



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**STUDI SINTESIS ESTER DARI ASAM LEMAK HASIL  
HIDROLISIS MINYAK KELAPA SAWIT DENGAN GLUKOSA  
MENGUNAKAN KATALIS LIPASE *Candida rugosa*  
TERIMMOBILISASI PADA ALGINAT**

**SKRIPSI**

**SEPTIANI RAHMAWATI FADILLAH**

**0806400011**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI S1 KIMIA**

**DEPOK**

**JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**STUDI SINTESIS ESTER DARI ASAM LEMAK HASIL  
HIDROLISIS MINYAK KELAPA SAWIT DENGAN GLUKOSA  
MENGUNAKAN KATALIS LIPASE *Candida rugosa*  
TERIMMOBILISASI PADA ALGINAT**

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

**SEPTIANI RAHMAWATI FADILLAH**

**0806400011**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI S1 KIMIA**

**DEPOK**

**JULI 2012**

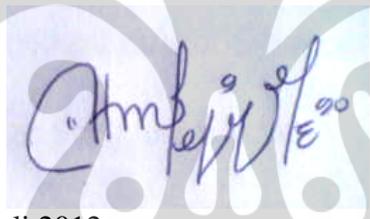
## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Septiani Rahmawati Fadillah

NPM : 0806400011

Tanda Tangan :

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Septiani Rahmawati Fadillah', is placed over a light blue rectangular stamp. The signature is written in a cursive style.

Tanggal : 6 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Septiani Rahmawati Fadillah  
NPM : 0806400011  
Program Studi : Kimia S1  
Judul Skripsi : Studi Sintesis Ester dari Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit dengan Glukosa Menggunakan Katalis Lipase *Candida rugosa* Terimobilisasi pada Alginat

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Sriwati Setiasih, Apt, Mu

Pembimbing II : Dra. Sri Handryani, M.Biomed

Penguji I : Prof. Dr. Sumi Hudryono PWS

Penguji II : Dr. Endang Saepudin

Penguji III : Dr. Emil Budianto

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 6 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur senantiasa terucap dan tertuju hanya kepada Allah SWT atas segala curahan rahmat dan kasih sayang-Nya sehinggalah penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “ Studi Sintesis Ester dari Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit dengan Glukosa Menggunakan Katalis Lipase *Candida rugosa* Terimobilisasi pada Alginat “. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan menyelesaikan pendidikan tingkat sarjana di jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya senantiasa ingin penulis sampaikan kepada Ayahanda, Ibunda, dan Kakak-kakakku tercinta atas segala dorongan semangat dan doa yang tidak pernah putus, yang selalu menjadi inspirasi dan sumber kekuatan bagi penulis.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis menyampaikan rasa hormat dan trimakasih kepada :

1. Ibu Dra.Siswati Setiasih, Apt, Msi dan Ibu Dra. Sri Handayani, M.Biomed, selaku dosen pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan pengarahan dan bimbingan yang sangat berarti bagi penulis dalam menyusun skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Sumi Hudiyono, PWS selaku ketua KBI Biokimia
3. Bapak Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia, Universitas Indonesia.
4. Ibu Ir.Widyastuti Samadi M.Si. selaku dosen pembimbing akademik penulis
5. Kepada segenap dosen dan staff Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah membekali penulis dengan ilmu pengetahuan selama ini
6. Kak Ika Novianingsih yang telah bersedia meluangkan waktu dan memberikan saran yang berarti kepada penulis.

7. Syarifah Hasna, Ebsya Serashi Fitriana, Dian Nur Insani, Tri Destiyanti, Ahmad Baihaqi, dan Bali Susilo sebagai teman satu perjuangan, rekan sekaligus sahabat yang selalu memberikan inspirasi dan senantiasa berbagi suka dan duka
8. Teman-teman angkatan 2008 yang selama empat tahun terakhir ini telah menjadi bagian hidup penulis
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

Dengan kerendahan hati penulis menyadari penulisan skripsi ini secara ilmiah masih jauh dari kesempurnaan dan masih banyak kekurangan. Maka penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap mudah-mudahan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkan.

Penulis

2012

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

---

---

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

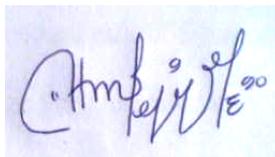
Nama : Septiani Rahmawati Fadillah  
NPM : 0806400011  
Program Studi: Kimia S1  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

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

Studi Sintesis Ester dari Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit dengan Glukosa Menggunakan Katalis Lipase *Candida rugosa* Terimobilisasi pada Alginat.

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

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 6 Juli 2012  
Yang menyatakan



(Septiani Rahmawati Fadillah)

vi

## ABSTRAK

Nama : Septiani Rahmawati Fadillah  
Program Studi : Kimia S1  
Judul : Studi Sintesis Ester dari Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit dengan Glukosa Menggunakan Katalis Lipase *Candida rugosa* Terimobilisasi pada Alginat.

Ester glukosa dapat disintesis secara enzimatik menggunakan lipase *Candida rugosa* melalui reaksi esterifikasi antara glukosa dan asam lemak dalam pelarut heksana. Pada penelitian ini, digunakan lipase terimobilisasi pada matriks alginat. Tujuannya adalah agar pemisahan produk mudah dilakukan, lipase dapat digunakan berulang, dan menurunkan biaya pemakaian lipase. Konsentrasi Na-alginat optimum untuk imobilisasi enzim pada  $\text{CaCl}_2$  0,05M adalah 1% dengan persen efisiensi imobilisasi sebesar 65,62%. Optimasi reaksi esterifikasi dilakukan pada beberapa parameter seperti waktu inkubasi, suhu, *molecular sieve*, dan rasio mol substrat. Kondisi optimum untuk reaksi esterifikasi diperoleh pada waktu inkubasi 40 jam, suhu reaksi  $35^\circ\text{C}$ , rasio mol glukosa : asam lemak (1:60), dan tanpa penabahan *molecular sieve*. Identifikasi produk (dari enzim bebas) menggunakan instrument FT-IR memberikan serapan gugus ester pada bilangan gelombang  $1735,93\text{ cm}^{-1}$ . Pada uji emulsi sederhana, produk yang dihasilkan (dari enzim imobil) terbukti dapat bertindak sebagai *emulsifier*.

Kata kunci : ester glukosa, lipase *Candida rugosa*, glukosa, asam lemak minyak sawit, alginat, *molecular sieve*

xiv + 79 halaman : 44 gambar; 11 lampiran; 11 tabel

Daftar Pustaka : 43 (1951-2011)

## ABSTRACT

Name : Septiani Rahmawati Fadillah  
Study Program : Chemistry  
Title : Study of Ester Synthesis Between Fatty Acid Obtained from Hydrolyzed Palm Oil and Glucose Using Immobilized *Candida rugosa* Lipase in Alginate

Ester glucose was synthesized using *Candida rugosa* lipase by esterification reaction between glucose and fatty acids obtained from hydrolyzed palm oil in solvent in hexane. In this study, lipase was immobilized in alginate matrix. By immobilization, it was expected that the enzyme could be reusable, the product separation would be easier, and caused in lowering cost in enzyme consumption. The optimum Na-alginate concentration for lipase immobilization was 1% at 0,05M CaCl<sub>2</sub>, with percent immobilization yield 65,62%. Optimization of the esterification reaction carried out on several parameters such as incubation time, temperature, molecular sieve, and the mol ratio of substrates. The optimum conditions obtained at temperature 35°C, for 40 hours of incubation, and the substrate mol ratio of glucose and fatty acids is 1:60 Identification of products (from free enzyme) using FT-IR instrument gave the ester group absorption at wavenumber 1735,93 cm<sup>-1</sup>. In a simple (from enzyme imobil) emulsion test, the synthesized product could be act as emulsifier.

Key words : glucose esters, lipases, *Candida rugosa*, glucose palm oil fatty acid alginate

xiv + 79 pages: 44 Pictures; 11 appendixes; 16 tables

References : 43 (1951-2011)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
DARTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Perumuan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis.....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Tanaman Kelapa Sawit.....	4
2.2 Minyak Kelapa Sawit.....	6
2.3 Asam Lemak.....	7
2.3.1 Asam Palmitat.....	8
2.3.2 Asam Oleat.....	9
2.4 Glukosa.....	10
2.5 Esterifikasi.....	11
2.6 Enzim.....	12
2.7 Lipase.....	14
2.8 Sisi Aktif Enzim Lipase.....	17
2.9 Alginat.....	18
2.10 Imobilisasi Enzim.....	21
2.11 Ester Glukosa.....	25
2.12 Emulsifier.....	25
2.13 Molecular Sieve .....	26
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>27</b>
3.1 Alat dan Bahan.....	27
3.2 Prosedur Penelitian.....	27
3.2.1 Hidrolisis Trigliserida dari Minyak Sawit.....	28
3.2.2 Imobilisasi Enzim Lipase dalam Ca-alginat.....	28

3.2.2.1	Persen <i>Loading</i> .....	29
3.2.2.2	Efisiensi Imobilisasi.....	30
3.2.3	Uji Aktivitas Enzim lipase dengan Metode Titrimetrik....	30
3.2.4	Reaksi Esterifikasi dengan Enzim Imobil.....	31
3.2.5	Penentuan Kadar konversi Asam Lemak.....	32
3.2.6	Reaksi Esterifikasi dengan Enzim Bebas.....	32
3.2.7	Identifikasi Produk.....	33
3.2.8	Uji Emulsi Ester Glukosa Hasil Sintesis Secara Kualitatif	33
3.2.9	Bagan Kerja Secara umum.....	34
<b>BAB 4 PEMBAHASAN.....</b>		<b>35</b>
4.1.	Hidrolisis Trigliserida.....	35
4.2	Immobilisasi Enzim.....	40
4.3	Reaksi Esterifikasi Menggunakan Enzim Imob.....	46
4.3.1	Optimasi Suhu Reaksi.....	50
4.3.2	Optimasi Waktu Inkubasi.....	51
4.3.3	Optimasi Rasio Mol Substrat.....	53
4.3.4	Optimasi Molecular Sieve.....	54
4.4	Reaksi Esterifikasi Menggunakan Enzim bebas .....	57
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>		<b>60</b>
5.1	Kesimpulan.....	60
5.2	Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA.....		61
LAMPIRAN.....		66

