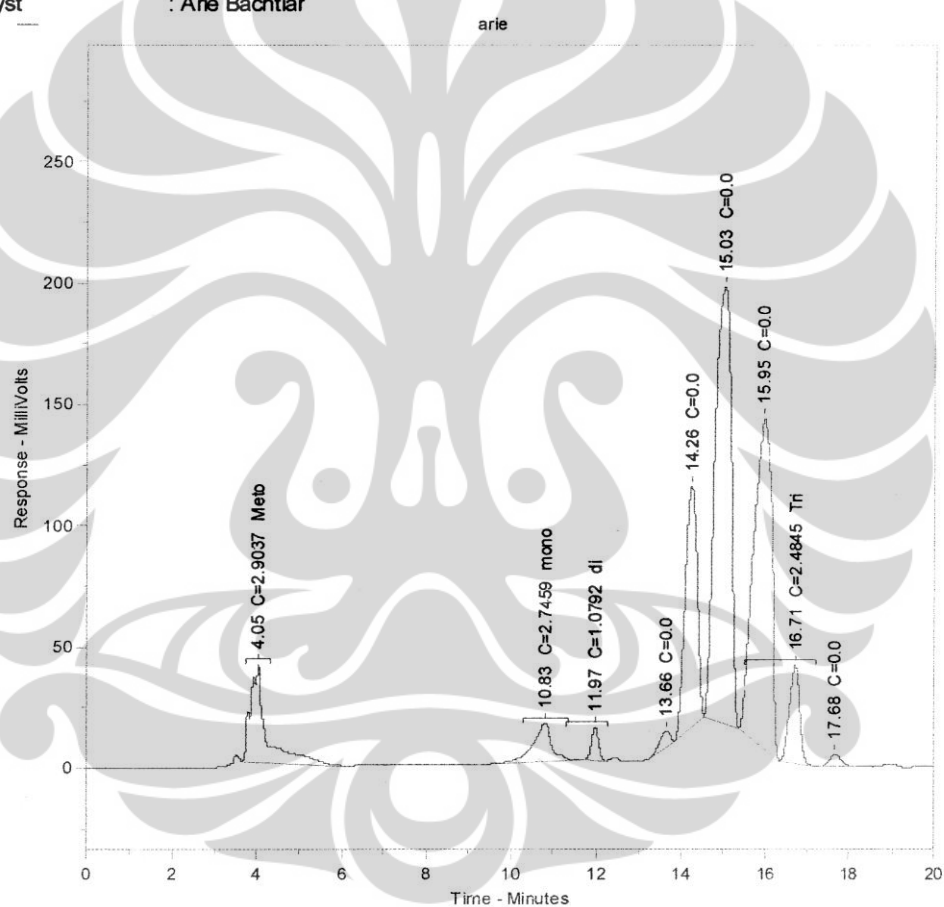
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.737	109906	0.000	
2	4.016	771338	2.131	Meto
3	11.027	165100	0.916	mono
4	11.937	172675	1.177	di
5	14.265	197388	0.000	
6	15.070	2557665	0.000	
7	16.166	6097119	0.000	
8	17.555	5087150	0.000	
9	18.614	842877	2.979	Tri

Gambar xxix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 15 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

g. 37⁰C; 20 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly / 0,6 % (20)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.052	1050891	2.904	Meto
2	10.832	494935	2.746	mono
3	11.973	158302	1.079	di
4	13.664	115458	0.000	
5	14.257	1975493	0.000	
6	15.029	4728651	0.000	
7	15.953	4063955	0.000	
8	16.708	702894	2.485	Tri
9	17.677	95958	0.000	

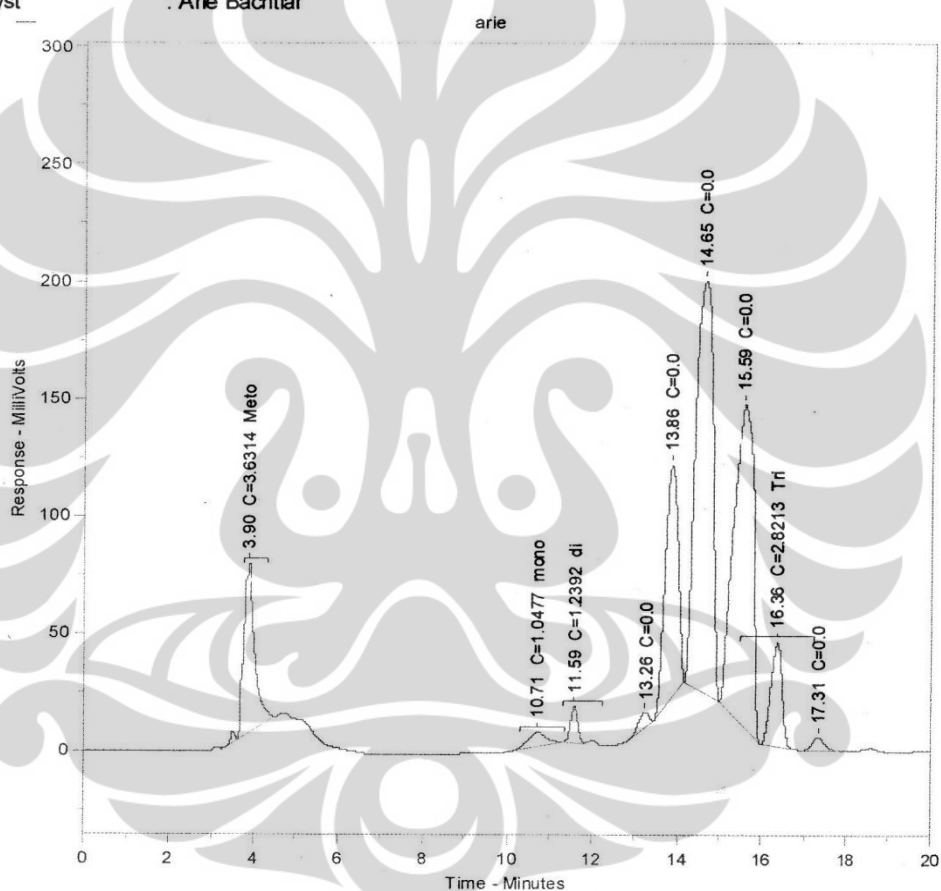
Gambar xxx. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 20 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

h. 37⁰C; 25 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 10.6% (25)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



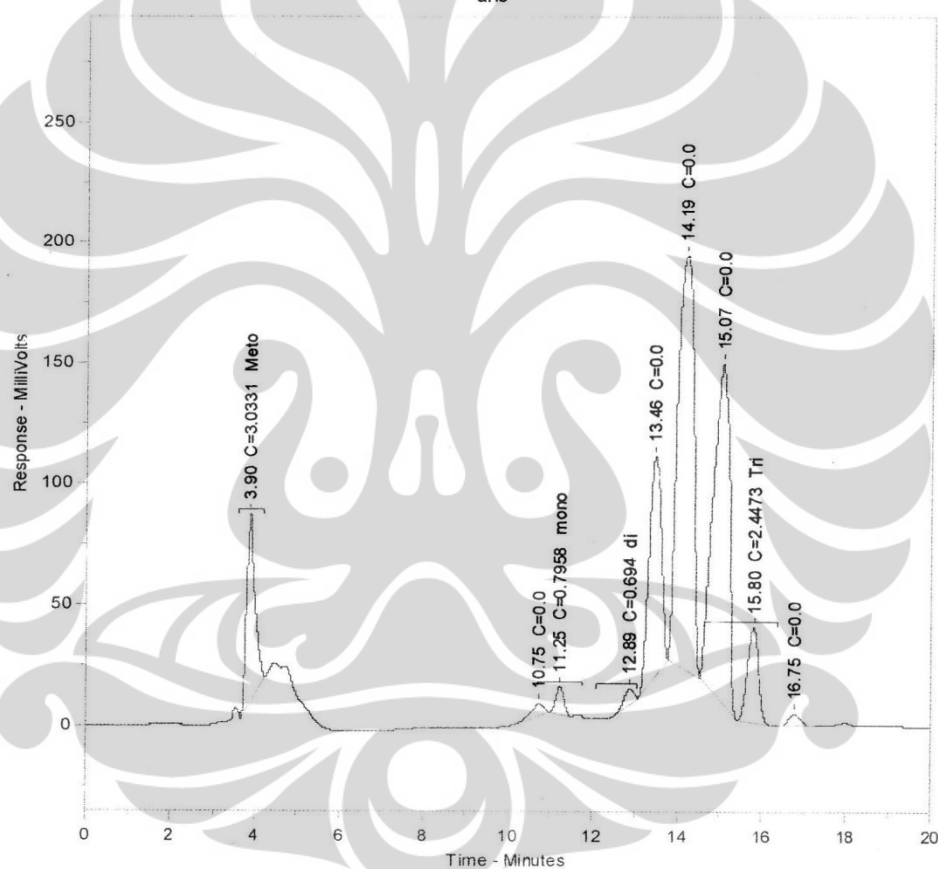
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.900	1314252	3.631	Meto
2	10.712	188834	1.048	mono
3	11.590	181777	1.239	di
4	13.261	114388	0.000	
5	13.862	2086086	0.000	
6	14.647	5000349	0.000	
7	15.590	4432588	0.000	
8	16.365	798177	2.821	Tri
9	17.313	110760	0.000	

Gambar xxxi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 25 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

i. 37⁰C; 30 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly (0,6% x)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.897	1097718	3.033	Meto
2	10.753	94168	0.000	
3	11.247	143446	0.796	mono
4	12.887	101800	0.694	di
5	13.459	1815732	0.000	
6	14.193	4496185	0.000	
7	15.067	3791117	0.000	
8	15.799	692365	2.447	Tri
9	16.747	92347	0.000	

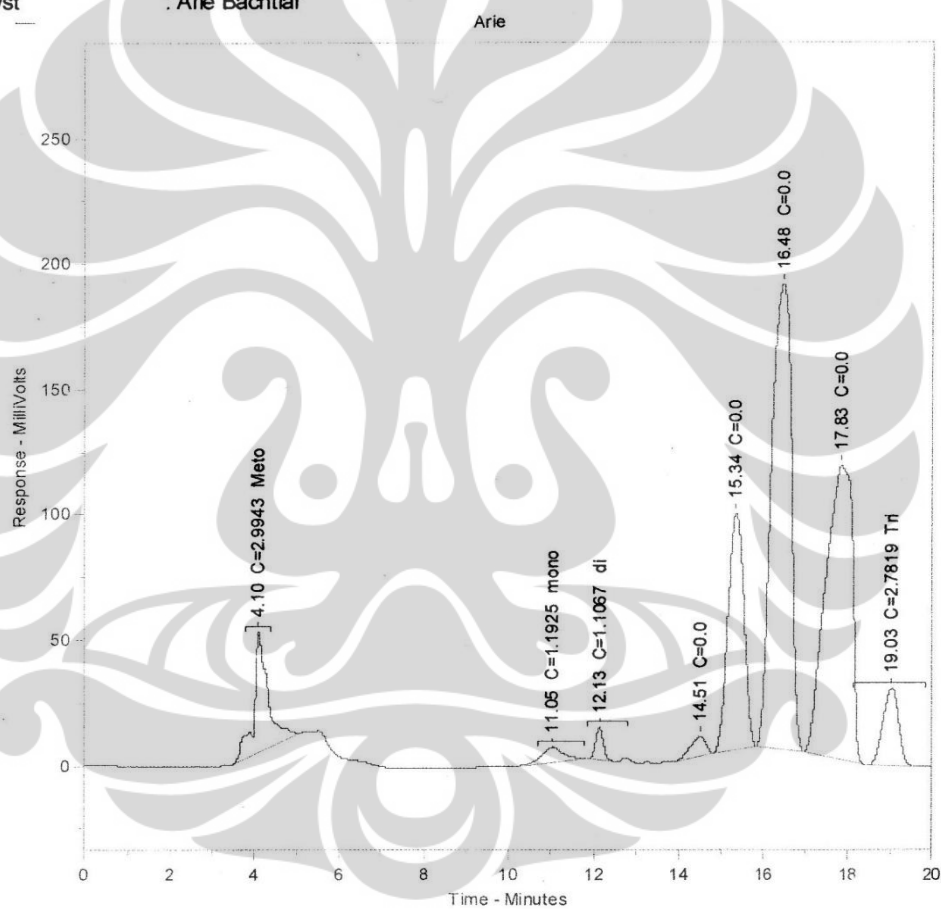
Gambar xxxii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 30 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

j. 37⁰C; 40 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly 10,6% (40)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.103	1083653	2.994	Meto
2	11.049	214941	1.192	mono
3	12.130	162335	1.107	di
4	14.509	192580	0.000	
5	15.345	2459265	0.000	
6	16.475	6102663	0.000	
7	17.831	5001151	0.000	
8	19.029	787026	2.782	Tri

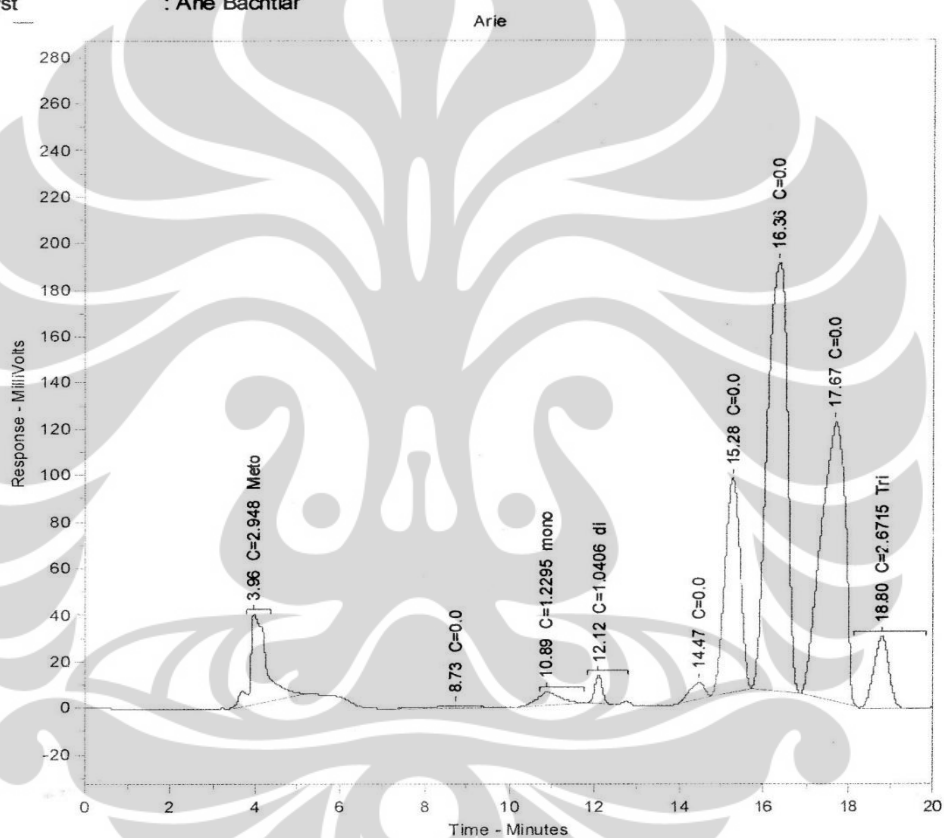
Gambar xxxiii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 40 Jam; 1:12;*Immobilized CRL*