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pohon kelapa sawit .....	4
Gambar 2.2 Buah kelapa sawit.....	6
Gambar 2.3 Asam oleat.....	9
Gambar 2.4 Struktur D glukosa.....	10
Gambar 2.5 Reaksi Esterifikasi dengan Katalis Asam.....	11
Gambar 2.6 Reaksi Esterifikasi secara Enzimatik.....	12
Gambar 2.7 Kompleks enzim substrat.....	13
Gambar 2.8 Teori <i>Lock and Key</i> .....	14
Gambar 2.9 Induced-fit Model.....	14
Gambar 2.10 Hidrolisis Trigliserida Menjadi Asam Lemak Bebas.....	15
Gambar 2.11 Lipase.....	16
Gambar 2.12 $\beta$ -D-mannuronat dan $\alpha$ -L-guluronat.....	18
Gambar 2.13 Struktur Alginat.....	19
Gambar 2.14 <i>Egg Box</i> .....	20
Gambar 2.15 Carrier-Binding.....	22
Gambar 2.16 Imobilisasi Enzim dengan Ikatan Ionic.....	22
Gambar 2.17 Imobilisasi Enzim dengan Ikatan Kovalen.....	23
Gambar 2.18 Imobilisasi Enzim dengan Metode Cross-linking.....	24
Gambar 2.19 Imobilisasi Enzim dengan Metode Entrapping .....	24
Gambar 2.20 Reaksi pembentukan ester glukosa.....	24
Gambar 2.21 Ester Glukosa.....	25
Gambar 4.1 System Refluks .....	35
Gambar 4.2 Reaksi Saponifikasi.....	36
Gambar 4.3 Reaksi Hidrolisis Trigliserida.....	37
Gambar 4.4 Hasil ekstraksi asam lemak dari minyak kelapa sawit.....	37
Gambar 4.5 Asam Lemak hidrolisat.....	38
Gambar 4.6 Spektrum FT-IR Asam Lemak hidrolisat.....	39
Gambar 4.7 Egg-Box.....	41
Gambar 4.8 (a) Ilustrasi Metode Entrapping (b) Enzim Imobil.....	42
Gambar 4.9 Enzim imobil.....	42
Gambar 4.10 Kurva <i>loading efficiency</i> .....	43
Gambar 4.11 Hasil Hidrolisis secara enzimatis.....	44
Gambar 4.12 Kurva <i>immobilization Yield</i> .....	45
Gambar 4.13 (a) Hasil Esterifikasi Enzim Imobil (b) Setelah di Sentrifugasi.....	48
Gambar 4.14 Campuran minyak dan air.....	48
Gambar 4.15 Campuran minyak dan air dilihat dari mikrosko .....	49

Gambar 4.16 Grafik Persen Konversi Terhadap Suhu.....	50
Gambar 4.17 Grafik Persen Konversi Terhadap Waktu Inkubasi.....	52
Gambar 4.18 Grafik Persen Konversi Terhadap Rasio mol Glukosa: Asam Lemak...	53
Gambar 4.19 Grafik Persenkonversi Terhadap Jumlah <i>Molecular Sieve</i> .....	55
Gambar 4.20 Hasil Esterifikasi dengan Penambahan <i>Molecular Sieve</i> (a) 0,1 gram (b) 0.7 gram.....	56
Gambar 4.21 <i>Molecular Sieve</i> .....	57
Gambar 4.22 (a) Hasil Esterifikasi Free Enzim (b) Setelah di Sentrifugasi.....	57
Gambar 4.23 Spektrum FT-IR Ester Glukosa dari Enzim Bebas.....	58



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 : Sebaran Industry Berbasis Kelapa Sawit di Indonesia.....	4
Tabel 2.2 Komposisi Asam Lemak Minyak Sawit dan Titik Cairnya.....	7
Table 2.3 Molecular.....	26
Tabel 4.1 Identifikasi Gugus Fungsi Spektrum FT-IR Asam Lemak Bebas.....	39
Tabel 4.2 Loading Efficiency .....	43
Tabel 4.3 Immobilization Yield.....	45
Tabel 4.4 Data Persen Konversi dari Variasi Suhu Reaksi Esterifikasi.....	50
Tabel 4.5 Data Persen Konversi dari Variasi Waktu Inkubasi.....	52
Tabel 4.6 Data Persen Konversi dari Variasi Rasio mol Substrat .....	53
Tabel 4.7 Data Persen Konversi dari Variasi Jumlah Molecular Sieve.....	55
Tabel 4.8 Identifikasi Gugus Fungsi Spektrum FT-IR Ester glukosa dari Enzim Bebas.....	59

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan BM Hidrolisat Asam Lemak Minyak Sawit.....	66
Lampiran 2 Perhitungan Penentuan Rasio Bahan.....	67
Lampiran 3 Penentuan Konsentrasi Ezim bengan Metode Lowry.....	68
Lampiran 4 Penentuan persen immobilization yield.....	70
Lampiran 5 Data Optimasi Esterifikasi.....	71
Lampiran 6 Perhitungan Persen Konversi dari Asam Lemak Minyak Sawit.....	73
Lampiran 7 Data Analisis Kandungan Asam Lemak Minyak Sawit.....	74
Lampiran 8 Spectrum IR Glukosa.....	76
Lampiran 9 Spectrum IR Alginat.....	77
Lampiran 10 Spectrum IR Asam Lemak Minyak Sawit.....	78
Lampiran 11 Ester Glukosa dengan Free Enzim.....	79

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan salah satu penghasil kelapa sawit terbesar di dunia. Tumbuhan kelapa sawit tersebar di beberapa daerah di Indonesia seperti Aceh, pantai timur Sumatra, Jawa, dan Sulawesi (Ani Suryani, 2005), (Indra Bayu Russiana, 2006), dan (Ika Novianingsih, 2011). Dengan tingkat produksi kelapa sawit yang tinggi, jika Indonesia hanya mengekspor dalam bentuk mentahnya saja seperti minyak sawit (CPO), maka keuntungan yang diperoleh negara akan jauh lebih kecil dibandingkan jika Indonesia mampu mengekspor produk turunannya. Produk turunan dari minyak sawit salah satunya adalah asam lemak. Salah satu inovasi baru dari pemanfaatan asam lemak minyak sawit adalah dengan pembentukan ester glukosa asam lemak.

Ester glukosa asam lemak merupakan *emulsifier* non-ionik, yaitu *emulsifier* yang pada bagian alkilnya tidak bermuatan (Zuhrina Masyithoh, 2008). Ester yang disintesis dari senyawa ini memiliki keunggulan dibandingkan surfaktan jenis lain. Keunggulannya antara lain mudah terurai secara biologi (*biodegradable*), sehingga tidak mencemari lingkungan (Indra Bayu Russiana, 2006). Selain itu kesinambungan pengadaan bahannya terjamin, karena glukosa dan minyak kelapa sawit merupakan sumber daya alam yang dapat diperbaharui. *Emulsifier* ester glukosa asam lemak juga dapat digunakan dalam makanan karena tidak berasa dan tidak berbau. (Sekar Indraswari, 2006)

Ester glukosa asam lemak diperoleh dari reaksi esterifikasi secara enzimatis. Hal ini dilakukan karena penggunaan enzim lipase sebagai katalis lebih aman dan ramah lingkungan jika dibandingkan dengan penggunaan katalis asam untuk reaksi esterifikasi. Akan tetapi harga enzim lipase komersial biayanya sangat tinggi, karena proses produksinya yang sangat sulit dan memakan waktu.

Selain itu pada proses enzimatis, enzim bebas yang telah digunakan tidak dapat dipakai kembali karena terlarut dalam media reaksi (Praswati Wulan. *et al.*, 2007).

Salah satu cara untuk mengatasi kelemahan ini adalah dengan menerapkan teknik immobilisasi pada enzim yang akan digunakan. Immobilisasi enzim akan sangat menguntungkan dalam penggunaannya karena dapat digunakan berulang-ulang dan cenderung lebih stabil. Pada penelitian ini *matriks* yang digunakan sebagai media yang dapat mencegah terlarutnya enzim adalah alginat. Penggunaan alginat dalam teknik immobilisasi enzim memiliki beberapa keuntungan yaitu harga yang murah, efisien, dan lebih mudah penggunaannya (Moh Su'i, 2011).

Selain menghasilkan produk ester glukosa asam lemak, pada reaksi esterifikasi akan dihasilkan air sebagai produk samping. Keberadaan air ini dapat membuat reaksi bergeser ke arah hidrolisis, untuk menarik air tersebut, digunakan molekular sieve. Agar dapat memperoleh ester glukosa asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa sawit yang optimal, maka dilakukan studi sintesis ester dari glukosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa sawit menggunakan katalis lipase *Candida rugosa* terimmobilisasi pada alginat.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini dapat dinyatakan sebagai berikut :

1. Berapakah konsentrasi Na-alginat optimum yang dibutuhkan untuk reaksi immobilisasi enzim lipase?
2. Berapakah suhu, rasio mol substrat, waktu inkubasi, dan banyaknya *molecular sieve* yang dibutuhkan agar reaksi esterifikasi ester glukosa asam lemak dapat berjalan secara optimal ?
3. Apakah ester glukosa dapat berperan sebagai *emulsifier*?

### 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah Tujuan penelitian ini yaitu :

1. Menentukan konsentrasi Na-alginat yang dibutuhkan untuk immobilisasi enzim lipase
2. Menentukan suhu, rasio mol substrat, waktu inkubasi dan *molecular sieve* yang dibutuhkan agar reaksi ester glukosa asam lemak berjalan optimum
3. Mensintesis ester glukosa asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa sawit

Adapun manfaat penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui kondisi optimum yang dibutuhkan untuk mensintesis *emulsifier* ester glukosa menggunakan lipase terimmobilisasi dalam matriks alginate.
2. Hasil kajian ini diharapkan dapat menjadi artikel ilmiah yang dapat berkontribusi dalam bidang sains pangan, khususnya mengenai perkembangan modifikasi karbohidrat sederhana dan pemberdayaan minyak nabati, sebagai salah satu kekayaan alam asal Indonesia.