(Lanjutan)

k. 37⁰C; 50 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Renly /0,0% (50)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 24 Mei 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.964	1066915	2.948	Meto
2	8.733	65711	0.000	
3	10.886	221610	1.229	mono
4	12.116	152646	1.041	di
5	14.469	169541	0.000	
6	15.277	2337829	0.000	
7	16.360	5891408	0.000	
8	17.673	4833509	0.000	
9	18.804	755781	2.671	Tri

Gambar xxxiv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 50 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

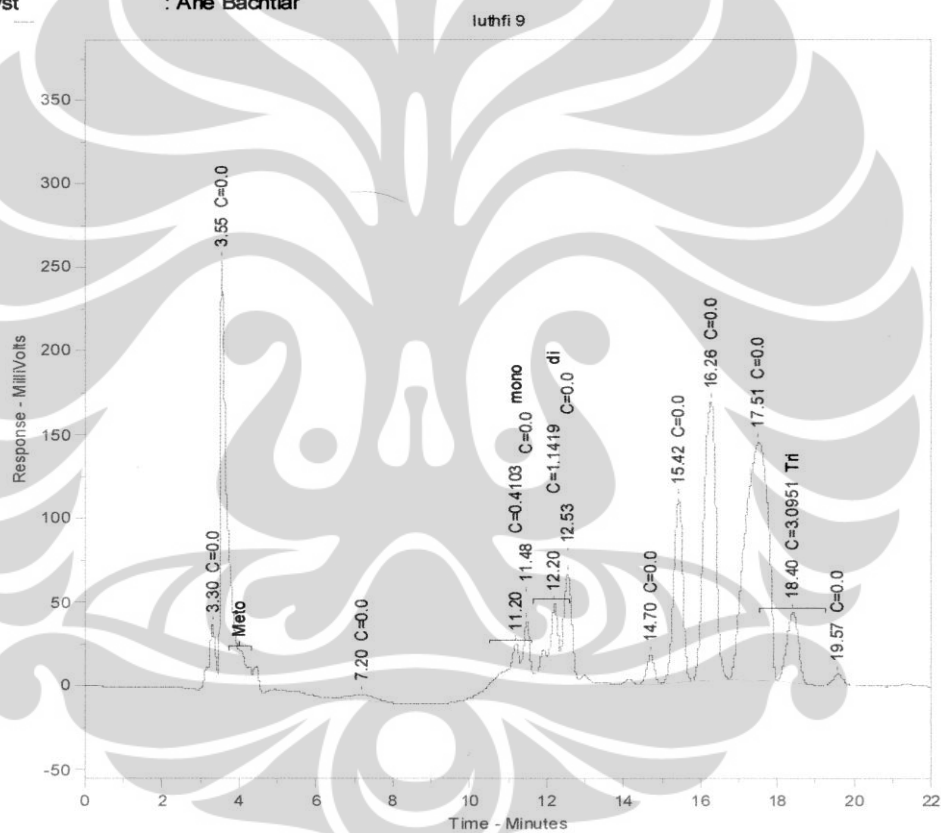
Variasi waktu reaksi sintesis biodiesel sistem kontinu dengan *support* kitin

a. 37⁰C; 0 Jam; 1:12

Immobilized CRL

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / *Khazanah*
 Method File : Biodiesel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



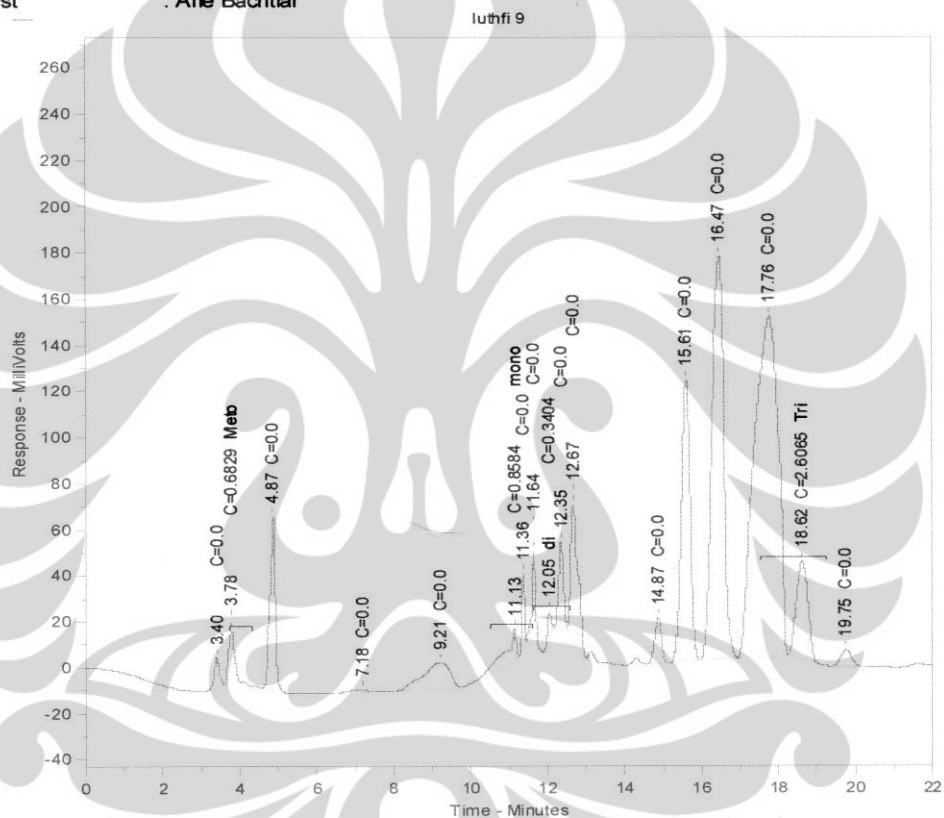
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.304	350230	0.000	
2	3.550	2989970	0.000	
3	7.202	186162	0.000	
4	11.204	184889	0.410	mono
5	11.478	252378	0.000	
6	12.204	418740	1.142	di
7	12.532	687961	0.000	
8	14.701	230654	0.000	
9	15.424	1815924	0.000	
10	16.264	3589806	0.000	
11	17.510	5923901	0.000	
12	18.401	875622	3.095	Tri
13	19.567	132754	0.000	

Gambar xxxv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 0 Jam; 1:12; *Immobilized* CRL

b. 37⁰C; 3 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / Khitin 3
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.401	125188	0.000	
2	3.782	308945	0.683	Meto
3	4.870	723907	0.000	
4	7.182	41517	0.000	
5	9.205	554084	0.000	
6	11.132	257884	0.858	mono
7	11.365	161785	0.000	
8	11.642	287535	0.000	
9	12.050	83222	0.340	di
10	12.351	331016	0.000	
11	12.668	776292	0.000	
12	14.872	258981	0.000	
13	15.609	1973369	0.000	
14	16.467	3745080	0.000	
15	17.763	6370751	0.000	
16	18.620	921757	2.607	Tri
17	19.755	146195	0.000	

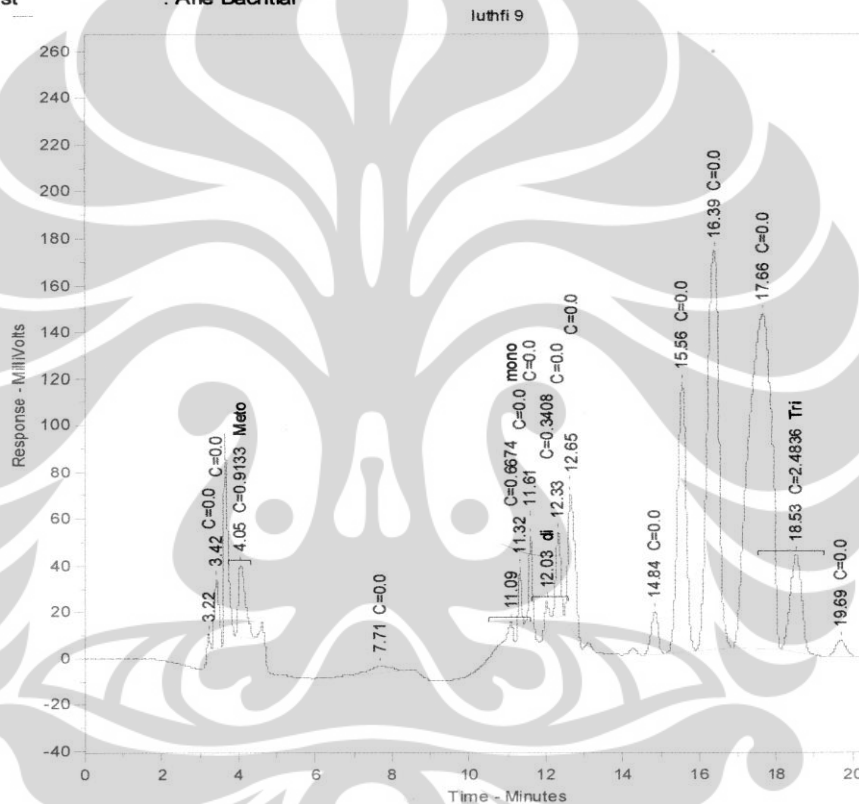
Gambar xxxvi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 3 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

c. 37⁰C; 6 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / *luthfi 9*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.216	55193	0.000	
2	3.424	258068	0.000	
3	4.046	413167	0.913	Meto
4	7.707	124390	0.000	
5	11.086	200481	0.667	mono
6	11.324	168505	0.000	
7	11.608	283283	0.000	
8	12.028	83318	0.341	di
9	12.331	322426	0.000	
10	12.652	744881	0.000	
11	14.836	237429	0.000	
12	15.560	1835199	0.000	
13	16.394	3548731	0.000	
14	17.661	5992010	0.000	Tri
15	18.526	878283	2.484	
16	19.691	134767	0.000	

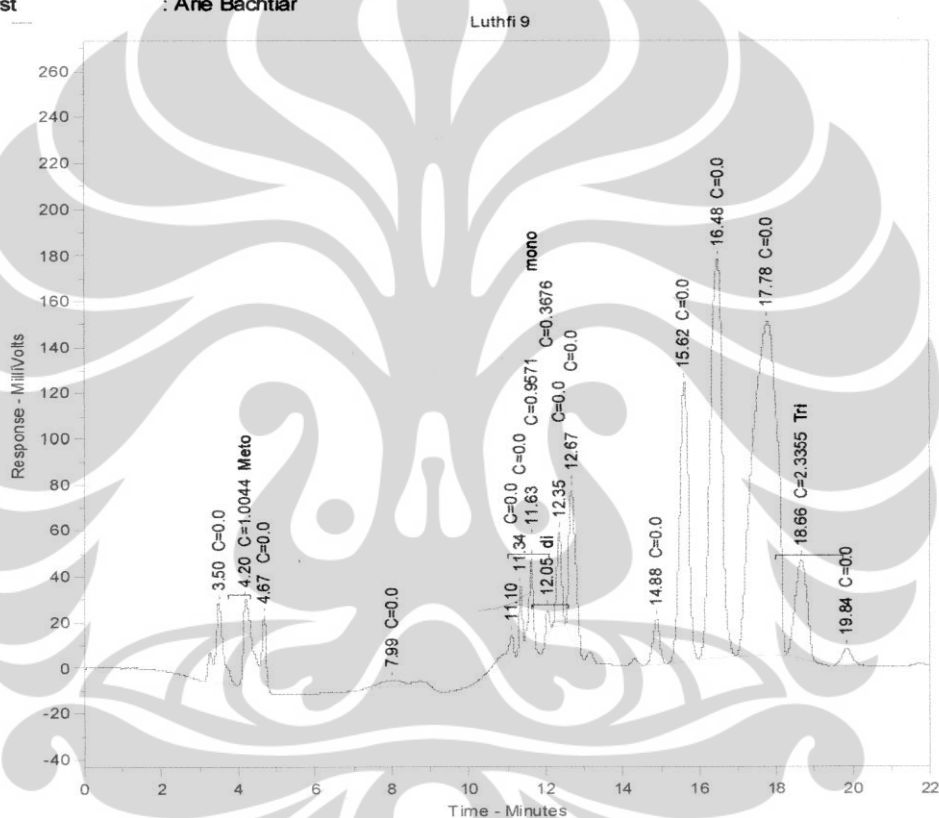
Gambar xxxvii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 6 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

d. 37⁰C; 9 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / *Ichitin 9*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.496	560256	0.000	
2	4.198	454398	1.004	Meto
3	4.670	184283	0.000	
4	7.994	120790	0.000	
5	11.103	213925	0.000	
6	11.345	151615	0.000	
7	11.629	287511	0.957	mono
8	12.050	89874	0.368	di
9	12.352	369101	0.000	
10	12.674	809740	0.000	
11	14.882	260225	0.000	
12	15.620	1985451	0.000	
13	16.483	3759147	0.000	
14	17.777	6420557	0.000	
15	18.657	943896	2.335	Tri
16	19.838	151536	0.000	

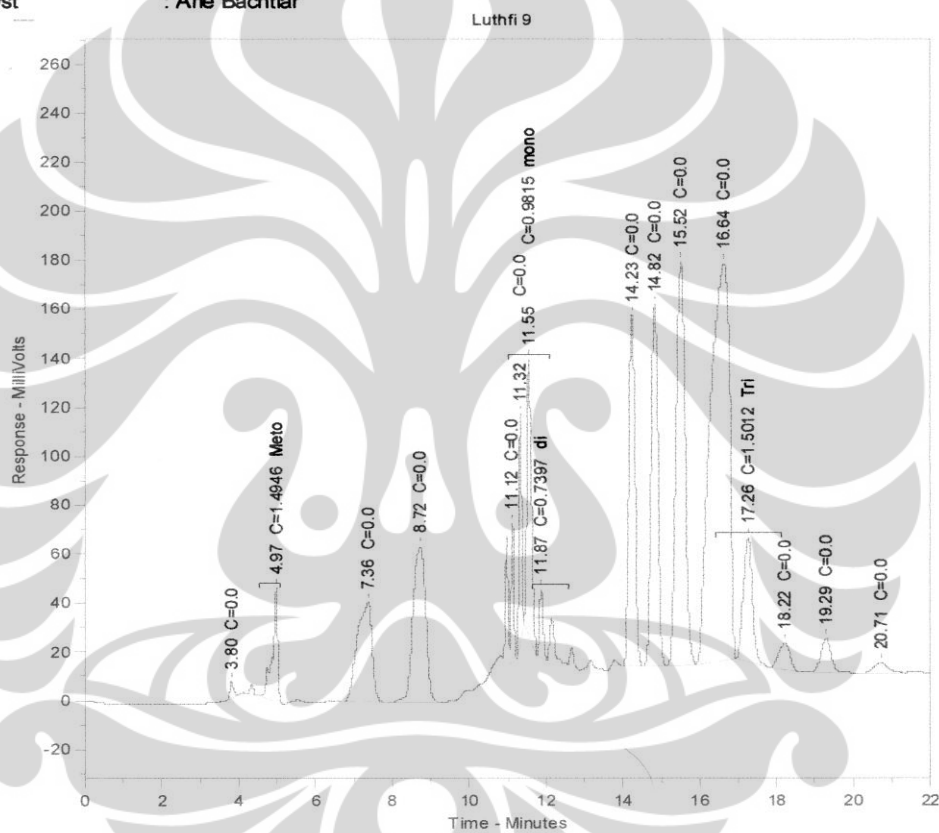
Gambar xxxviii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 9 Jam; 1:12;*Immobilized CRL*

(Lanjutan)

e. 37⁰C; 12 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / khatun 12
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



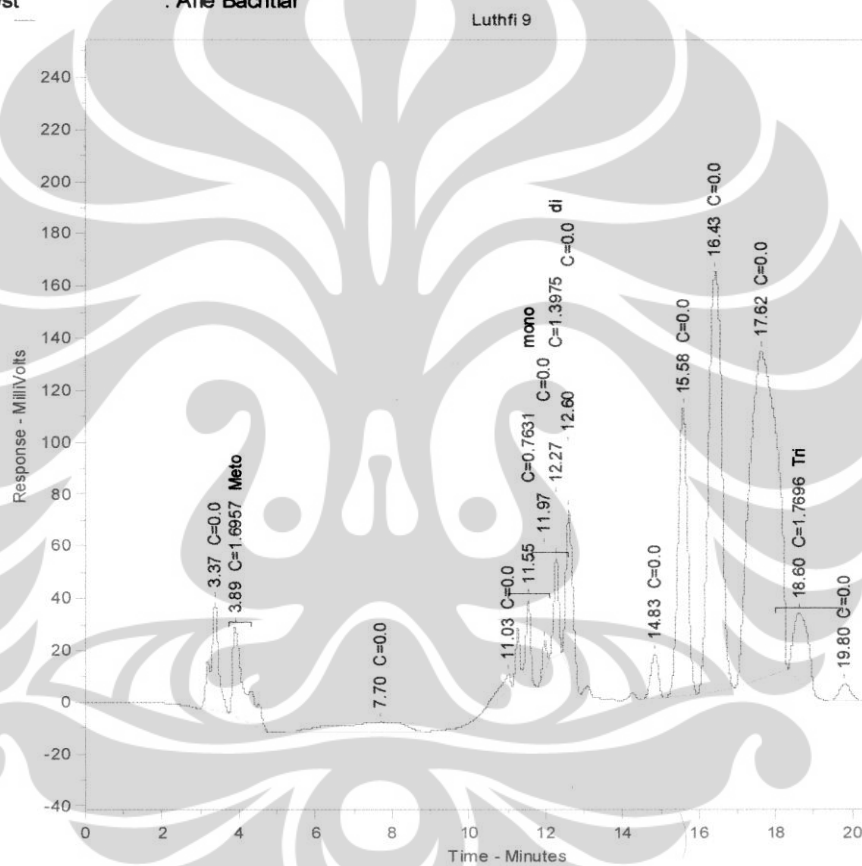
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.799	41944	0.000	
2	4.974	450743	1.495	Meto
3	7.358	1098472	0.000	
4	8.722	1481158	0.000	
5	11.117	624570	0.000	
6	11.319	451559	0.000	
7	11.547	884577	0.982	mono
8	11.873	180831	0.740	di
9	14.228	1599610	0.000	
10	14.821	1864645	0.000	
11	15.519	2731459	0.000	
12	16.637	5642352	0.000	
13	17.259	849427	1.501	Tri
14	18.219	229993	0.000	
15	19.288	257333	0.000	
16	20.714	104735	0.000	

Gambar xxxix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 12 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

f.37⁰C; 15 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela /khatun 15
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



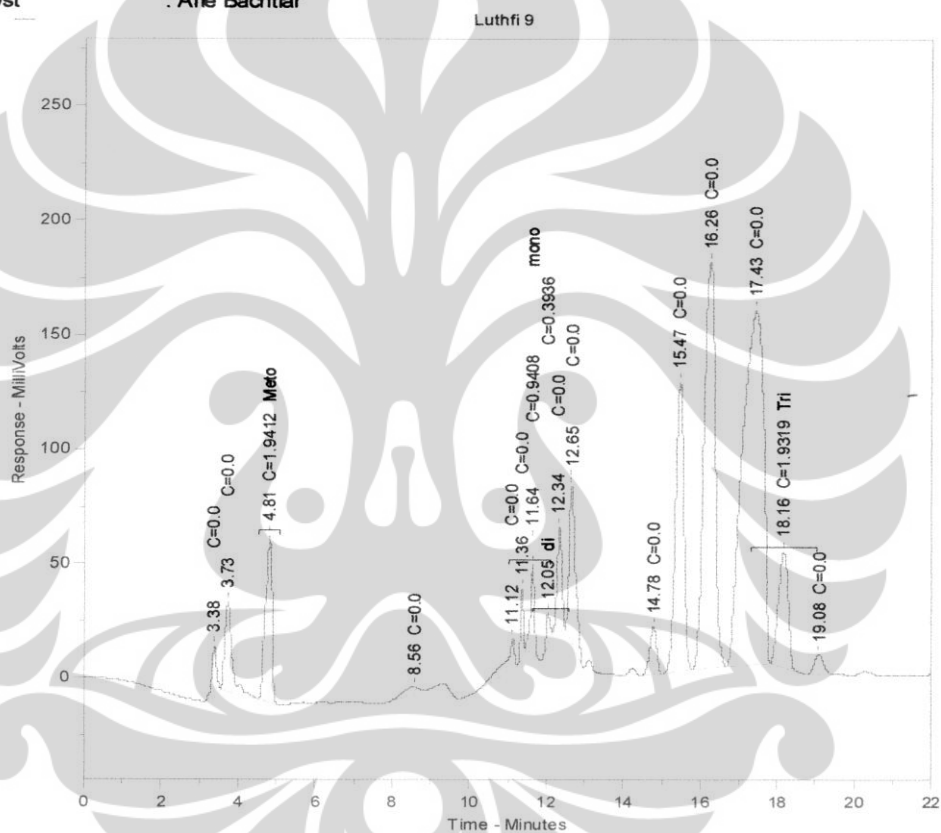
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.367	630145	0.000	
2	3.894	767122	1.696	Meto
3	7.701	497059	0.000	
4	11.029	153530	0.000	
5	11.548	229238	0.763	mono
6	11.972	82834	0.000	
7	12.273	341662	1.398	di
8	12.596	754471	0.000	
9	14.834	243271	0.000	
10	15.583	1916255	0.000	
11	16.425	3848345	0.000	
12	17.618	6286342	0.000	
13	18.595	715180	1.770	Tri
14	19.804	138680	0.000	

Gambar xl. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 15 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

g. 37⁰C; 20 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / *thun 20*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



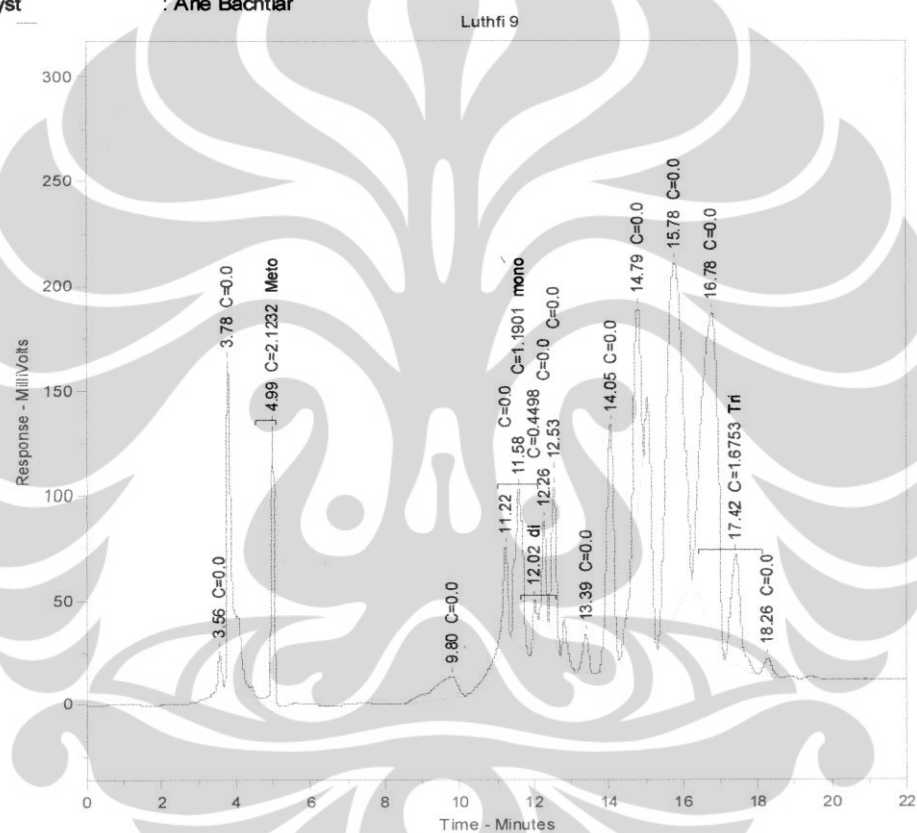
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.376	179419	0.000	
2	3.730	509218	0.000	
3	4.812	878175	1.941	Meto
4	8.561	96969	0.000	
5	11.120	235480	0.000	
6	11.360	157607	0.000	
7	11.638	282633	0.941	mono
8	12.045	96219	0.394	di
9	12.340	395024	0.000	
10	12.653	811669	0.000	
11	14.776	257785	0.000	
12	15.468	1938280	0.000	
13	16.263	3559093	0.000	
14	17.432	5892261	0.000	
15	18.160	910944	1.932	Tri
16	19.083	153414	0.000	

Gambar xli. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 20 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

h. 37⁰C; 25 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / khus 25
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.556	128286	0.000	
2	3.780	1778352	0.000	
3	4.988	768417	2.123	Meto
4	9.801	466652	0.000	
5	11.223	520848	0.000	
6	11.581	1072579	1.190	mono
7	12.019	109973	0.450	di
8	12.263	349163	0.000	
9	12.526	629735	0.000	
10	13.387	204432	0.000	
11	14.051	1522613	0.000	
12	14.792	1306321	0.000	
13	15.777	5069260	0.000	
14	16.783	4519598	0.000	
15	17.417	947906	1.675	Tri
16	18.261	133079	0.000	

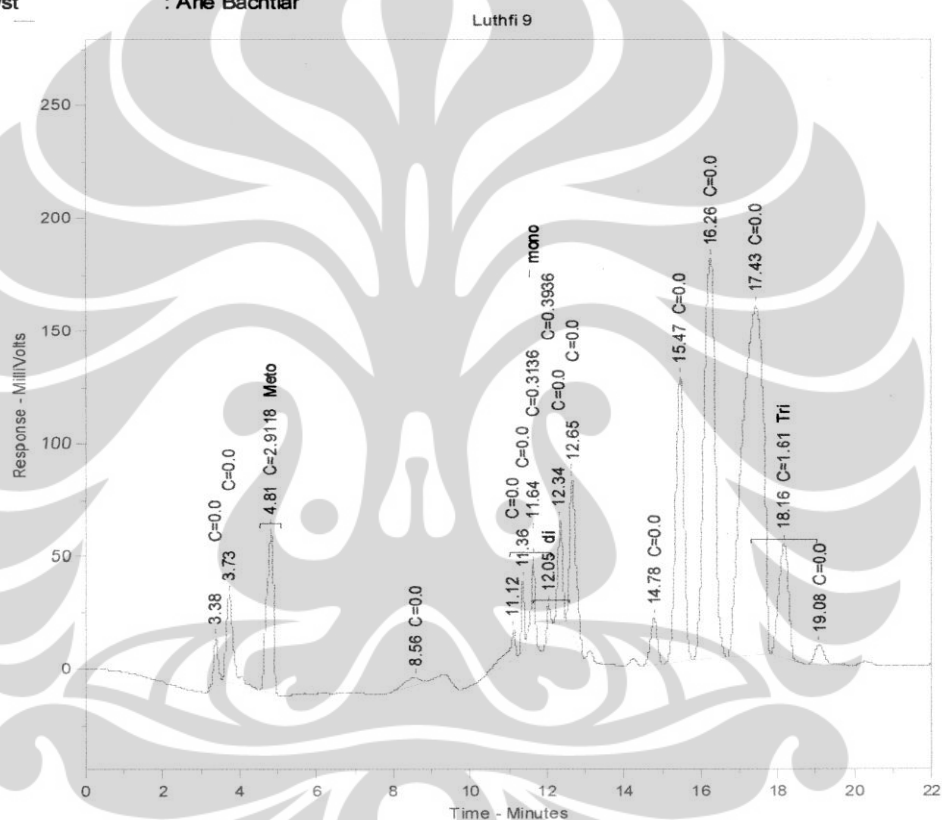
Gambar xlii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 25 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

i. 37⁰C; 30 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / khitano 30
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.376	179419	0.000	
2	3.730	509218	0.000	
3	4.812	878175	2.912	Meto
4	8.561	96969	0.000	
5	11.120	235480	0.000	
6	11.360	157607	0.000	
7	11.638	282633	0.314	mono
8	12.045	96219	0.394	di
9	12.340	395024	0.000	
10	12.653	811669	0.000	
11	14.776	257785	0.000	
12	15.468	1938280	0.000	
13	16.263	3559093	0.000	
14	17.432	5892261	0.000	
15	18.160	910944	1.610	Tri
16	19.083	153414	0.000	

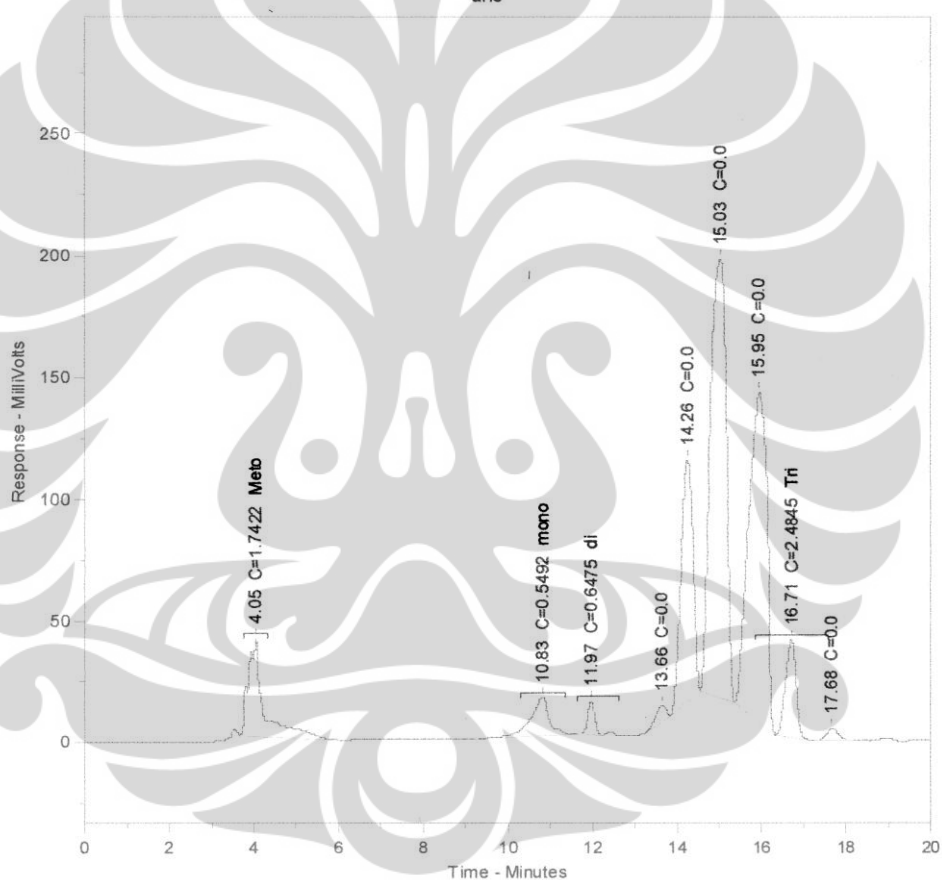
Gambar xliii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 30 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

j. 37⁰C; 40 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / kh4in 40
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