### 1.4 Hipotesis

1. Lipase *Candida rugosa* dapat diimmobilisasi menggunakan matriks alginat (Keehoon Won., *et al*, 2005)
2. Enzim lipase *Candida rugosa* dapat digunakan sebagai katalis reaksi esterifikasi antara glukosa dan asam lemak sawit (Jiugao Yu *et al*, 2007)
3. Ester glukosa hasil sintesis pada kondisi optimum dapat bertindak sebagai *emulsifier* (Sekar Indraswari, 2006)

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Kelapa Sawit

Tanaman kelapa sawit disebut juga dengan (*Elaeis guineensis*, Jacq). *Elaeis* berasal dari kata *Elaion* yang dalam bahasa Yunani berarti minyak. *guineensis* berasal dari kata *Guinea* yaitu Pantai Barat Afrika dan Jacq singkatan dari Jacquin seorang Botanis dari Amerika. Tanaman kelapa sawit tingginya dapat mencapai 24 meter. Akar serabut tanaman kelapa sawit mengarah ke bawah dan samping. Seperti jenis palma lainnya, daunnya tersusun majemuk menyirip, berwarna hijau tua dan pelepah berwarna sedikit lebih muda. Penampilannya agak mirip dengan tanaman salak, hanya saja dengan duri yang tidak terlalu keras dan tajam. Batang tanaman diselimuti bekas pelepah hingga umur 12 tahun. Setelah umur 12 tahun pelepah yang mengering akan terlepas sehingga penampilan menjadi mirip dengan kelapa seperti pada Gambar 2.1:



**Gambar 2.1 Pohon kelapa sawit**

Tanaman kelapa sawit dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis ( $15^{\circ}$  LU -  $15^{\circ}$  LS). Tanaman ini tumbuh sempurna di ketinggian 0-500 m dari permukaan

laut dengan kelembaban 80-90% (Ani Suryani, 2005). Indonesia merupakan salah satu penghasil kelapa sawit terbesar di dunia. Beberapa daerah di Indonesia yang memiliki industri berbasis kelapa sawit dapat dilihat pada Table 2.1:

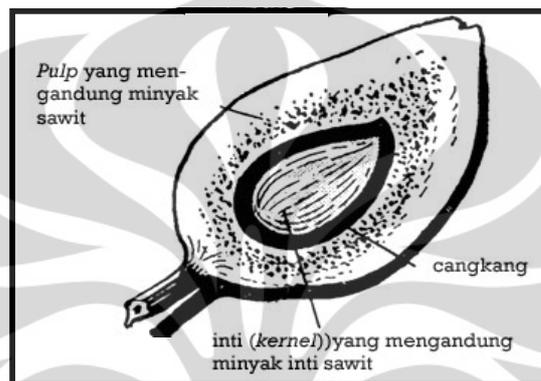
**Tabel 2.1. Sebaran Industri Berbasis Kelapa Sawit di Indonesia**

No	Daerah	Sebaran Industri Berbasis Kelapa sawit %
1	Sumatra Utara	15,8
2	Riau	14,3
3	Sumatra Selatan	10,9
4	Kalimantan Barat	10,3
5	Kalimantan Tengah	7,1
6	Sumatra Barat	6,0
7	Kalimantan Timur	5,3
8	Jambi	3,8
9	Sulawesi Selatan	3,4
10	Papua	3,4
11	Kalimantan Selatan	2,9
12	Jawa Barat	2,0
13	Sulawesi Tengah	2,0
14	Lampung	2,2
15	Bengkulu	1,8
16	Jawa Tengah	1,6
17	Jawa Timur	1,3
18	Sulawesi Tenggara	0,4

[Sumber: Ani Suryani, 2005]

Buah sawit jika dibelah melintang maka akan terlihat bagian buah sawit yang terdiri atas *exsocarp*, *mesocarp*, *endocarp*, dan bagian *karnel*. *Exsocarp*

merupakan bagian terluar buah sawit atau bagian kulit buah yang berwarna kemerahan dan licin, *mesocarp* merupakan serabut buah, sedangkan *endocarp* merupakan cangkang pelindung inti, dan bagian *karnel* bagian inti. Bagian inti sawit merupakan endosperm dan embrio dengan kandungan minyak inti berkualitas tinggi (Ani Suryani, 2005). Potongan melintang dari buah sawit dapat dilihat pada Gambar 2.2:



[Sumber : Prima luna, 2011]

**Gambar 2.2. Buah kelapa sawit**

Taksonomi tanaman kelapa sawit :

- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Keluarga : Palmaceae
- Sub keluarga : Cocoideae
- Genus : *Elaeis*
- Spesies : *Elaeis guineensis*, Jacq

## 2.2 Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit adalah minyak nabati semipadat. Hal ini karena minyak sawit mengandung sejumlah besar asam lemak tidak jenuh dengan atom karbon lebih dari delapan. Semakin jenuh molekul asam lemak dalam molekul

trigliserida, semakin tinggi titik beku atau titik cair minyak tersebut, sehingga pada suhu kamar biasanya berada pada fase padat. Sebaliknya semakin tidak jenuh asam lemak dalam molekul trigliserida maka semakin rendah titik cair minyak tersebut, sehingga pada suhu kamar berada pada fase cair. Secara alamiah, asam lemak jenuh yang mengandung atom karbon satu hingga delapan berbentuk cair, sedangkan jika atom karbon lebih dari delapan maka akan berbentuk padat. Pada Tabel 2.2 tertera komposisi asam lemak dari minyak kelapa sawit:

**Tabel 2.2. Komposisi Asam lemak Minyak Sawit dan Titik Cairnya**

Jenis Asam Lemak	Komposisi (%)	Titik Cair (°C)
Asam Kaprat	1 – 3	31,5
Asam Laurat	0 – 1	44
Asam Miristat	0,9 – 1,5	48
Asam Palmitat	39,2 – 45,8	64
Asam Stearat	3,7 - 5,1	70
Asam Oleat	37,4 – 44,1	14
Asam Linoleat	8,7 - 12,5	-11
Asam Linolenat	0 - 0,6	-9

[Sumber: repository.ipb.ac.id]

### 2.3. Asam Lemak

Secara alami, asam lemak bisa berbentuk bebas maupun terikat dengan gliserol. Asam lemak bebas adalah asam lemak yang terpisahkan dari trigliserida, digliserida, monogliserida, dan gliserol. Hal ini dapat disebabkan oleh pemanasan dan terdapatnya air sehingga terjadi proses hidrolisis (Mescha Destianna., *et al.*, 2007). Oksidasi juga dapat meningkatkan kadar asam lemak bebas dalam minyak nabati. Asam lemak pada umumnya adalah asam lemak monokarboksilat berantai lurus yang mempunyai jumlah atom karbon genap yang dapat dijenuhkan atau dapat mempunyai satu atau lebih ikatan rangkap.

Asam lemak terbagi menjadi dua yaitu asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh:

1. Asam lemak jenuh adalah asam lemak yang tidak terdapat ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya (Nurhida Pasaribu, 2004). Asam lemak jenuh bersifat lebih stabil dan memiliki titik cair yang semakin meningkat dengan semakin meningkatnya panjang rantai karbon. Beberapa contoh asam lemak jenuh antara lain : asam laurat, asam palmitat, asam kaprat, dan asam stearat
2. Asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung ikatan rangkap pada rantai karbonnya, misalnya asam oleat, asam linoleat, asam linolenat dan asam-asam lemak lainnya (Yustina Samosir, 2011). Asam lemak tidak jenuh biasanya terdapat dalam bentuk cis, walaupun sebagian kecil dalam bentuk trans. Asam lemak bentuk cis mempunyai titik cair yang lebih rendah dibandingkan dengan bentuk trans dengan panjang rantai yang sama

### 2.5.1 Asam Palmitat

Asam palmitat adalah asam lemak jenuh yang tersusun dari 16 atom karbon ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ). Pada suhu ruang, asam palmitat berwujud padat berwarna putih, dengan titik leburnya  $63,1^\circ\text{C}$ . Asam lemak ini terdapat dalam bentuk trigliserida pada minyak nabati maupun minyak hewani selain juga asam lemak lainnya. Minyak dengan ester gliserol palmitat maupun ester gliserol lainnya, apabila disabunkan dengan suatu basa kuat, kemudian diikuti hidrolisis dengan suatu asam akan menghasilkan gliserol, asam palmitat, dan asam lemak lainnya yang terkandung dalam minyak tersebut.

Berikut ini dicantumkan beberapa sumber lain dari asam palmitat, di antaranya : minyak sapi (46%), minyak avokat (70%) minyak kelapa (6%) (Brahmana, 1998), juga terdapat dalam minyak wijen (45,5%), minyak jagung (30%), minyak kedelai (11-60%), minyak kemiri(10%), minyak kacang tanah (40-60%), minyak tengkawang(40%) (Siska Ayu Wulandari, 2011)

#### a. Sifat Fisika Asam Palmitat

Rumus molekul	: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Titik didih	: $370\text{ }^\circ\text{C}$ (P : 760 mmHg)
Titik leleh	: $69,3\text{ }^\circ\text{C}$ (P : 760 mmHg)
Densitas	: 850,58 gram/mL (P : 760 mmHg)
Panas pembentukan	: 47,54 kal/gram

#### 2.5.2 Asam Oleat

Asam oleat merupakan asam lemak tak jenuh rantai panjang yang memiliki konfigurasi cis. Asam lemak ini pada suhu ruang berupa cairan kental dengan warna kuning pucat atau kuning kecokelatan. Asam oleat memiliki aroma yang khas dan bersifat tidak larut dalam air, tapi dapat bercampur dengan eter dan alkohol dalam semua perbandingan, titik lebur asam oleat adalah  $15,3\text{ }^\circ\text{C}$  dan titik didihnya  $360\text{ }^\circ\text{C}$ . (Yustina Samosir, 2011)

Asam oleat tersusun dari 18 atom C dengan satu ikatan rangkap di antara atom C ke-9 dan ke-10 (asam oleat ( $\omega$ 9, 18:1,  $\Delta^9$ )) Struktur kimia dari asam oleat dapat dilihat pada Gambar 2.3:



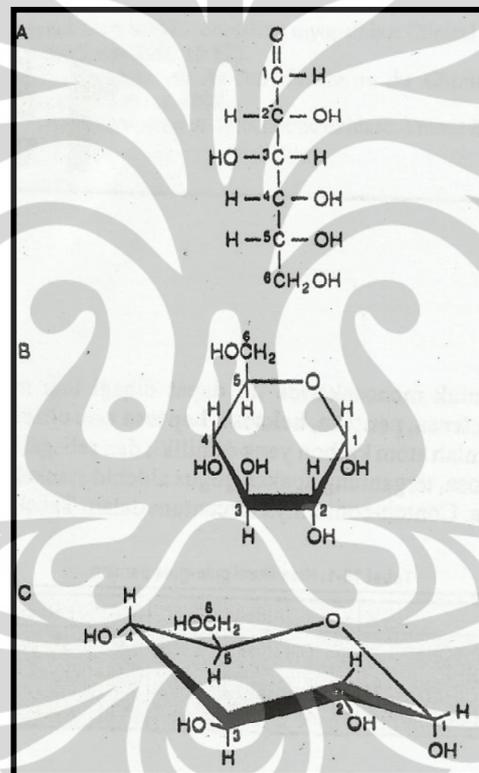
[ Sumber:Robert K. Murray, 1997]

**Gambar 2.3 Struktur asam oleat**

#### 2.4 Glukosa

Glukosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , berat molekul 180,18) adalah salah satu karbohidrat terpenting yang digunakan sebagai sumber tenaga bagi hewan dan tumbuhan.