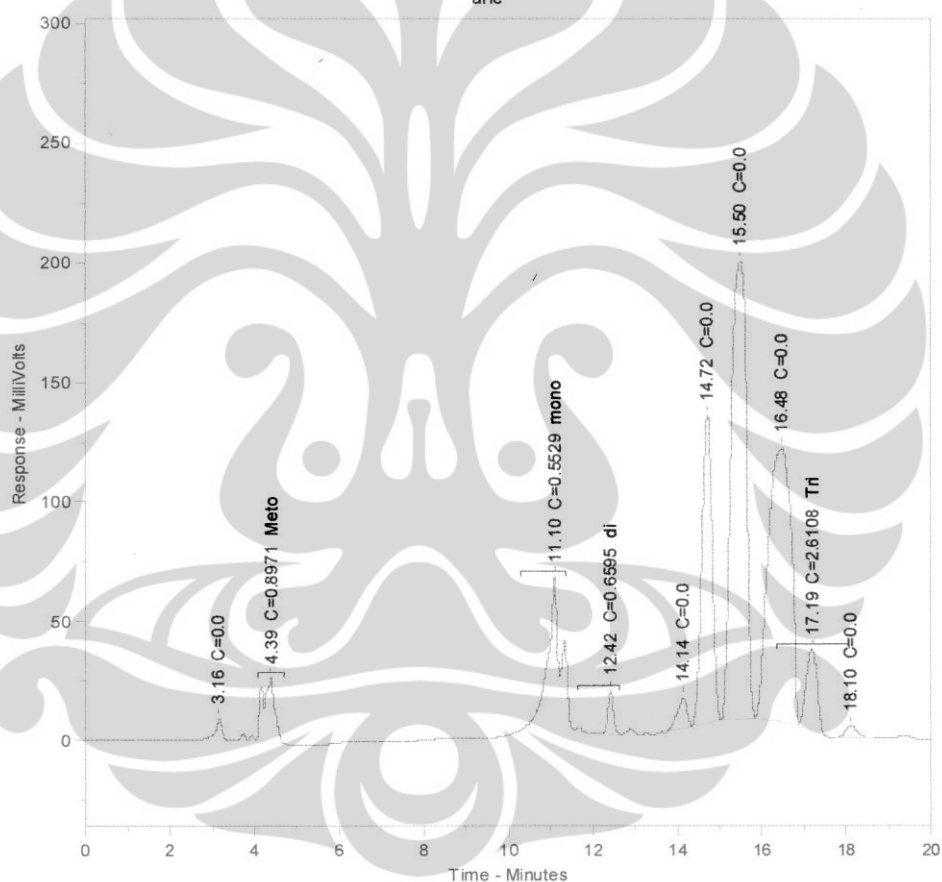
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.052	1050891	1.742	Meto
2	10.832	494935	0.549	mono
3	11.973	158302	0.648	di
4	13.664	115458	0.000	
5	14.257	1975493	0.000	
6	15.029	4728651	0.000	
7	15.953	4063955	0.000	
8	16.708	702894	2.485	Tri
9	17.677	95958	0.000	

Gambar xlv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 40 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

k. 37⁰C; 50 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / kham 50
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.162	63036	0.000	
2	4.390	541143	0.897	Meto
3	11.103	498303	0.553	mono
4	12.422	161229	0.659	di
5	14.143	210679	0.000	
6	14.718	2171414	0.000	
7	15.495	4773396	0.000	
8	16.477	4288989	0.000	
9	17.188	615511	2.611	Tri
10	18.104	97259	0.000	

Gambar xlv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 50 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

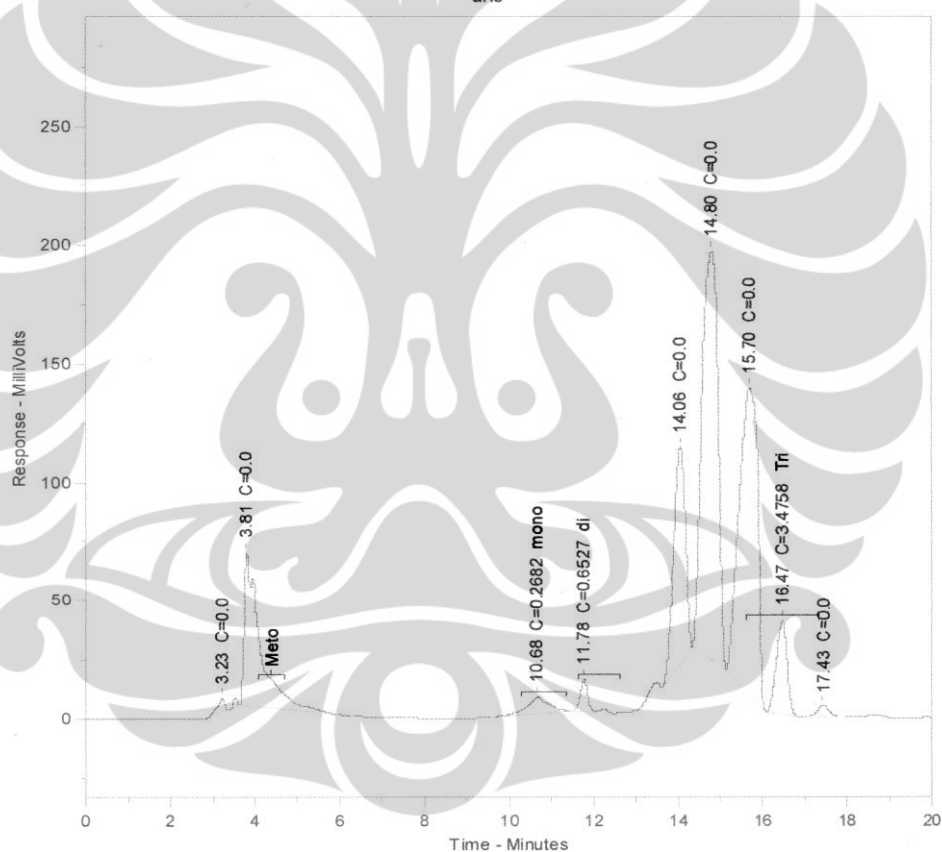
Variasi waktu reaksi sintesis biodiesel sistem kontinu dengan *support* kitosan

a. 37⁰C; 0 Jam; 1:12

Immobilized CRL

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / kitosan 0
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.227	52075	0.000	
2	3.806	1723660	0.000	
3	10.684	241707	0.268	mono
4	11.785	159578	0.653	di
5	14.059	1766085	0.000	
6	14.803	4507646	0.000	
7	15.705	3932906	0.000	
8	16.467	702390	3.476	Tri
9	17.429	94146	0.000	

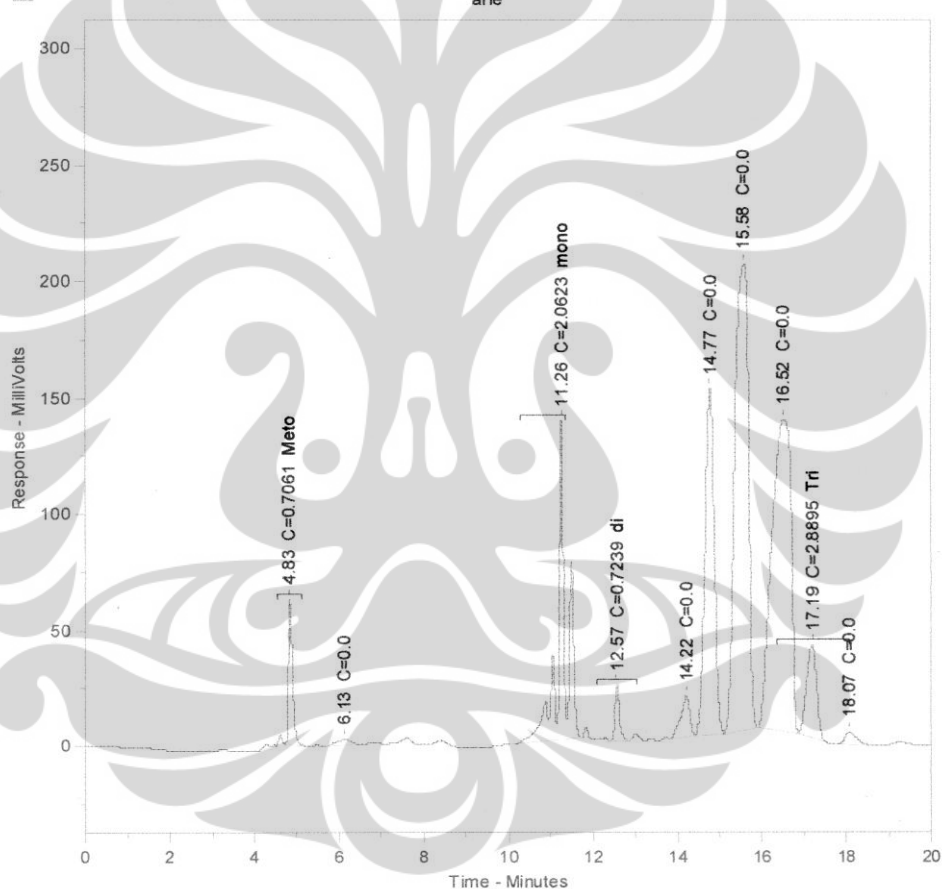
Gambar xii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 0 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

b. 37⁰C; 3 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / K40003
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.835	425906	0.706	Meto
2	6.132	58241	0.000	
3	11.260	1858586	2.062	mono
4	12.568	176984	0.724	di
5	14.216	257719	0.000	
6	14.772	2257836	0.000	
7	15.579	4495085	0.000	
8	16.524	4285756	0.000	
9	17.187	681215	2.889	Tri
10	18.074	97644	0.000	

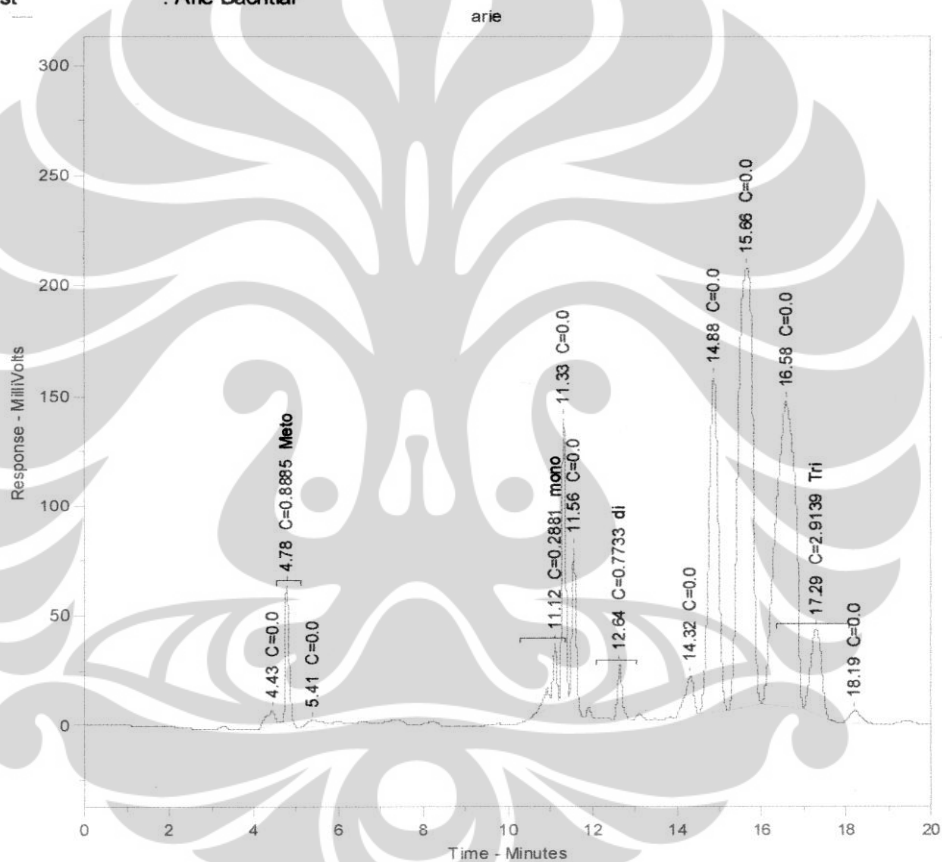
Gambar xlvii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 3 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

c. 37⁰C; 6 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / Kloro / 6
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



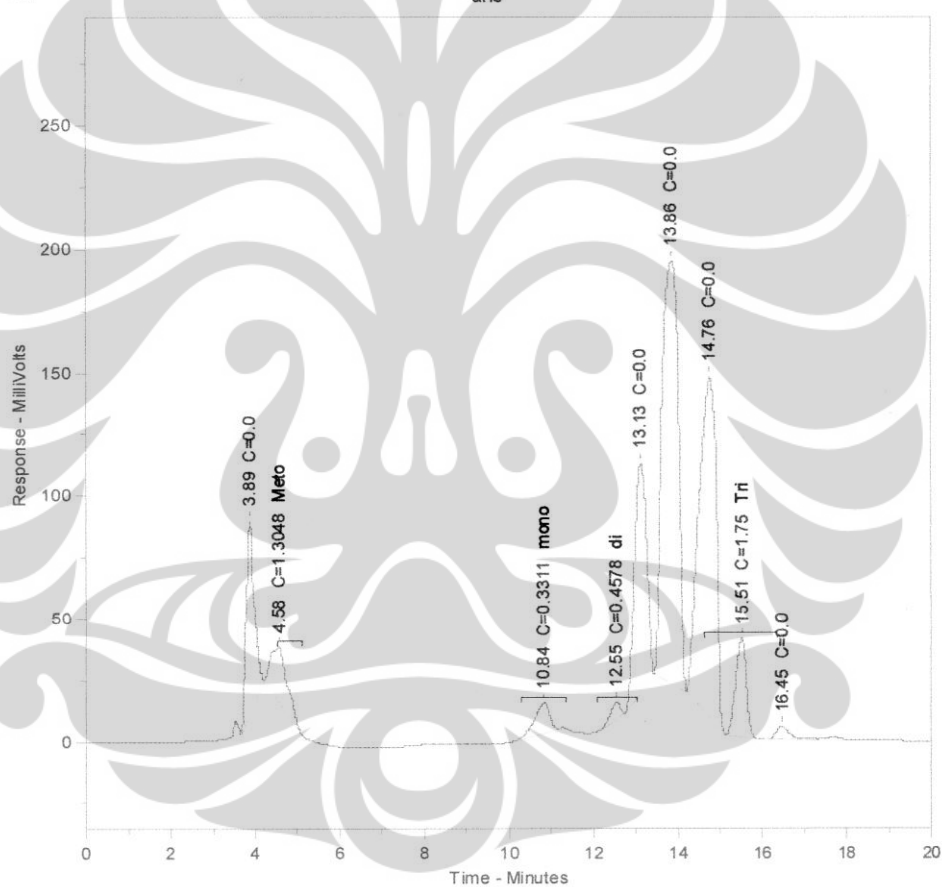
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.435	92240	0.000	
2	4.775	401935	0.888	Meto
3	5.407	86722	0.000	
4	11.120	259615	0.288	mono
5	11.328	767311	0.000	
6	11.563	463926	0.000	
7	12.644	189063	0.773	di
8	14.318	273214	0.000	
9	14.875	2349686	0.000	
10	15.660	4667726	0.000	
11	16.580	4480789	0.000	
12	17.292	686983	2.914	Tri
13	18.189	101615	0.000	