Senyawa ini disintesis oleh klorofil pada tanaman dari karbondioksida dan air dengan bantuan matahari sebagai sumber energi. Glukosa diklasifikasikan sebagai monosakarida aldohexosa, karena memiliki gugus aldehida dan memiliki enam atom karbon (Mariana Rahmawati, 2008). Glukosa lebih banyak strukturnya berbentuk kursi siklik di bandingkan bentuk rantai lurus, karena karbohidrat memiliki gugus fungsi alkohol dan aldehyd sehingga struktur rantai lurus mudah berkonversi menjadi bentuk struktur kursi siklik atau struktur cincin hemiasetal. (Megasari Prihanjani, 2006). Struktur dari D-glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.4:



Keterangan: A: Bentuk rantai lurus

B:  $\alpha$ -D-glukosa proyeksi Haworth

C:  $\alpha$ -D-glukosa bentuk kursi

[ Sumber:Robert K. Murray, 1997]

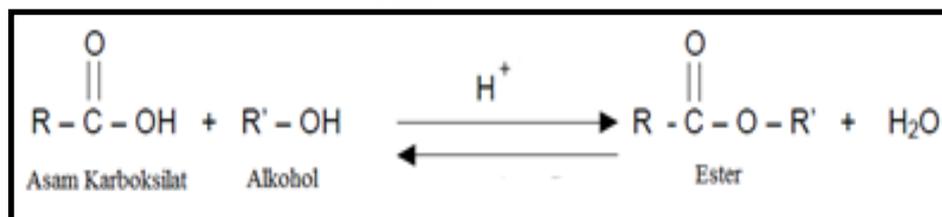
**Gambar 2.4 Struktur D-Glukosa**

Lima karbon dan satu oksigen dari rantai lurus glukosa membentuk cincin yang disebut cincin piranosa, bentuk paling stabil untuk aldosa berkarbon enam. Struktur cincin ini berada dalam kesetimbangan dengan bentuk yang lebih reaktif. Senyawa dengan rumus bangun yang sama tetapi berbeda konfigurasinya dikenal sebagai stereoisomer. Adanya atom karbon asimetris memungkinkan pembentukan isomer. Glukosa memiliki beberapa atom karbon asimetri sehingga glukosa memiliki beberapa buah isomer seperti isomer -D dan -L dan anomer  $\alpha$  dan  $\beta$  (Murray, *et al.*, 1999). Gugus-gugus hidroksil dalam glukosa bersifat serupa dengan gugus hidroksil pada alkohol, sehingga gugus-gugus ini dapat diesterifikasi oleh asam karboksilat. (Megasari Prihanjani, 2006) (Mariana Rahmawati, 2008)

## 2.5 Esterifikasi

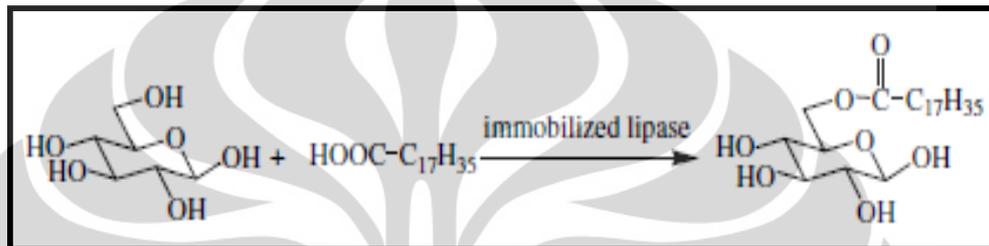
Esterifikasi adalah suatu reaksi ionik yang merupakan gabungan dari reaksi adisi dan reaksi penataan ulang eliminasi. Esterifikasi juga dapat didefinisikan sebagai reaksi antara asam karboksilat dan alkohol. Esterifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan katalis enzimatis (lipase) dan asam anorganik (asam sulfat dan asam klorida), dengan berbagai variasi alkohol. (Juliati Br. Tarigan, 2009)

1. Asam anorganik yang digunakan sebagai katalis akan menyebabkan asam karboksilat mengalami konjugasi sehingga asam konjugat dari asam karboksilat tersebutlah yang akan berperan sebagai substrat. (Juliati Br. Tarigan, 2009). Reaksi esterifikasi dengan katalis asam dapat dilihat pada Gambar 2.5:



**Gambar 2.5 Reaksi esterifikasi dengan katalis asam**

2. Reaksi esterifikasi secara enzimatik terjadi pada lingkungan dengan jumlah air yang terbatas yaitu  $< 1\%$  (*microaqueous*) (Rikza Khafi Qudsiyyah, 2003). Dalam reaksi enzimatik ini lipase akan membentuk ikatan sementara dengan substrat, ikatan ini menimbulkan penyebaran elektron dalam molekul substrat sehingga ikatan kovalen tertentu pada substrat menjadi mudah putus. Reaksi esterifikasi secara enzimatik terlihat pada Gambar 2.6:



[ Sumber: Jiugao Yu., et al, 2008]

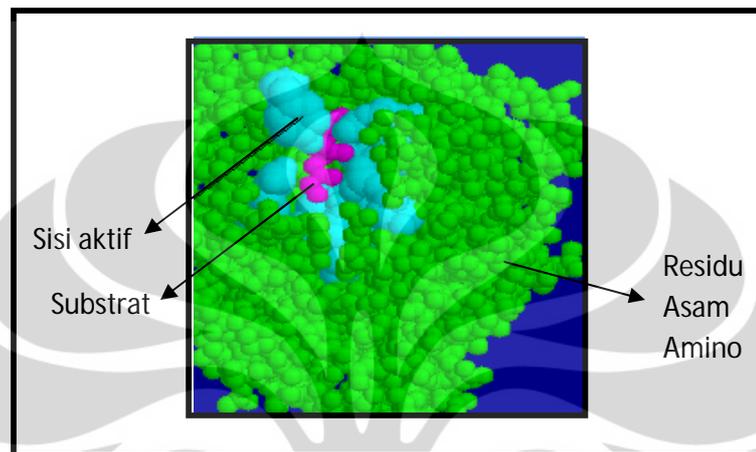
### Gambar 2.6 Reaksi esterifikasi secara enzimatik

Reaksi esterifikasi dapat dilakukan pada suhu tinggi tanpa menggunakan katalis dan pada suhu yang lebih rendah dilakukan dengan katalis. (<http://repository.usu.ac.id>). Saat ini katalis enzimatik pada reaksi esterifikasi sudah banyak digunakan untuk memperbaiki kekurangan yang terdapat pada penggunaan katalis kimia. Katalis enzimatik memiliki keunggulan salah satunya adalah produk yang dihasilkan tidak memiliki keragaman besar. (Prima Luna, 2011)

## 2.6 Enzim

Enzim merupakan protein katalitik (Neil A. Cambel., *et al*, 2002) yang terdiri dari asam amino dengan komposisi dan urutan yang teratur dan tetap. Mekanisme katalisis enzimatik sangat mirip dengan mekanisme reaksi kimia. Namun demikian, berbeda dengan katalisator anorganik atau organik yang lebih sederhana, enzim memperlihatkan urutan spesifitas substrat yang sangat tinggi. Hanya daerah tertentu dari molekul enzim yang berikatan dengan substrat. Daerah

tersebut disebut sisi aktif, merupakan kantong atau lekukan yang khas pada permukaan protein tersebut (Gambar 2.7). Umumnya tempat aktif terbentuk oleh beberapa asam amino pada molekul enzim, dan sisi-sisinya adalah molekul protein yang memberikan suatu kerangka kerja yang menguatkan konfigurasi tempat aktif.



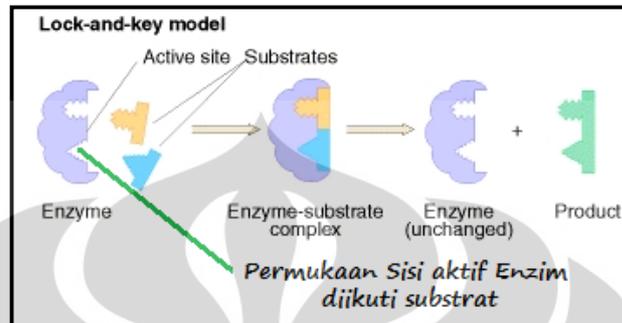
[ Sumber: Charles E Ophardt, 2003]

**Gambar 2.7. Kompleks enzim-substrat**

Sisi aktif enzim bersifat sangat spesifik dan hanya dapat bergabung dengan substrat tertentu yang spesifik. Pembentukan ikatan yang sementara antara substrat dengan enzim dipengaruhi oleh kemampuan substrat untuk mencapai sisi aktif enzim. Ikatan sementara antara substrat dengan enzim menimbulkan penyebaran elektron dalam molekul substrat. Penyebaran ini menyebabkan suatu regangan pada ikatan kovalen dalam molekul substrat, sehingga ikatan kovalen tersebut menjadi mudah putus. Keadaan pada saat terjadinya regangan ikatan molekul substrat setelah berinteraksi dengan enzim disebut sebagai keadaan transisi atau pengaktifan substrat. Ada 2 teori mengenai kerja enzim, yaitu:

- a. *Lock and key* : Sisi aktif enzim mempunyai bentuk tertentu yang hanya sesuai untuk satu jenis substrat saja. Substrat yang sesuai dengan sisi aktif enzim diilustrasikan seperti gembok dengan anak kuncinya. Pada teori ini Bentuk pusat aktif enzim bersifat rigid (kaku). Jika enzim mengalami denaturasi (rusak) karena Perubahan suhu atau pH, bentuk sisi aktif akan

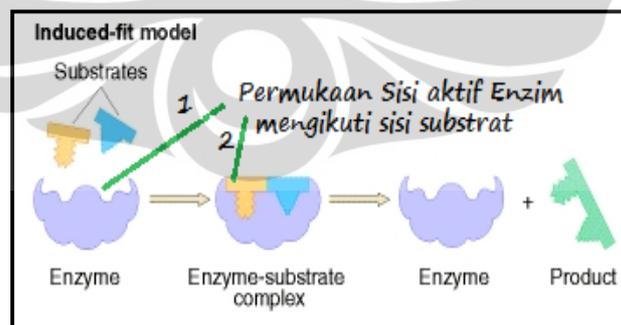
berubah sehingga tidak sesuai lagi dengan bentuk substratnya. Perubahan pH juga mempunyai pengaruh yang sama. Ilustrasi dari teori *lock and key* dapat dilihat pada Gambar 2.8 :