Gambar xlviii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 6 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

d. 37⁰C; 9 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / Klorin 9
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



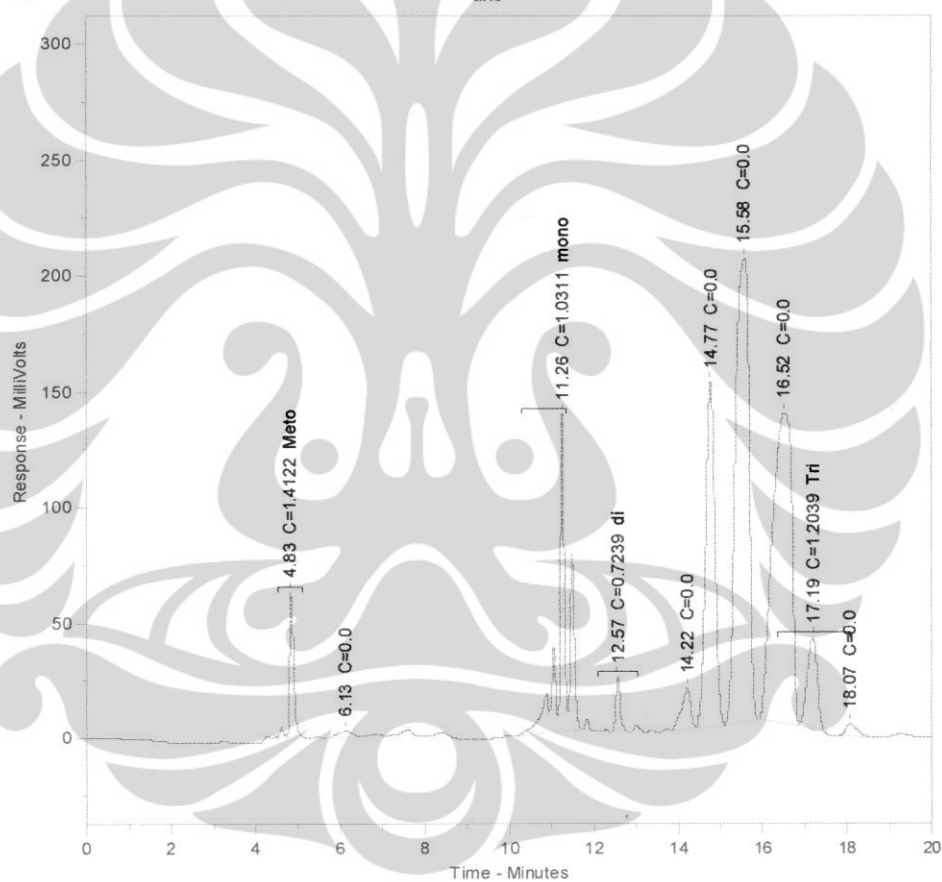
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.886	1039097	0.000	
2	4.575	590286	1.305	Meto
3	10.835	298428	0.331	mono
4	12.548	111916	0.458	di
5	13.129	1881298	0.000	
6	13.863	4594110	0.000	
7	14.761	3899069	0.000	
8	15.513	707294	1.750	Tri
9	16.455	104894	0.000	

Gambar xlix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 9 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

e. 37⁰C; 12 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / K₂O₁a_n 12
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.835	425906	1.412	Meto
2	6.132	58241	0.000	
3	11.260	1858586	1.031	mono
4	12.568	176984	0.724	di
5	14.216	257719	0.000	
6	14.772	2257836	0.000	
7	15.579	4495085	0.000	
8	16.524	4285756	0.000	
9	17.187	681215	1.204	Tri
10	18.074	97644	0.000	

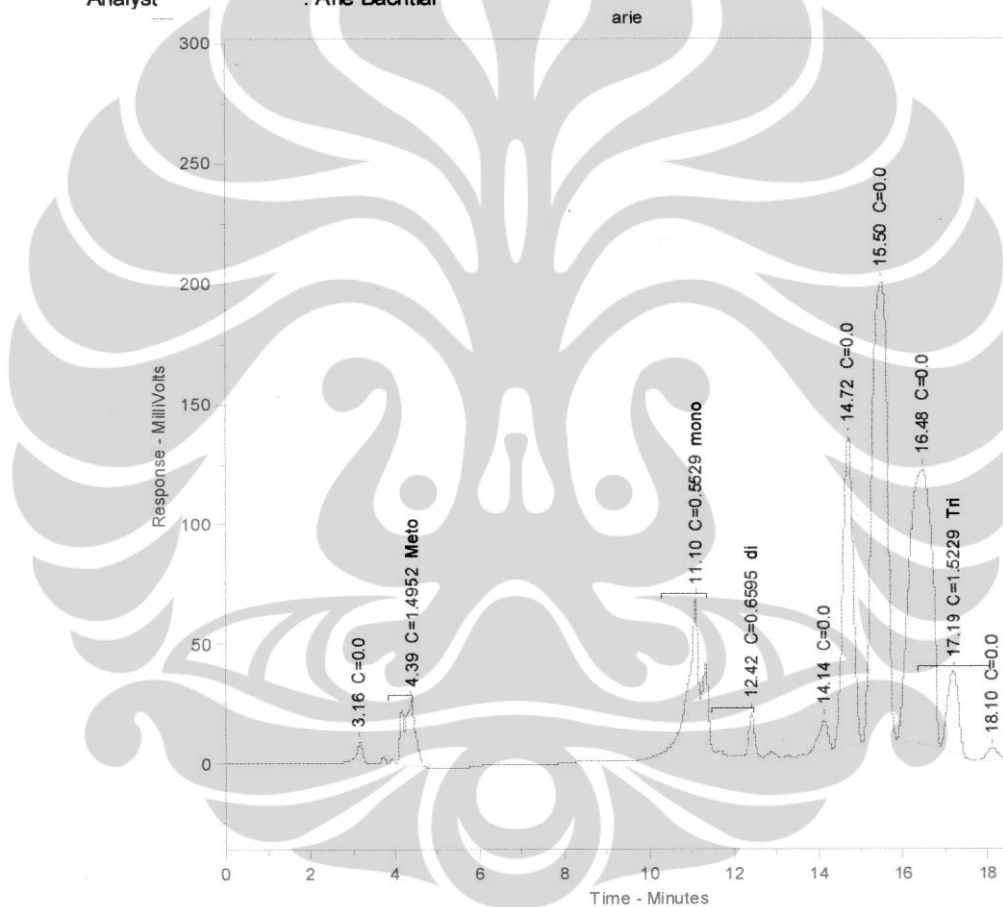
Gambar 1. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 12 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

f.37⁰C; 15 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / K1401015
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.162	63036	0.000	
2	4.390	541143	1.495	Meto
3	11.103	498303	0.553	mono
4	12.422	161229	0.659	di
5	14.143	210679	0.000	
6	14.718	2171414	0.000	
7	15.495	4773396	0.000	
8	16.477	4288989	0.000	
9	17.188	615511	1.523	Tri
10	18.104	97259	0.000	

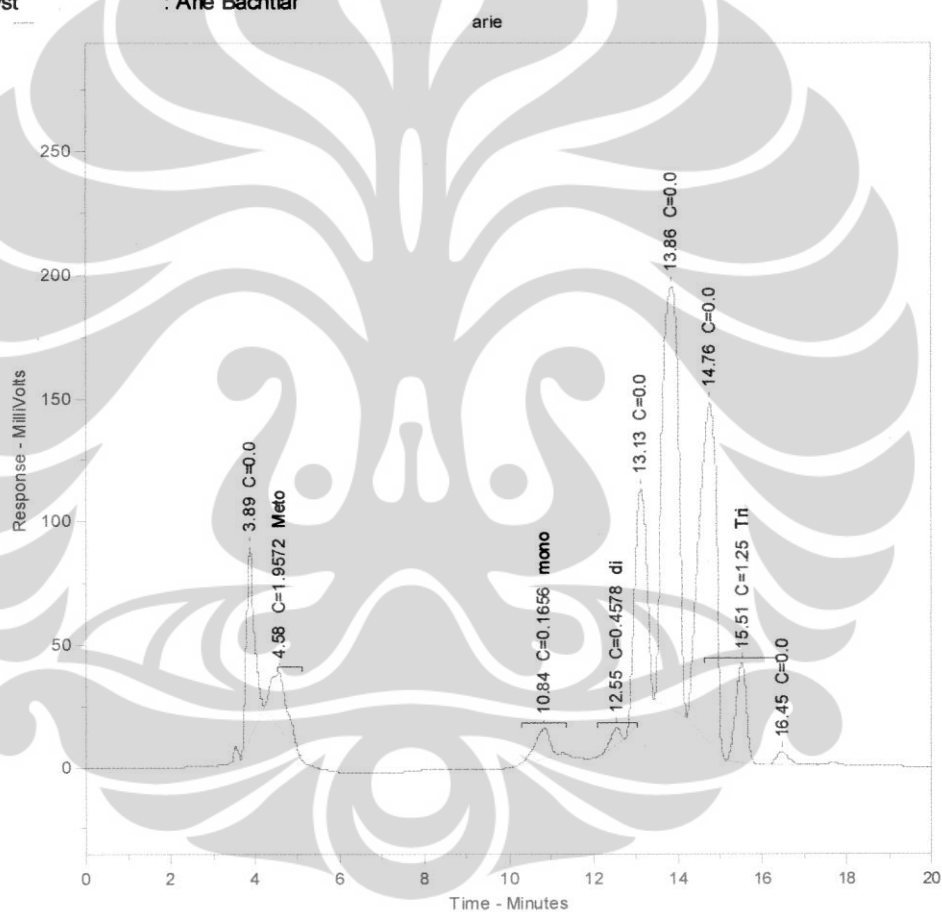
Gambar li. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 15 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

g. 37⁰C; 20 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / Kajian 20
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



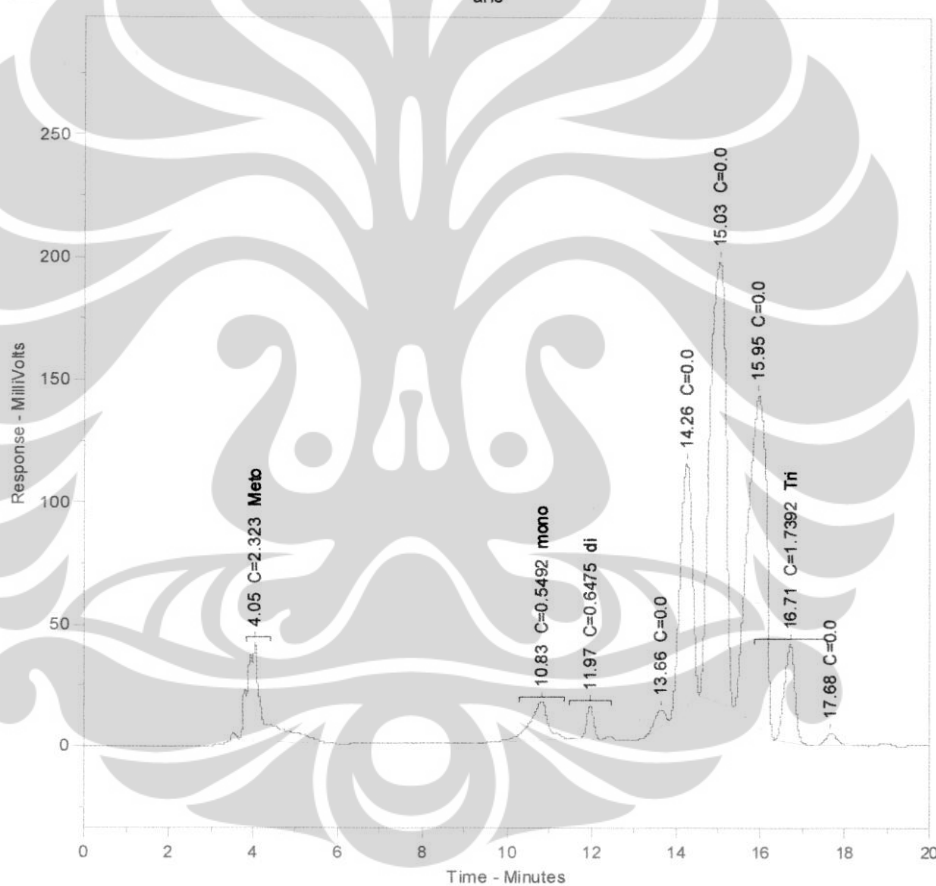
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.886	1039097	0.000	
2	4.575	590286	1.957	Meto
3	10.835	298428	0.166	mono
4	12.548	111916	0.458	di
5	13.129	1881298	0.000	
6	13.863	4594110	0.000	
7	14.761	3899069	0.000	
8	15.513	707294	1.250	Tri
9	16.455	104894	0.000	

Gambar lii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 20 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

h. 37⁰C; 25 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / K1201ar 25
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licsosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



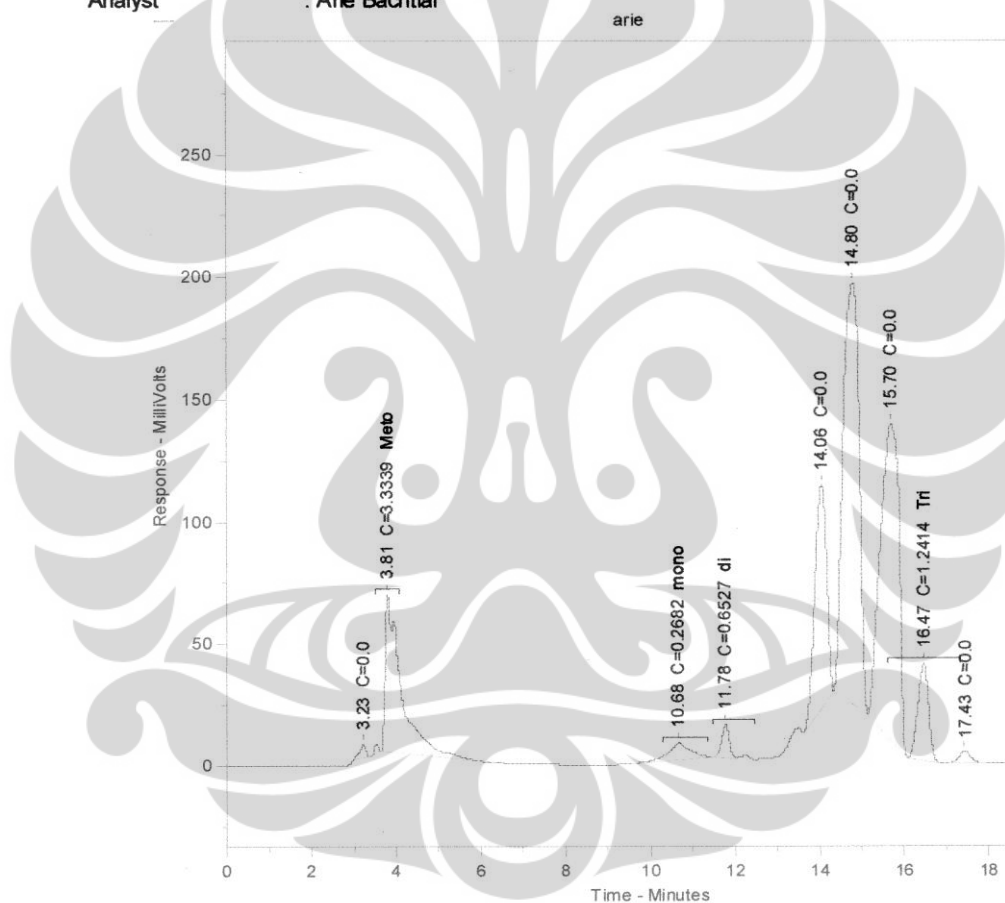
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.052	1050891	2.323	Meto
2	10.832	494935	0.549	mono
3	11.973	158302	0.648	di
4	13.664	115458	0.000	
5	14.257	1975493	0.000	
6	15.029	4728651	0.000	
7	15.953	4063955	0.000	
8	16.708	702894	1.739	Tri
9	17.677	95958	0.000	

Gambar liii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 25 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

i. 37⁰C; 30 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela /K405an 30
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.227	52075	0.000	
2	3.806	1723660	3.334	Meto
3	10.684	241707	0.268	mono
4	11.785	159578	0.653	di
5	14.059	1766085	0.000	
6	14.803	4507646	0.000	
7	15.705	3932906	0.000	
8	16.467	702390	1.241	Tri
9	17.429	94146	0.000	

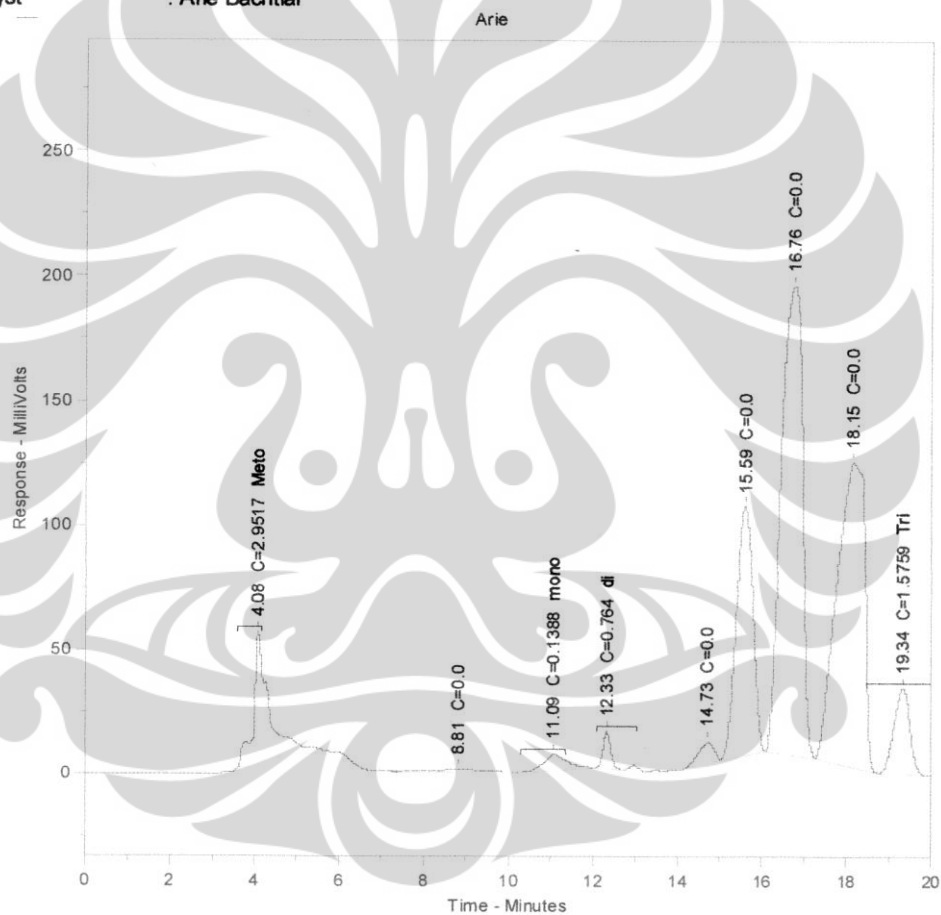
Gambar liv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 30 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

j. 37⁰C; 40 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / K120102 40
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



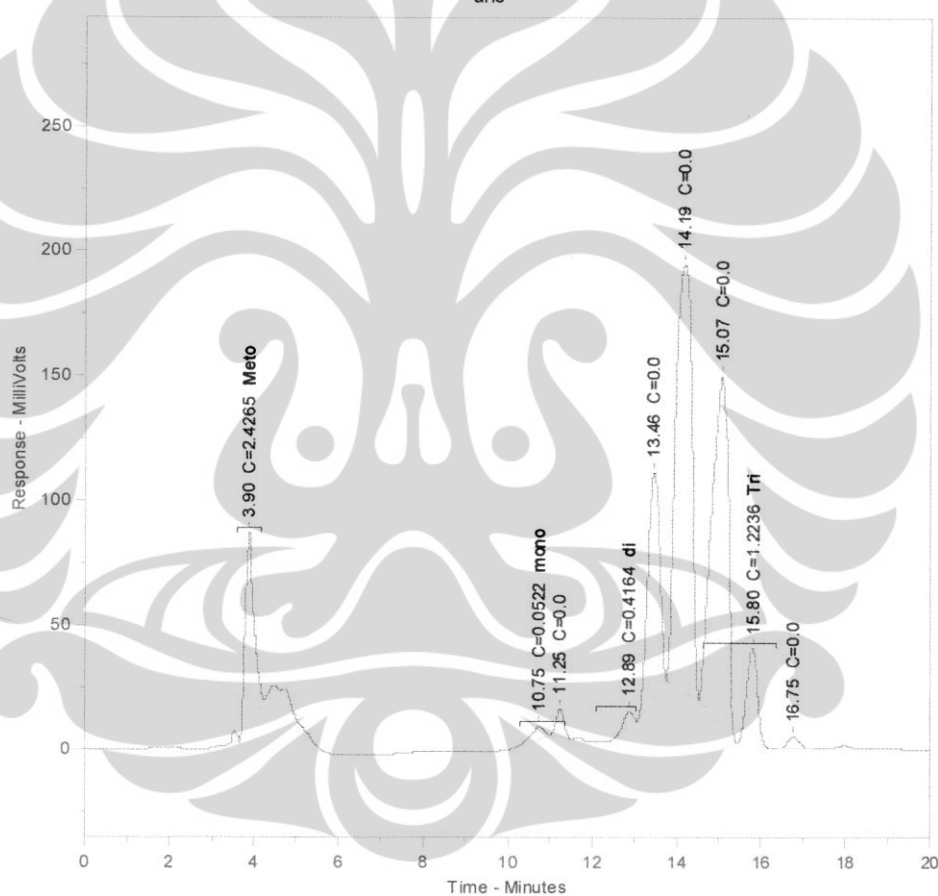
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.082	1335320	2.952	Meto
2	8.808	82044	0.000	
3	11.085	250169	0.139	mono
4	12.332	186772	0.764	di
5	14.734	211637	0.000	
6	15.594	2748091	0.000	
7	16.762	6624415	0.000	
8	18.153	5561471	0.000	
9	19.335	891660	1.576	Tri

Gambar Iv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 40 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

k. 37⁰C; 50 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : Sela / kitolan 50
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 19 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.897	1097718	2.427	Meto
2	10.753	94168	0.052	mono
3	11.247	143446	0.000	
4	12.887	101800	0.416	di
5	13.459	1815732	0.000	
6	14.193	4496185	0.000	
7	15.067	3791117	0.000	
8	15.799	692365	1.224	Tri
9	16.747	92347	0.000	

Gambar Ivi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 50 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

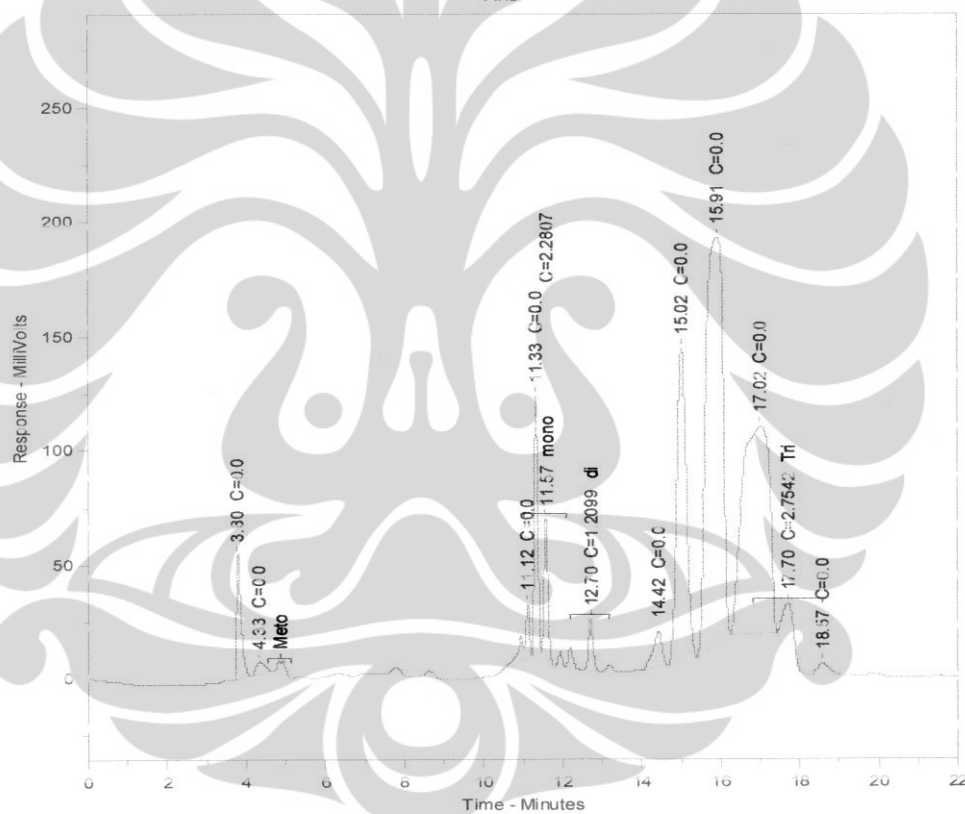
Variasi waktu reaksi sintesis biodiesel sistem kontinu dengan *support* zeolit

a. 37⁰C; 0 Jam; 1:12

Immobilized CRL

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI / TIME 0
 Method File : Biodiesel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



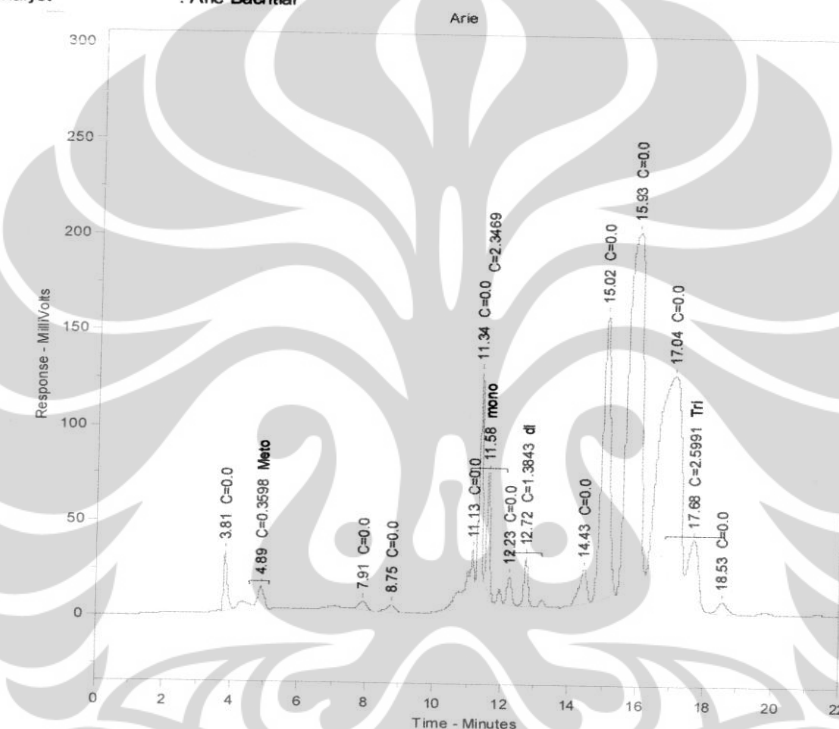
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.795	413385	0.000	
2	4.327	78793	0.000	
3	11.118	256828	0.000	
4	11.328	677742	0.000	
5	11.572	411078	2.281	mono
6	12.701	177473	1.210	di
7	14.423	249902	0.000	
8	15.018	2318279	0.000	
9	15.908	5214002	0.000	
10	17.015	4332861	0.000	
11	17.697	389592	2.754	Tri
12	18.570	103180	0.000	

Gambar Ivii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 0 Jam; 1:12; *Immobilized* CRL

b. 37⁰C; 3 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI *Jan 3*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



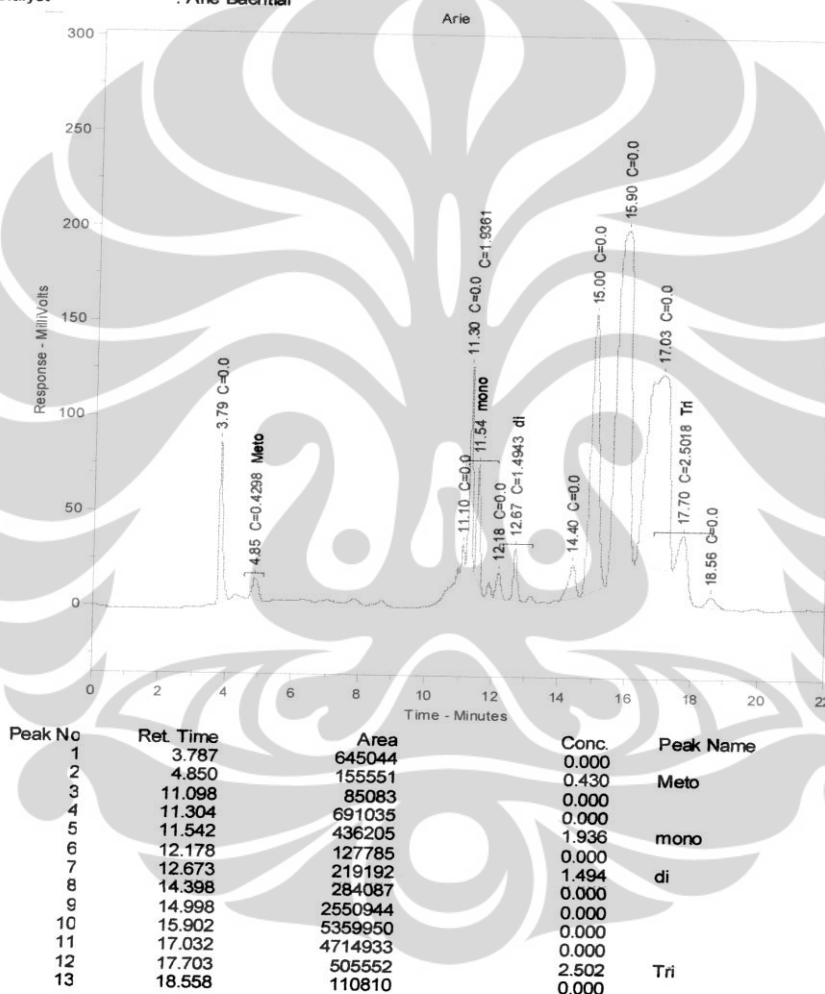
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.810	224497	0.000	
2	4.889	130199	0.360	Meto
3	7.909	72034	0.000	
4	8.754	66245	0.000	
5	11.135	181447	0.000	
6	11.341	715573	0.000	
7	11.582	423015	2.347	mono
8	12.232	137809	0.000	
9	12.716	203060	1.384	di
10	14.428	285962	0.000	
11	15.021	2534739	0.000	
12	15.926	5364384	0.000	
13	17.043	4714969	0.000	
14	17.678	490209	2.599	Tri
15	18.527	114434	0.000	