[Sumber: <http://ic.brooklyn.cuny.edu>]

**Gambar 2.8 : Teori *Lock and Key***

- b. *Induced fit*: Sisi aktif enzim lebih fleksibel dalam menyesuaikan struktur substrat. Ikatan antara enzim dan substrat dapat berubah menyesuaikan dengan substrat. Pada keadaan ini substrat menginduksi suatu perubahan bentuk dalam enzim. Perubahan ini menempatkan residu asam amino atau gugus-gugus lain pada enzim menurut arah spesial yang benar untuk pengikatan, katalisis substrat, ataupun keduanya. Ilustrasi dari teori *induced fit* dapat dilihat pada Gambar 2.9:



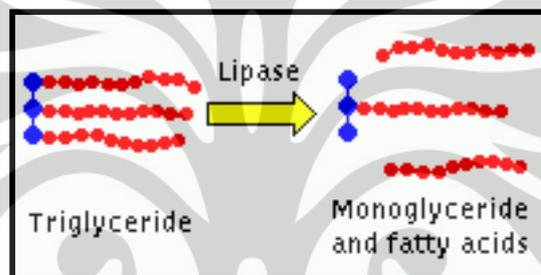
[Sumber: <http://ic.brooklyn.cuny.edu>]

**Gambar 2.9 : Model *induced-fit* pada pusat aktif enzim**

## 2.7 Lipase

Lipase merupakan enzim yang memiliki peran yang penting dalam bioteknologi modern. Lipase dikenal memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis dan dalam sintesis. Lipase dapat berperan sebagai biokatalis untuk reaksi reaksi hidrolisis, esterifikasi, alkoholisis, asidolisis dan aminolisis (Praswati Wulan, 2007).

Lipase diklasifikasikan sebagai enzim hidrolase yang menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas, gliserida parsial (monogliserida), digliserida, dan gliserol seperti pada Gambar 2.10 berikut.

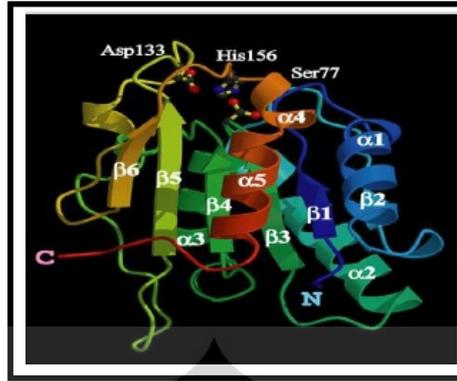


[Sumber: Sumarlin (2010)]

**Gambar 2.10 : Hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas**

Jenis reaksi yang terjadi ditentukan oleh kondisi substrat terutama jumlah air yang terdapat dalam campuran reaksi. Pada kondisi dengan jumlah air banyak (*aqueous*), reaksi akan cenderung ke arah hidrolisis lemak/minyak, sedangkan pada jumlah air yang terbatas, yaitu  $< 1\%$  (*microaqueous*) reaksi akan mengarah ke reaksi perpindahan atau reaksi pertukaran asil. Reaksi-reaksi sintesis tersebut meliputi esterifikasi, transesterifikasi dan interesterifikasi (Rikza Khafi Qudsiyyah, 2003)

Lipase dapat berumber dari beberapa jenis mikroba ( *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Candida rugosa* ) (Joko sulisty, 2010). Lipase yang berasal dari *Candida rugosa* memiliki massa *molecular* sebesar 120.000 dan titik isoelektrik berada pada pH 4,5 serta aktivitas optimum berada pada pH 6,5-7,5.



[Sumber: Sumarlin (2010)]

**Gambar2.11. Lipase**

Faktor yang mempengaruhi aktivitas lipase:

1. Faktor pH : Enzim bekerja optimal pada pH tertentu, umumnya pada pH netral. Pada kondisi asam atau basa kerja enzim terhambat, karena pada pH rendah atau tinggi, enzim akan mengalami denaturasi. Agar enzim dapat bekerja secara maksimal, maka dijaga agar tidak berubah, yaitu dengan menggunakan larutan penyangga (buffer)
2. Faktor suhu : Setiap enzim berfungsi secara optimum pada suhu tertentu. Semakin tinggi suhu, semakin tinggi aktivitas enzim sampai pada suatu batas tertentu yang dapat menurunkan aktivitasnya. Enzim merupakan protein. Semakin tinggi suhu protein Dengan semakin terus meningkatnya suhu lingkungan maka protein enzim akan mengalami perubahan konformasi sehingga terdenaturasi dan aktifitas enzim akan hilang. Suhu optimum lipase pada umumnya berkisar antara 30<sup>0</sup>C dan 40<sup>0</sup>C.
3. Konsentrasi substrat : Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzim adalah kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Akan tetapi pada penambahan substrat yang terus-menerus peningkatan kecepatan reaksi akan semakin kecil. Pada akhirnya akan tercapai titik batas yang mengakibatkan reaksi tidak lagi bertambah dengan bertambahnya substrat karena enzim menjadi jenuh dengan substrat.

4. Konsentrasi enzim : peningkatan konsentrasi enzim meningkatkan laju reaksi hingga mencapai jumlah konsentrasi enzim maksimum. (Rikza Khafi Qudsiyyah, 2003)
5. Inhibitor enzim : senyawa kimia tertentu secara selektif menghambat (menginhibisi) kerja enzim spesifik. (Neil A. Cambel., *et al*, 2002)

## 2.8 Sisi Aktif Enzim Lipase

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim lipase berlangsung pada sisi aktif enzim. Sisi aktif lipase terdiri dari trio residu asam amino yaitu Ser-Asp/Glu-His. Dalam struktur enzim, sisi aktif ini tersembunyi di balik suatu celah polipeptida yang sering disebut *lid* enzim (Prima Luna, 2011). Lipase disebut juga serin hidrolase yang bekerja pada urutan G-X1-S-X2-G, dengan G adalah glycine, S adalah serine, X1 adalah histidin, dan X2 adalah asam glutamat atau aspartat (Sumarlin, 2010). Lipase *Candida rugosa* spesifik untuk menghidrolisis trigliserida yang dibentuk oleh cis-9 asam lemak tak jenuh (oleat, linoleat, dan asam linolenat). Urutan spesifisitas asam lemak untuk lipase *Candida rugosa*, yaitu oleat > laurat > palmitat > miristat > stearat (Banu ÖZTÜRK, 2001)

## 2.9 Alginat

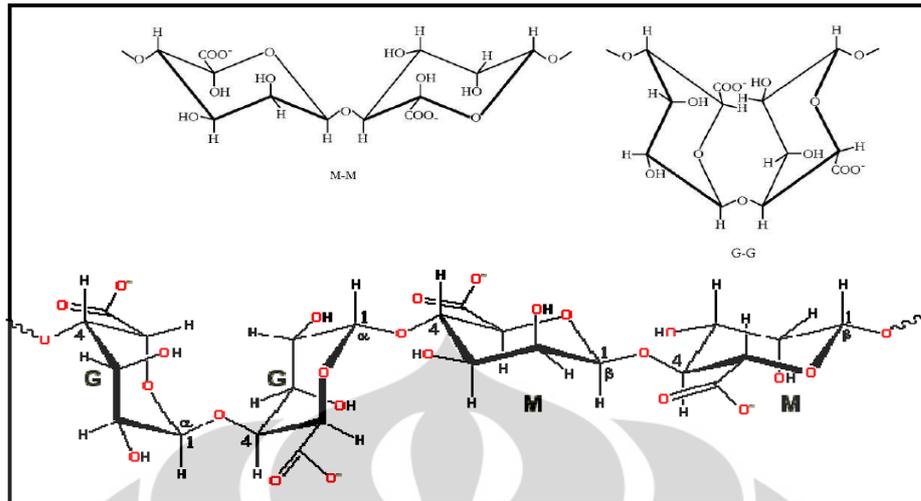
Alginat adalah polimer linier organik polisakarida yang mengandung lebih kurang 700-1000 residu asam uronat yaitu monomer  $\alpha$ -L asam guluronat (G) dan  $\beta$ -D asam manuronat (M) atau dapat berupa kombinasi dari kedua monomer tersebut. Struktur dari monomer  $\alpha$ -L asam guluronat (G) dan  $\beta$ -D asam manuronat (M) dapat dilihat pada Gambar 2.12:



[Sumber: Hale Aylin Coruh, 2005]

**Gambar 2.12 (a) $\beta$ -D-mannuronat dan (b) $\alpha$ -L-guluronat**

Struktur asam guluronat berbeda dengan asam manuronat. Residu asam guluronat mempunyai ikatan C 1,4 di-axial sehingga struktur pita dari polimer ini melengkung, berlawanan dengan bentuk merata dari asam manuronat. Asam D-manuronat memiliki ikatan diekuatorial  $C_1^4$  sedangkan asam guluronat memiliki ikatan diaksial  $C_1^4$ . Ikatan 1,4 rantai alginat yang hanya mengandung residu asam manuronat disebut blok M, rantai alginat yang hanya mengandung residu asam guluronat disebut blok G, dan rantai alginat yang mengandung residu asam manuronat serta asam guluronat disebut blok G-M. Struktur alginat dapat kita lihat pada Gambar 2.13:



[Sumber: Seçkin GÜLAY. 2009]

**Gambar 2.13. Struktur alginat**

Alginat memiliki sifat koloid, berbentuk gel, dan hidrofilik. Hal ini menyebabkan alginat banyak digunakan sebagai *emulsifier*, pengental, dan *stabilizer* dalam industri. Sifat hidrofilik alginat dimanfaatkan untuk mengikat air dalam proses pembekuan makanan. Pada makanan yang dibekukan, polimer ini bersifat dapat mempertahankan jaringan makanan. Selain itu, polimer ini dapat digunakan sebagai *emulsifier* dalam pembuatan saus, dan mengenyalkan, menjaga tekstur, serta menghasilkan rasa yang enak dalam pembuatan puding. Alginat juga dimanfaatkan dalam dunia kosmetik karena sifatnya yang dapat mengikat air dan mudah menembus jaringan. Hal ini menyebabkan polimer ini terikat sempurna pada jaringan kulit dan mempertahankan kelembaban (hidrofilik) dan elastisitas kulit.