Gambar Iviii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 3 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

c. 37⁰C; 6 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI 17am 6
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Printed on 6/14/2012 9:40:24 AM

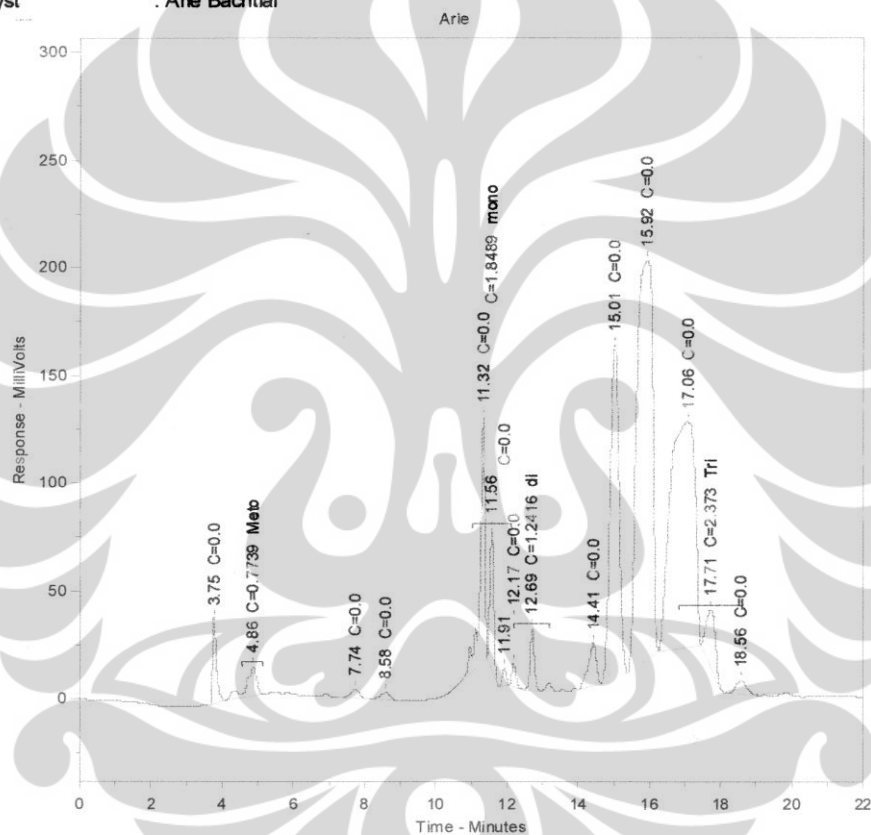
Page 1 of 1

Gambar lix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 6 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

d. 37⁰C; 9 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI *Jan 9*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.755	304618	0.000	
2	4.859	280095	0.774	Meto
3	7.736	75865	0.000	
4	8.583	63755	0.000	
5	11.318	1045858	0.000	
6	11.558	476068	1.849	mono
7	11.908	60997	0.000	
8	12.171	89972	0.000	
9	12.693	227661	1.242	di
10	14.414	315288	0.000	
11	15.010	2710381	0.000	
12	15.924	5646312	0.000	
13	17.060	5028826	0.000	
14	17.713	479528	2.373	Tri
15	18.556	128126	0.000	

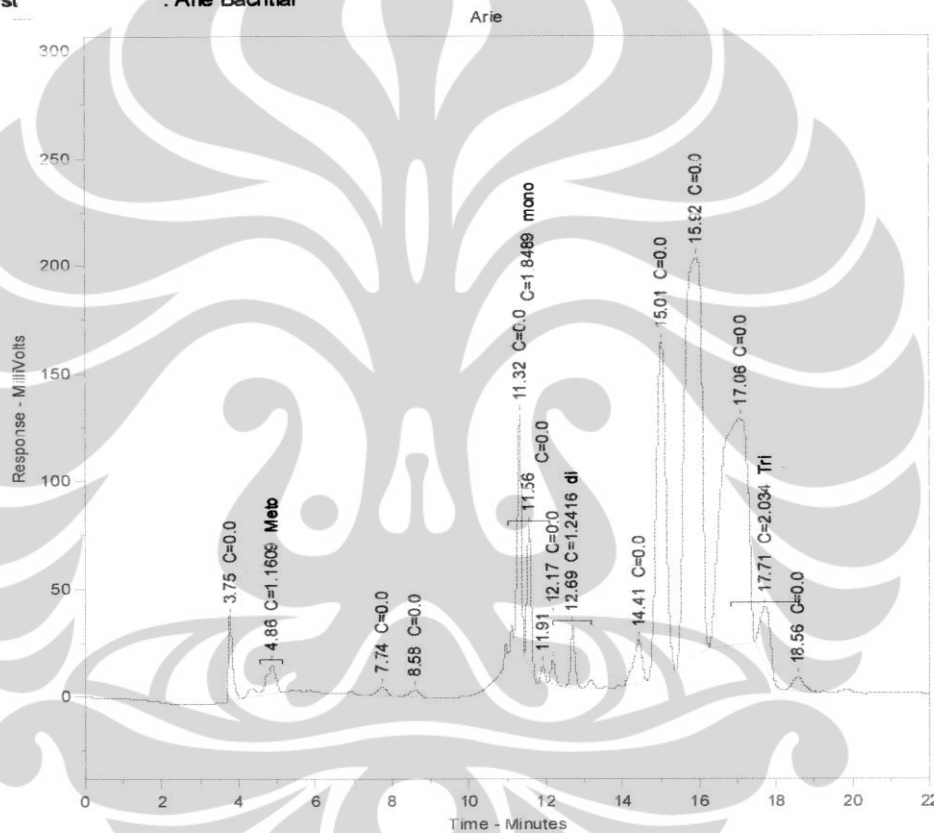
Gambar Ix. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 9 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

e. 37⁰C; 12 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI 12 jam 12
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



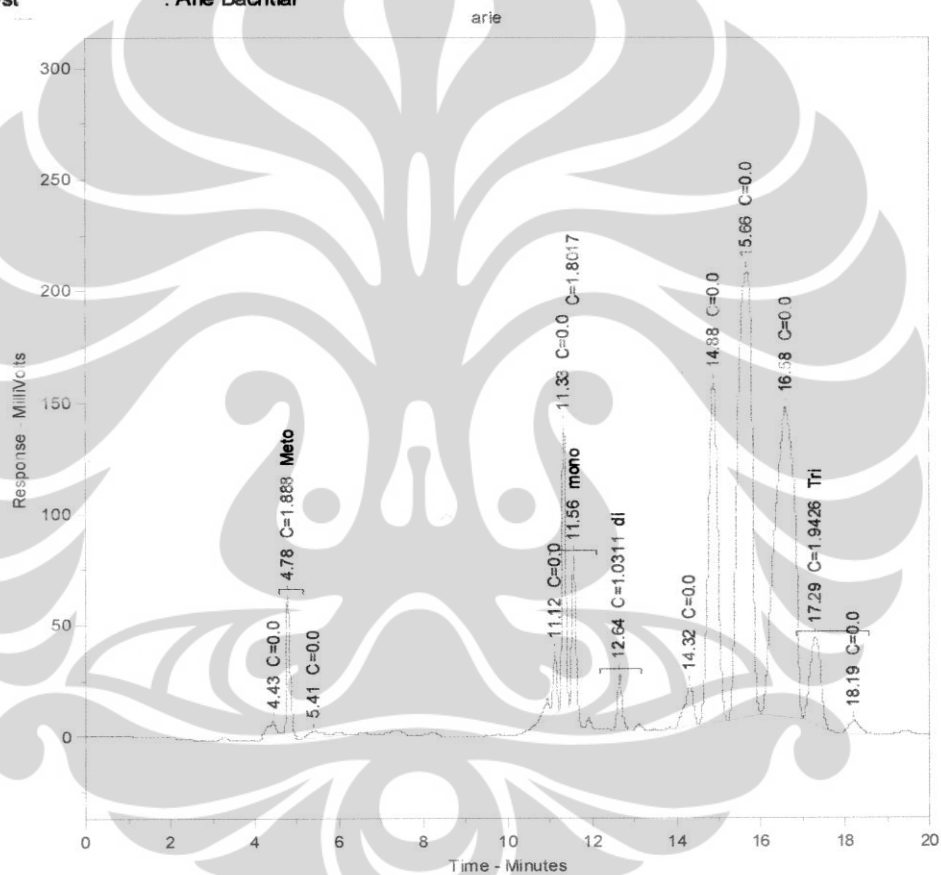
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.755	304618	0.000	
2	4.859	280095	1.161	Meto
3	7.736	75865	0.000	
4	8.583	63755	0.000	
5	11.318	1045858	0.000	
6	11.558	476068	1.849	mono
7	11.908	60997	0.000	
8	12.171	89972	0.000	
9	12.693	227661	1.242	di
10	14.414	315288	0.000	
11	15.010	2710381	0.000	
12	15.924	5646312	0.000	
13	17.060	5028826	0.000	
14	17.713	479528	2.034	Tri
15	18.556	128126	0.000	

Gambar lxi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 12 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

f.37⁰C; 15 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI 1jam 15
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



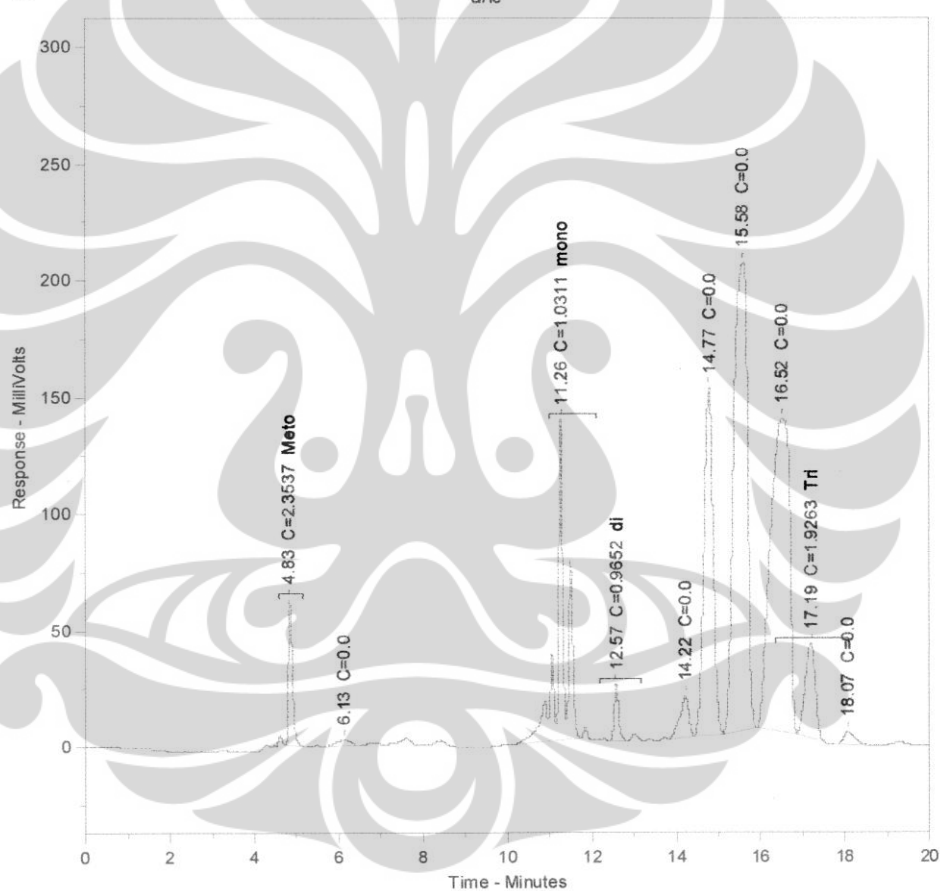
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.435	92240	0.000	
2	4.775	401935	1.888	Meto
3	5.407	86722	0.000	
4	11.120	259615	0.000	
5	11.328	767311	0.000	
6	11.563	463926	1.802	mono
7	12.644	189063	1.031	di
8	14.318	273214	0.000	
9	14.875	2349686	0.000	
10	15.660	4667726	0.000	
11	16.580	4480789	0.000	
12	17.292	686983	1.943	Tri
13	18.189	101615	0.000	

Gambar Ixii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 15 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

g. 37⁰C; 20 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI *Jan 20*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



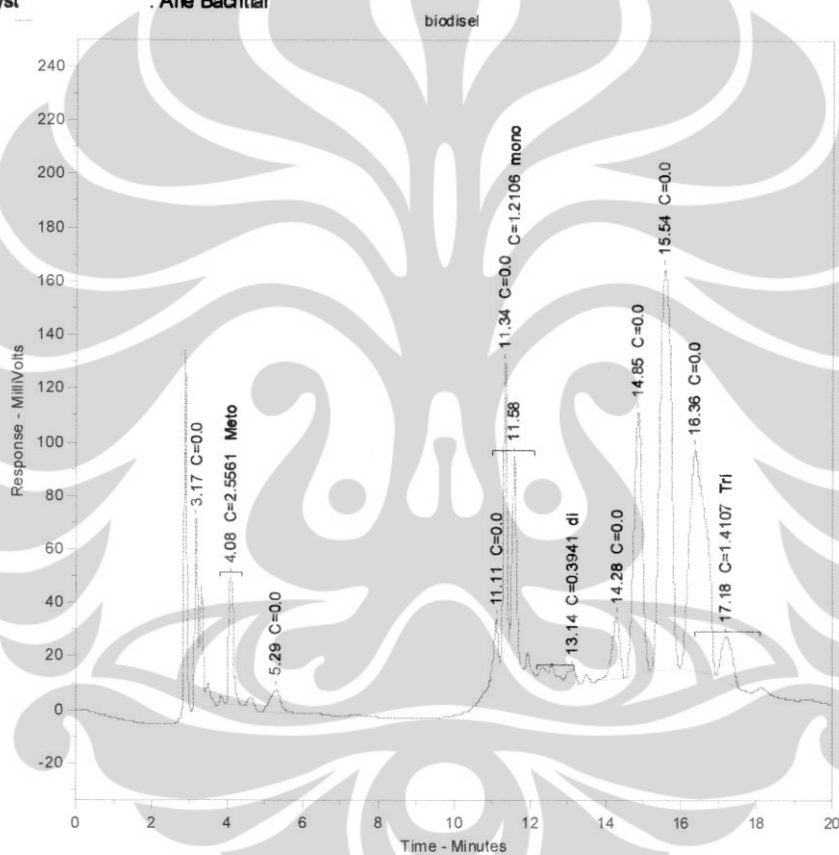
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.835	425906	2.354	Meto
2	6.132	58241	0.000	
3	11.260	1858586	1.031	mono
4	12.568	176984	0.965	di
5	14.216	257719	0.000	
6	14.772	2257836	0.000	
7	15.579	4495085	0.000	
8	16.524	4285756	0.000	
9	17.187	681215	1.926	Tri
10	18.074	97644	0.000	