Selain aplikasi alginat dalam industri di atas, salah satu aplikasi alginat yang sering dimanfaatkan adalah untuk proses imobilisasi. Dari penelitian yang telah dilakukan, alginat merupakan matriks imobilisasi yang paling baik karena efisien, mudah digunakan, dapat dimodifikasi, dan tidak bersifat toksik. Sifat-sifat alginat sebagian besar tergantung pada tingkat polimerisasi dan perbandingan komposisi guluronat dan manuronat dalam molekul.

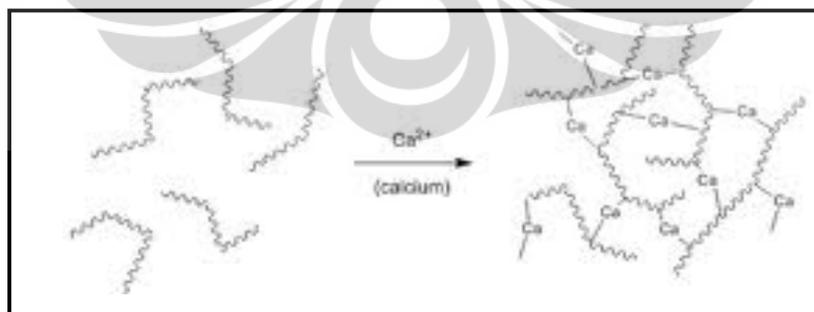
Alginat tidak stabil terhadap panas, oksigen, ion logam, dan sebagainya. Dalam keadaan demikian, alginat akan mengalami degradasi. Selama

penyimpanan, alginat cepat mengalami degradasi dengan adanya oksigen, terutama dengan naiknya kelembaban udara. Alginat dengan viskositas tinggi lebih cepat terdegradasi dibandingkan alginat dengan viskositas sedang atau rendah. Urutan stabilitas alginat selama penyimpanan adalah : Natrium alginat > amonium alginat > asam alginat. ( Firdaus Sembiring. 2010)

Kekakuan struktur gel alginat akan bertambah secara umum seiring dengan afinitasnya terhadap ion berdasarkan urutan sebagai berikut, Mn>Co>Zn>Cd>Ni>Cu>Pb>Ca>Sr>Ba. Tidak semua ion-ion ini dapat digunakan untuk immobilisasi sel. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  adalah ion yang paling umum digunakan untuk tujuan immobilisasi sel karena toksisitasnya paling rendah. (Ofa Suzanti Betha, 2009)

Kemampuan alginat membentuk gel juga ditentukan oleh kadar asam guluronat yang menyusun struktur alginat. Kekuatan gel ditentukan oleh ukuran molekul dan komposisi struktur yang menyusun alginat. Tingginya kandungan asam guluronat di dalam alginat akan menyebabkan alginat dapat mengikat ion divalen tadi lebih baik dibandingkan dengan alginat yang lebih sedikit mengandung asam

Seperti telah dijelaskan sebelumnya, rantai asam guluronat melengkung sedangkan rantai asam mannuronat merata. Hal ini menyebabkan keduanya mempunyai perbedaan dalam berikatan dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Penambahan  $\text{Ca}^{2+}$  pada asam guluronat menjadikannya bentuk gel, seperti  $\text{Ca}^{2+}$  masuk ke dalam *egg box* antar unit monomer, seperti Gambar 2.14. ( Firdaus Sembiring, 2010)



**Gambar 2.14** *Egg Box*

## 2.10 Imobilisasi Enzim

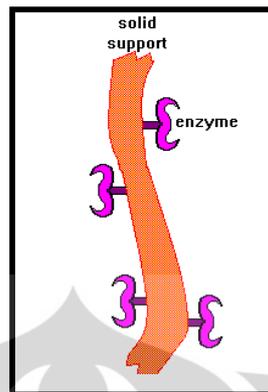
Immobilisasi enzim merupakan teknik pengurungan enzim yang menjadi perhatian dalam beberapa tahun belakangan. Proses immobilisasi dilakukan dengan bantuan matriks sebagai media yang dapat mencegah terlarutnya enzim. Sebuah enzim imobil merupakan enzim yang secara fisik ditempatkan di dalam suatu daerah/ruang tertentu, sehingga dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan secara berulang-ulang dan kontinyu. Hal ini dapat mengakibatkan peningkatan resistensi terhadap perubahan dalam kondisi seperti pH atau suhu.

Proses immobilisasi enzim dinilai sangat ekonomis sehingga sering digunakan dalam industri untuk mengkatalisis reaksi. Manfaat-manfaat lain dari enzim yang terimobilisasi adalah :

- Dapat digunakan berulang
- Penghentian proses cepat (diambil dengan filtrasi, laju alir <<)
- Kestabilan lebih baik dengan adanya ikatan pada imobilisasi.
- Dapat digunakan untuk tujuan analisis, misalnya menentukan waktu paruh enzim dan perkiraan penurunan aktivitas
- Dapat digunakan untuk proses kontinyu
- Pengontrolan lebih baik

Berdasarkan tipe interaksi antara enzim dengan matriks yang digunakan, imobilisasi enzim dibagi menjadi tiga metode yaitu:

1. *Carrier-binding* : Enzim diikat pada *carrier* (matriks) yang tidak larut air sehingga luas permukaan diameter pori dapat menentukan muatan enzim, seperti pada Gambar 2.15:

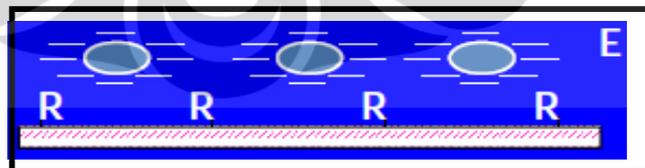


[Sumber :Banu ÖZTÜRK, 2001]

**Gambar 2.15 : Carrier-Binding**

*Carrier-binding* dibagi menjadi beberapa jenis yaitu:

- Adsorpsi Fisik : mudah dilakukan, ekonomis dan enzim diabsorpsi pada permukaan matriks. Kelebihan dari metode ini adalah enzim dapat diregenerasi dan pada kondisi lunak aktivitas enzim tetap tinggi. Metode ini memiliki beberapa kelemahan yaitu kekuatan ikatannya lemah ( pH dan kekuatan ion dapat berubah sehingga menyebabkan bocor  
Contoh: adsorpsi fisik adalah: carbon aktif, tanah liat, koalinit, silica gel, pati, alumina, bentonit, gluten, dan gel Ca-fosfat.
- Ikatan Ionik : Terjadi ikatan ionik antara enzim dengan *carrier* yang tidak larut air dan mengandung residu penukar ion(R) (Gambar 2.16)

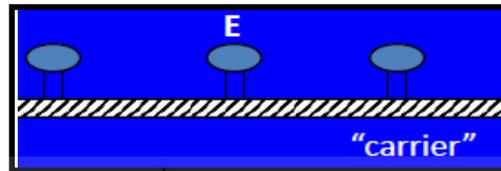


[Sumber :Banu ÖZTÜRK, 2001]

**Gambar 2.16 : Imobiliasi enzim dengan ikatan ionik**

- Ikatan Kovalen : Terbentuk ikatan kovalen antara enzim dengan *carrier* yang tidak larut dalam air (ikatan kuat dan tidak bocor).

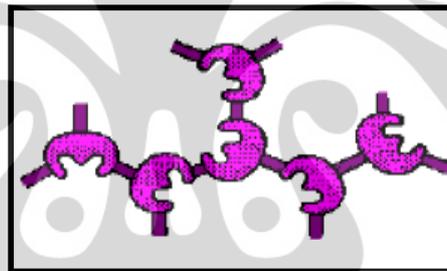
*Carrier* mengandung gugus aktif di antaranya diazonium, asam azida, isosianat, dan halida (Gambar 2.16)



[Sumber :Banu ÖZTÜRK, 2001]

### Gambar2.17 : Imobilisasi enzim dengan ikatan kovalen

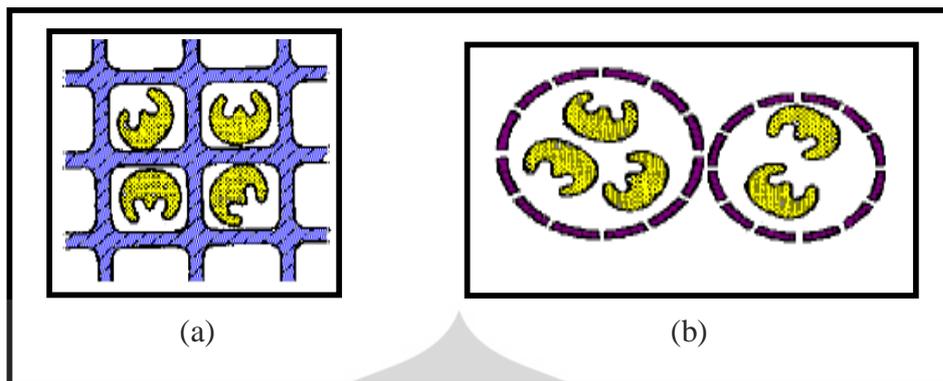
2. *Cross-linking* ( ikatan silang ) : Pada metode ini terjadi ikatan kimia melalui pembentukan ikatan melintang inter molekul antara molekul enzim dengan pereaksi bifungsional atau multifungsional (Gambar 2.18)



[Sumber :Banu ÖZTÜRK, 2001]

### Gambar 2.18 : Imobilisasi enzim dengan metode *cross-linking*

3. *Entrapping* ( penjeratan ) : pada metode ini lokasi enzim dalam kisi matriks atau mikro kapsul ( membran semipermeable). Enzim tidak terikat pada matrik gel atau membran. Salah satu contoh matriks yang digunakan adalah poliakrilamid, pati, dan alginate. Metode entrapping dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu jenis kisi dan jenis mikrokapsul:



Keterangan: (a). Entrapping jenis kisi  
(b). Entrapping jenis mikrokapsul

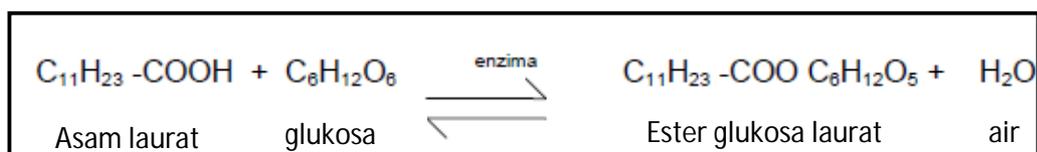
[Sumber :Banu ÖZTÜRK, 2001]

**Gambar 2.19 : Imobilisasi enzim dengan metode Entrapping**

### 2.11 Ester Glukosa Asam Lemak

Ester asam lemak-karbohidrat merupakan suatu *emulsifier* non-ionik berbasis minyak nabati dan karbohidrat yang mudah terurai secara biologi (biodegradabel) sehingga tidak mencemari lingkungan. Selain itu kesinambungan pengadaannya terjamin karena karbohidrat (glukosa) dan minyak kelapa sawit merupakan sumber daya alam yang dapat diperbaharui. Ester glukosa asam lemak sering digunakan dalam industri detergen, farmasi, makanan, dan kosmetik. (Rini Sufriani, 2006)

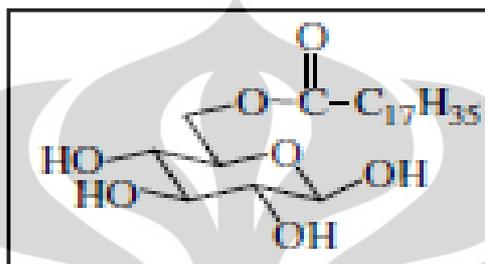
Reaksi pembentukan ester glukosa antara asam lemak jenuh dengan glukosa yang dikatalisis oleh enzim dapat digambarkan sebagai berikut (Gambar 2.20):



[Sumber: Jose Osvaldo Bezerra Carioca., *et al.* Universidade Federal do Ceara]

**Gambar 2.20 : Reaksi pembentukan ester glukosa laurat**

Reaksi eterifikasi glukosa oleh asam lemak terjadi melalui mekanisme *pingpong reactions*, yaitu lipase akan bereaksi dengan asam lemak membentuk asil lipase dan air, kemudian asil lipase bereaksi dengan glukosa membentuk ester dan lipase akan dilepas kembali (Anna Rosdiana., *et al.*, 2009). Salah satu contoh ester glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.21:



[Sumber : Jiugao Yu., *et al.* 2008]

**Gambar 2.21 : Ester glukosa**

### 2.12 Emulsifier

Emulsi adalah system dispersi cairan dalam cairan lain yang tidak saling bercampur. Emulsi dapat dibentuk dari dua atau tiga fase. Terdapat dua jenis emulsi, yakni emulsi minyak dalam air (O/W) dan emulsi air dalam minyak (W/O). Dalam emulsi O/W, tetesan-tetesan minyak terdispersi dalam medium pendispersi air, sedangkan dalam emulsi W/O tetesan-tetesan air terdispersi dalam medium pendispersi minyak (Rini Sufriani, 2006). Salah satu contoh emulsifier O/W adalah ester glukosa oleat. (Rini Sufriani, 2006).

Emulsi merupakan sistem heterogen yang terdiri atas dua fase cairan yang tidak tercampur tetapi cairan yang satu terdispersi dengan baik dalam cairan yang lain dalam bentuk butiran (droplet/globula) dengan diameter umumnya lebih dari 0,1  $\mu\text{m}$  atau 0,1-50  $\mu\text{m}$ . Fase yang berbentuk butiran disebut fase terdispersi atau fase internal atau disebut juga fase diskontinyu, sedangkan fase cairan tempat butiran terdispersi disebut fase pendispersi. Dispersibilitas atau daya larut emulsi ditentukan oleh medium dispersinya. Bila medium dispersinya air, emulsinya dapat diencerkan dengan air, dan sebaliknya bila medium dispersinya lemak, emulsinya dapat diencerkan dengan minyak atau lemak. *Emulsifier* merupakan zat

yang digunakan untuk membantu menjaga kestabilan emulsi minyak dan air. Umumnya emulsifier merupakan senyawa organik yang memiliki dua gugus, yaitu gugus hidrofilik (polar) dan lipofilik (non-polar) sehingga kedua zat tersebut dapat bercampur.

### 2.14 Molecular Sieve

*Molecular sieve* adalah materi sintetis dari golongan aluminium silikat dengan bentuk bulat, memiliki banyak pori kecil yang berukuran seragam serta memiliki kemampuan menyerap gas ataupun cairan hingga 22% massanya. *Molecular sieve* secara umum dapat dibagi atas dua tipe yakni tipe A ( $\text{AlO}_4$ ) dan tipe X ( $\text{SiO}_4$ ) kemudian berdasar kemampuan absorpsinya *molecular sieve* dibedakan menjadi 5 tipe yaitu tipe 3Å, 4Å, 5Å, 8Å, dan 10Å seperti yang tertera pada Table 2.4

**Tabel 2.4 Molekular sieve**

Tipe molecular sieve	Ukuran pori	Aplikasi
3A	3Å	Untuk menyerap $\text{H}_2\text{O}$ , bagus untuk pengeringan pelarut polar
4A	4Å	Untuk menyerap $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CO}_2$ , $\text{SO}_2$ , $\text{H}_2\text{S}$ , bagus untuk mengeringkan pelarut- pelarut non-polar
5A	5Å	Untuk menyerap senyawa hidrokarbon rantai lurus
10X	8Å	Untuk menyerap senyawa hidrokarbon rantai cabang
13X	10Å	Untuk menyerap di-n-butil

[Fieser, L.f.dan Fieser, M.1967]

*molecular sieve* merupakan suatu absorben sintetis berbentuk pellet yang dapat secara selektif mengikat molekul air. Selain murah harganya, *molecular sieve* yang telah terpakai juga dapat dipakai kembali setelah dikeringkan (E Sitompul, 2010)

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Alat dan Bahan

##### 3.1.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah :

- Tabung centrifuge
- Labu leher tiga
- Erlenmeyer
- Tabung reaksi
- Labu ukur
- Pipet ukur
- Kertas saring
- *Syringe* 0,4 mm
- *Rotatory evaporator*
- *Shaker*
- *Magnetic stirrer*
- Mikroskop
- FT-IR (SHIMADZU)

##### 3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah

1. Enzim lipase PA, *Candida rugosa* yang didapatkan dari Sigma-Aldrich Corporation. Enzim memiliki aktivitas spesifik 2,45U/mg.
2. Bahan Kimia yang digunakan pada percobaan ini adalah minyak kelapa sawit, glukosa, KOH, asam lemak, HCl, *molecular sieve*, n-heksan, zat warna eosin, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, KBr, Na-alginat, NaOH, Aseton, CaCl<sub>2</sub>, Tris buffer, dan Phenolphthalein

## 3.2 Prosedur Penelitian

### 3.2.1 Hidrolisis Triglierida dari Minyak Sawit

Hidrolisis trigliserida dilakukan untuk mendapatkan asam lemak yang terdapat dalam minyak kelapa sawit. Reaksi hidrolisis triglierida dilakukan dengan menggunakan larutan basa KOH sebagai katalis. Sebanyak 20 gram minyak kelapa sawit dimasukkan ke dalam labu bulat leher tiga dan ditambahkan 100 mL KOH 1M dalam alkohol 95%. Campuran ini kemudian dipanaskan dengan sistem refluks selama 1 jam pada suhu  $62^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dan ditambahkan 50 mL aquades. Campuran kemudian ditambahkan 35 mL HCl 3N dan diekstrak dengan n-heksana 50 mL ( untuk memisahkan lapisan atas dari lapisan bawah ).

Pada lapisan atas ditambahkan 1 gram  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Setelah itu larutan di dekantasi untuk memisahkan padatan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . N-heksana dalam asam lemak diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  hingga filtrat pekat (Ika Novianingsih, 2011). Filtrat yang diperoleh merupakan asam lemak hidrolisat yang akan digunakan sebagai substrat pada percobaan selanjutnya.

### 3.2.2. Immobilisasi Lipase dalam Ca-Alginat

Immobilisasi lipase dalam Ca-alginat dilakukan dengan menambahkan 2 mL lipase ke dalam 8 mL Na-alginat dengan rasio berat antara enzim dan Na-alginat (1:8). Campuran diaduk secara merata dengan *magnetic stirrer* pada suhu kamar. Selanjutnya campuran larutan Na-alginat dan lipase dimasukkan ke dalam 10 mL  $\text{CaCl}_2$  0,05M sedikit demi sedikit menggunakan *syeringe* 0,4 mm sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* secara perlahan hingga terbentuk butiran-butiran enzim imobil. Campuran diinkubasi selama 20 menit, lalu enzim imobil yang terbentuk dipisahkan dengan cara menyaring campuran tersebut menggunakan kertas saring. Enzim imobil kemudian dicuci dengan

larutan 0,05M buffer Tris-HCl pH 7,2 sebanyak 2 kali (Keehoon Won, *et al.* 2005). Untuk mendapatkan kondisi proses imobilisasi lipase optimum dilakukan penentuan persen *loading* dan efisiensi imobilisasi dengan konsentrasi Na-alginat 1%, 1,5%, dan 2% (w/v).

### 3.2.2.1 Persen *Loading*

Banyaknya enzim yang terperangkap dalam matriks alginat (% *loading*) dapat ditentukan menggunakan metode Lowry. Sebanyak 0,5 mL filtrat dan larutan awal alginat dan lipase ditambahkan ke dalam 5 mL preaksi Lowry C, lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan Folin dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali dikocok. Campuran diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 700 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi (banyaknya) protein enzim yang terimobilisasi dapat diketahui dengan memasukkan data absorpsi sampel (filtrat sisa imobilisasi enzim dan campuran awal alginat dan enzim (1:8)) ke dalam persamaan linear kurva standar protein. Larutan standar protein yang digunakan adalah larutan *bovine serum albumin* (BSA) pada berbagai konsentrasi (Lowry., *et al.*, 1951):

$$\text{loading efficiency (\%)} = \left( \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

$C_i$  = konsentrasi alginat dan enzim mula-mula

$V_i$  = Volume larutan mula-mula

$C_f$  = konsentrasi filtrat

$V_f$  = volume filtrat

### 3.2.2.2. Efisiensi Immobilisasi

Efisiensi immobilisasi adalah rasio aktivitas spesifik lipase imobil dan lipase bebas (*free lipase*). Aktivitas enzim diukur dengan metode titrimetrik. (Keehoon Won, *et al.* 2005)

$$\text{immobilization efficiency (\%)} = \left( \frac{\alpha_{\text{imob}}}{\alpha_{\text{free}}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

$\alpha_{\text{free}}$  = aktivitas enzim bebas

$\alpha_{\text{imob}}$  = aktivitas enzim imobil

### 3.2.3 Uji Aktivitas Lipase dengan Metode Titrimetrik

Uji aktivitas lipase dilakukan dengan mencampurkan 0,425 mL minyak kelapa sawit dan 7,65 mL buffer Tris HCl (pH 7,2) dengan bantuan 0,5 gram gum Arabic sebagai *emulsifier*, kemudian menambahkan 1,5 mL enzim (10 mg/mL). Campuran di *shaker* pada temperatur 30°C dengan kecepatan 100 rpm. Enzim diinaktifkan dengan penambahan larutan aseton:alkohol (1:1), kemudian dititrasi dengan NaOH 0,05 N dengan menambah 2-3 tetes *phenolphthalien* 1% sebagai indikator. Aktivitas lipase ditunjukkan dengan perubahan warna (Nanik Sugiharni, 2010). Penghitungan aktivitas lipase dilakukan dengan rumus berikut:

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

Keterangan :

Satu unit aktivitas lipase adalah banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis minyak menghasilkan 1  $\mu$  mol produk selama 1 jam.