Gambar Ixiii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 20 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

h. 37⁰C; 25 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI *Jan 25*
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.169	758914	0.000	
2	4.076	420483	2.556	Meto
3	5.287	170656	0.000	
4	11.107	142185	0.000	
5	11.337	654631	0.000	
6	11.578	545522	1.211	mono
7	13.135	72270	0.394	di
8	14.285	330585	0.000	
9	14.849	1524968	0.000	
10	15.544	3132829	0.000	
11	16.360	2562793	0.000	
12	17.177	332578	1.411	Tri

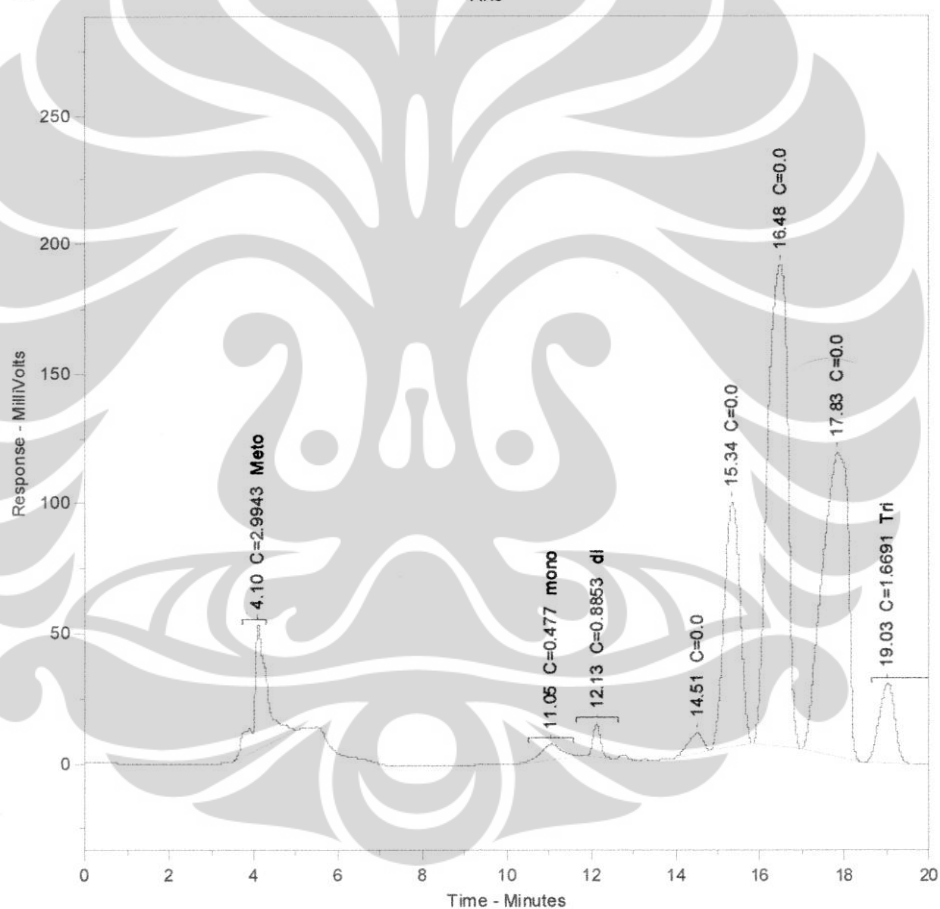
Gambar Ixiv. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 25 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

(Lanjutan)

i. 37⁰C; 30 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI 1 jam 30
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



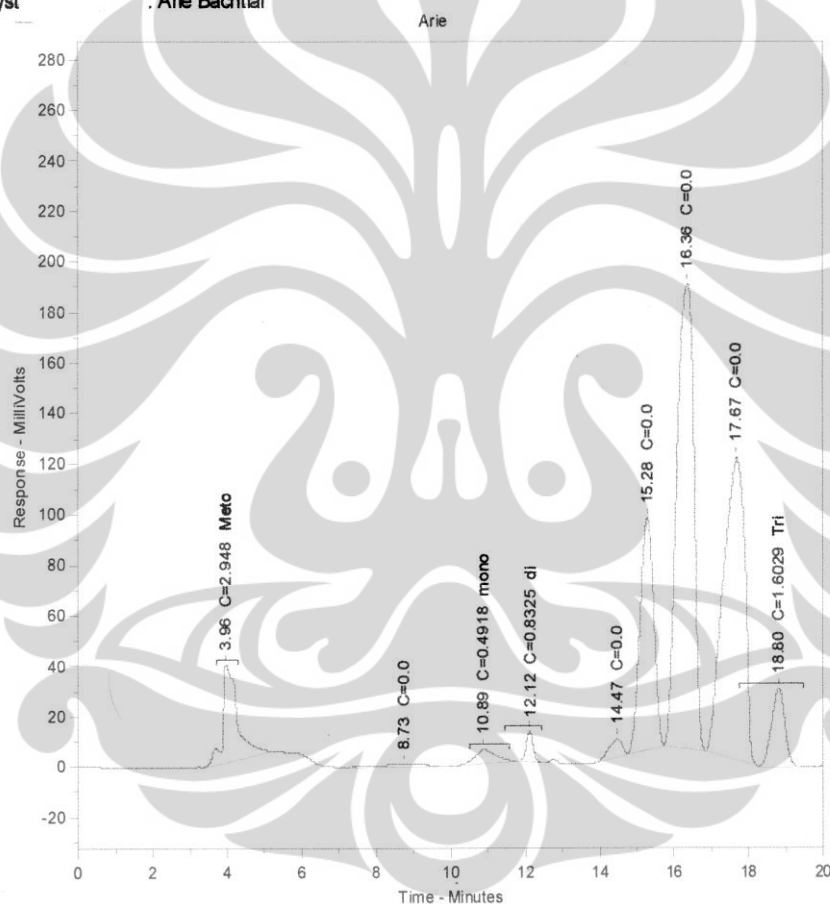
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.103	1083653	2.994	Meto
2	11.049	214941	0.477	mono
3	12.130	162335	0.885	di
4	14.509	192580	0.000	
5	15.345	2459265	0.000	
6	16.475	6102663	0.000	
7	17.831	5001151	0.000	
8	19.029	787026	1.669	Tri

Gambar lxx. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 30 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

j. 37⁰C; 40 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI / Jam 40
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



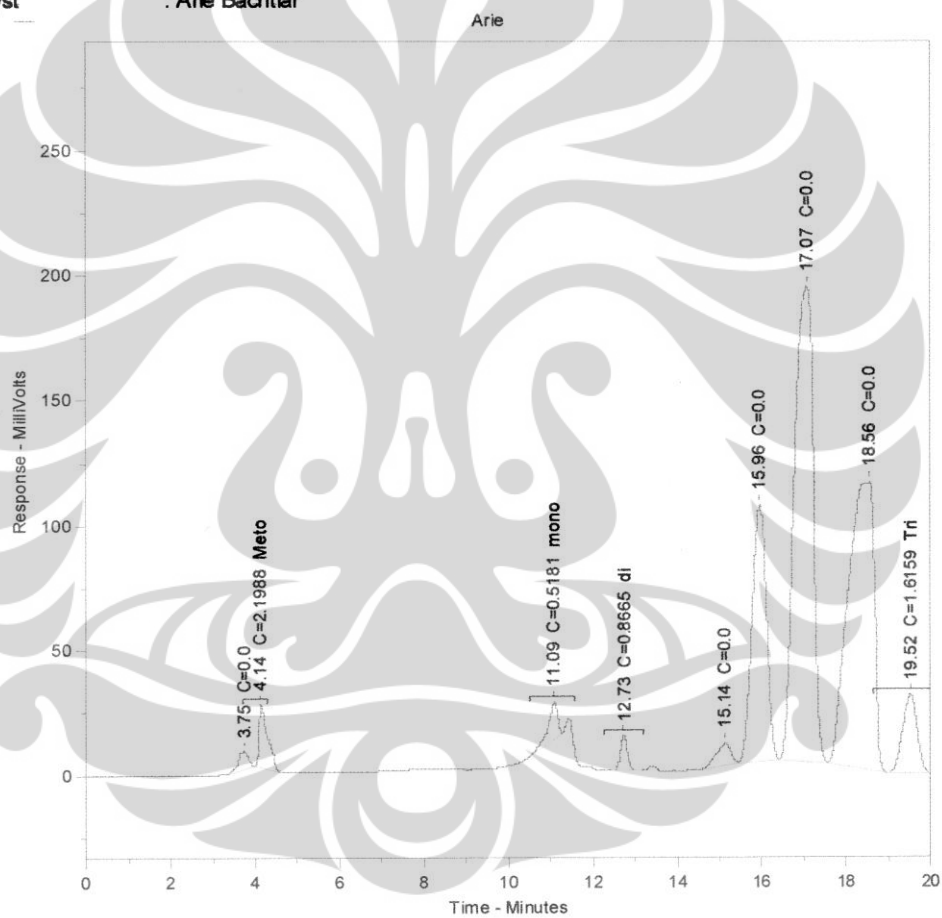
Peak No	Ret Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.964	1066915	2.948	Meto
2	8.733	65711	0.000	
3	10.886	221610	0.492	mono
4	12.116	152646	0.832	di
5	14.469	169541	0.000	
6	15.277	2337829	0.000	
7	16.360	5891408	0.000	
8	17.673	4833509	0.000	
9	18.804	755781	1.603	Tri

Gambar Ixvi. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 40 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

k. 37⁰C; 50 Jam; 1:12*Immobilized CRL*

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : UI 17 Jan 50
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : arie UI 3.0001.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 12 Juni 2012
 Analyst : Arie Bachtiar



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.748	127795	0.000	
2	4.143	361715	2.199	Meto
3	11.093	233478	0.518	mono
4	12.731	158878	0.866	di
5	15.140	212167	0.000	
6	15.957	2456912	0.000	
7	17.069	5861243	0.000	
8	18.560	4935074	0.000	
9	19.522	761925	1.616	Tri

Gambar Ixvii. Kromatogram HPLC untuk Kondisi Reaksi 37⁰C; 50 Jam; 1:12; *Immobilized CRL*

Lampiran 2: Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar

Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar

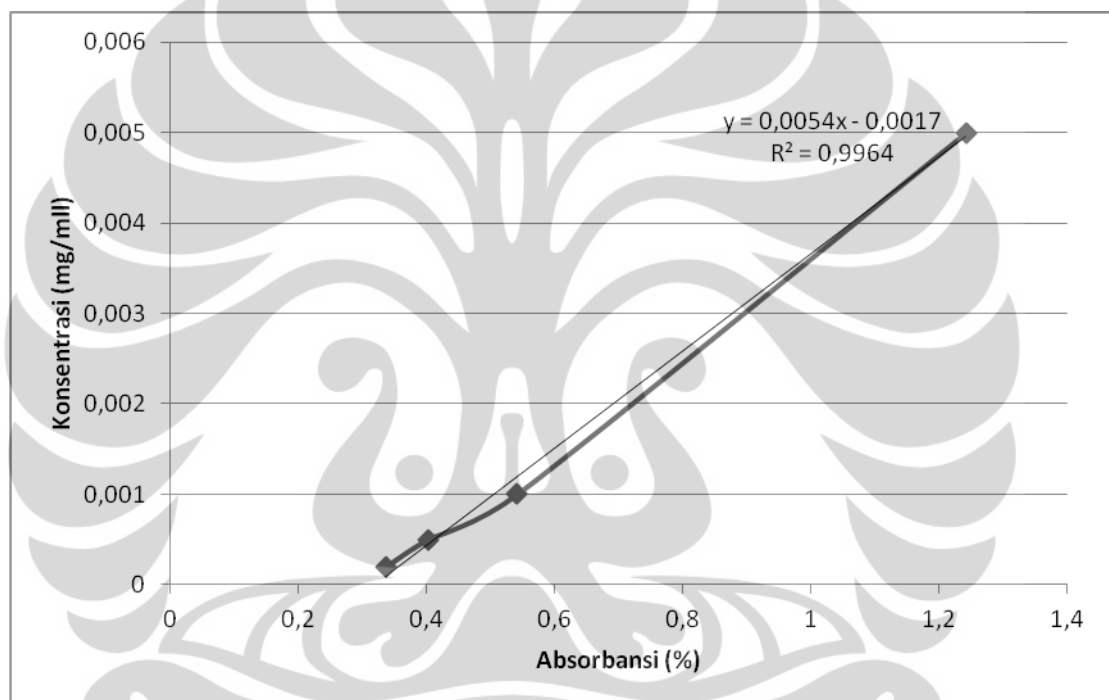
Pembuatan kurva kalibrasi standar dalam penelitian ini bertujuan untuk mengukur konsentrasi enzim sebelum dan sesudah imobilisasi, dimana kurva kalibrasi ini menghubungkan konsentrasi protein dan absorbansi spektrofotometri. Konsentrasi lipase dalam filtrat sesudah imobilisasi dapat diketahui dari nilai absorbansinya. Kurva kalibrasi standar ini dibuat dengan metode Lowry menggunakan spektrofotometer *visible*. Metode Lowry didasarkan pada reaksi antara protein dengan Folin-Ciocalteu yang menyebabkan perubahan fisis pada larutan, protein dalam larutan digumpalkan oleh reagen Lowry dan diinkubasi dengan reagen Folin-Ciocalteu sehingga warna larutan yang semula bening akan berubah menjadi biru. Kepekatan warna biru yang dihasilkan tergantung dari protein yang terkandung di dalamnya. Semakin banyak kadar protein/konsentrasi protein di dalam larutan, warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat. Dari perubahan warna biru inilah dapat diukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 750 nm.

Sampel protein yang digunakan dalam pembuatan kurva kalibrasi ini adalah *Candida rugosa* lipase. Sampel enzim dilarutkan ke dalam larutan phosphate buffer dan kemudian ditambahkan Lowry *reagent* setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Lalu campuran ditambahkan Folin-Ciocalteu *reagent* dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 30 menit sebelum diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis agar reaksi berjalan hingga maksimal. Konsentrasi protein enzim yang digunakan adalah 0,0002 g/mL; 0,0005 g/mL; 0,001 g/mL; dan 0,005 g/mL.

Pada Tabel i dapat dilihat konsentrasi enzim (mg/ml) dan absorbansi yang dihasilkan. Sementara itu, Gambar lxviii menunjukkan kurva kalibrasi standar konsentrasi *Candida rugosa* lipase. Dari kurva kalibrasi standar didapatkan persamaan garis $y = 0,0054x - 0,0017$ dimana x adalah nilai absorbansi dan y adalah nilai konsentrasi (g/mL). Persamaan garis yang didapatkan nantinya digunakan untuk mengukur konsentrasi enzim sebelum dan sesudah imobilisasi berdasarkan nilai absorbansinya.

Tabel i. Hasil Absorbansi dari berbagai konsentrasi enzim

Konsentrasi awal (gr/ml)	Konsentrasi akhir (gr/ml)	V.akhir (ml)	V.awal (ml)	Phosphate buffer yang ditambahkan (ml)	Absorbansi
0,01	0,0002	10	0,2	9,8	0,269
0,01	0,0005	10	0,5	9,5	0,362
0,01	0,001	10	1	9	0,464
0,01	0,005	10	5	5	0,602

Gambar Ixviii. Kurva Kalibrasi Standar Konsentrasi *Candida rugosa lipase*