A : Volume NaOH untuk titrasi sample (mL)

B : Volume NaOH untuk titrasi blanko (mL)

N.NaOH : Normalitas NaOH yang digunakan

1000 : Faktor konversi dari mmol menjadi  $\mu$  mol

W : Berat minyak (mg)

60 : Waktu inkubasi (menit)

Setelah diperoleh aktivitas hidrolisis lipase, maka aktifitas spesifik enzim dengan persamaan:

$$\text{aktivitas spesifik} = \frac{\text{aktifitas hidrolisis lipase}}{\text{mg protein}} \quad (3.4)$$

#### 3.2.4. Reaksi Esterifikasi dengan Enzim Imobil

Sintesis ester glukosa dilakukan dengan cara mencampurkan glukosa, hidrolisat asam lemak, dan n-heksana dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan 1 gram enzim lipase imobil. Campuran di inkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 200 rpm. Optimasi reaksi esterifikasi dilakukan pada beberapa parameter yaitu suhu, waktu, rasio, dan banyaknya *molecular sieve*:

- Optimum suhu dengan variasi suhu 30°C; 35°C; 37°C; dan 40°C dengan kondisi rasio mol glukosa : asam lemak (1:60), waktu inkubasi selama 4 jam dan *molecular sieve* yang digunakan sebanyak 0,1 g
- Optimasi waktu inkubasi dengan variasi waktu 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 40 ; 64 pada suhu 35°C, rasio mol glukosa : asam lemak (1:60), dan *molecular sieve* 0,1 g
- Optimasi rasio mol substrat dengan variasi rasio mol substrat (glukosa:asam lemak) 1:12 ; 1:30 ; 1:60 ; dan 1:90 dengan penambahan 0,1 g *molecular sieve* pada suhu 35°C di inkubasi selama 40 jam.
- Optimasi banyaknya *molecular sieve* yang dibutuhkan dengan cara menambahkan *molecular sieve* ukuran 3 Å dengan konsentrasi yang

bervariasi mulai dari 0 ; 0,1 ; 0,4 ; 0,7 gram *molecular sieve* pada suhu 35°C selama 40 jam dengan rasio mol glukosa : asam lemak (1:60),

### 3.2.5. Penentuan Kadar konversi Asam Lemak

Untuk menentukan persen konversi asam lemak pada reaksi esterifikasi ini digunakan metode titrimetri. Titrasi dilakukan setelah reaksi esterifikasi dihentikan dengan cara pemanasan dalam penangas air selama 5 menit. Campuran dititrasi dengan menggunakan larutan titran NaOH 0,1M dan indikator *phenolphthalein*. Perhitungan konversi asam lemak dapat dilakukan dengan cara:

$$\% \text{ konversi} = \frac{(V_1 - V_2) \times [NaOH] \times 100\%}{\text{mol asam lemak}} \quad (3.5)$$

$V_1$  = Volume NaOH blanko

$V_2$  = Volume NaOH sampel ( Jiugao Yu, 2007)

### 3.2.6. Reaksi Esterifikasi dengan *Free Enzim*

Reaksi esterifikasi dengan free enzim dilakukan dengan perbandingan rasio mol substrat glukosa : asam lemak hidrolisat (1:60) dan 0,1 *molecular sieve* pada suhu 30°C selama 5 jam dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Jumlah enzim yang ditambahkan adalah 5% dari berat total substrat. Reaksi esterifikasi dihentikan dengan memanaskan campuran dalam penangas air selama beberapa menit.

Kemudian hasil esterifikasi disentrifug selama 5 menit. Mengambil cairan pada lapisan tengah lalu diuapkan pada suhu  $\pm 60^\circ\text{C}$  untuk menguapkan n-heksan yang terbawa.

### 3.2.7. Identifikasi Produk

Untuk mengetahui adanya gugus ester langkah pertama yang dilakukan adalah karakterisasi produk esterifikasi dengan menggunakan FT-IR, Identifikasi gugus fungsi juga dilakukan pada glukosa dan asam lemak hidrolisat.

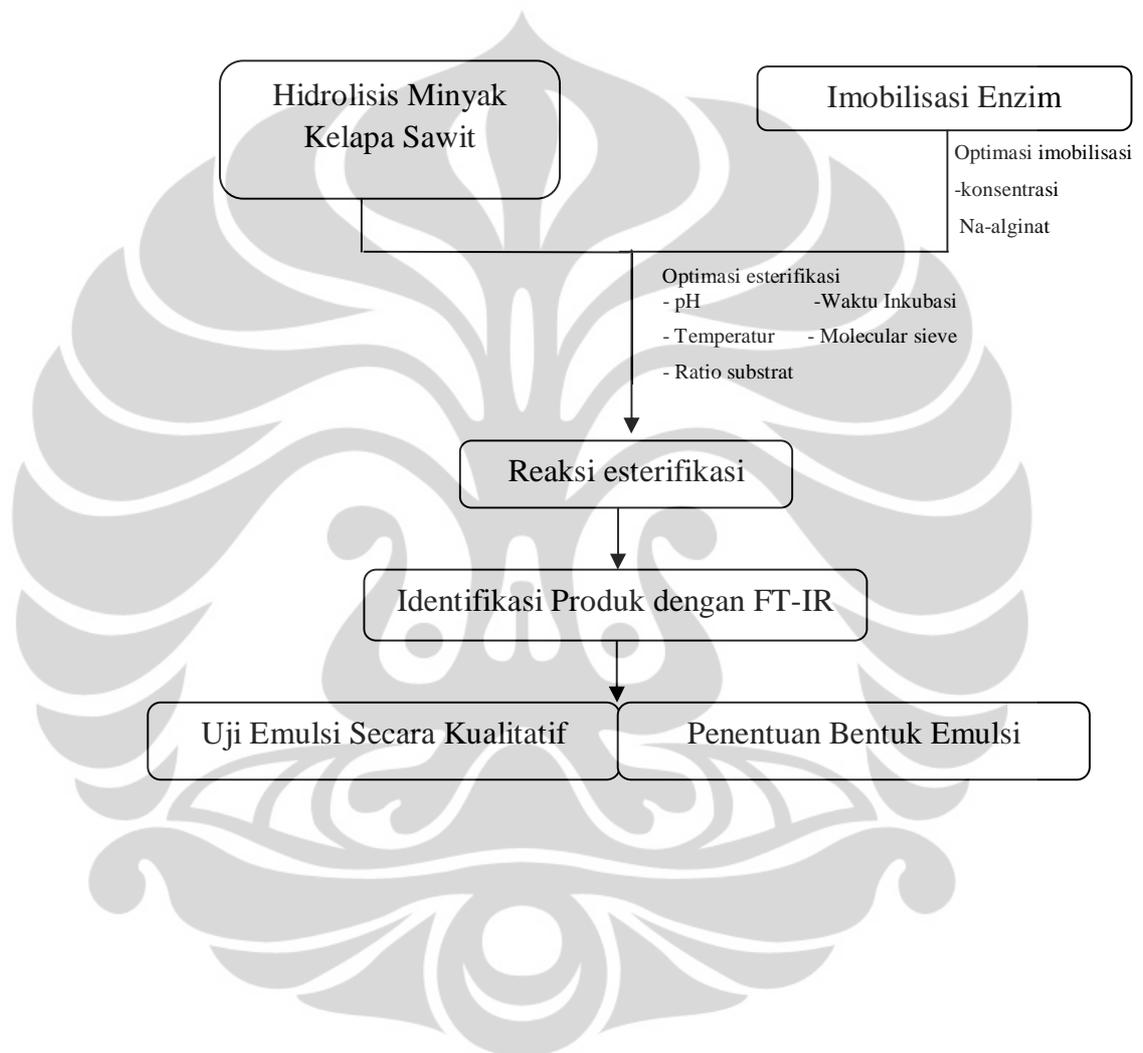
Pada analisa dengan instrumen FT-IR ini dilakukan penataan khusus berdasarkan bentuk sampel. Untuk sampel yang berbentuk padat harus dibuat pellet dengan mencampurkan sampel dalam KBr, untuk sampel cair, sampel dibuat menjadi lapisan tipis yang diletakkan diantara celah dua lempeng NaCl yang di letakkan berhimpitan. Pengukuran glukosa, asam lemak minyak sawit, dan produk esterifikasi dilakukan dengan mencampurkan sampel kedalam KBr, hal ini disebabkan pada suhu ruang glukosa, asam lemak minyak sawit, dan produk esterifikasi berwujud padat

### 3.2.8. Uji Emulsi Ester Glukosa Hasil Sintesis secara Kualitatif

Untuk mengetahui apakah produk ester glukosa sudah terbentuk, dilakukan uji aktifitas produk sebagai emulsifier. Uji emulsi secara kualitatif dilakukan dengan cara memasukkan  $\pm 3\text{mL}$  aquades 5 tetes minyak masing-masing ke dalam dua tabung yang berbeda. Selanjutnya produk hasil sintesis yang diperoleh ditambahkan kedalam salah satu tabung reaksi. Kedua tabung dikocok, diamati perubahan yang terjadi, dan dibandingkan hasil yang diperoleh dari tabung satu dan dua

Penentuan jenis emulsi dilakukan dengan cara meneteskan cairan emulsi yang telah terbentuk di atas *object glass*/ kaca preparat yang dicampurkan dengan satu tetes zat warna eosin. Selanjutnya preparat tersebut diamati dibawah mikroskop dan ditentukan jenis emulsinya.

### 3.7.9. Bagan Kerja Secara Umum



## BAB 4 PEMBAHASAN

### 4.1 Hidrolisis Triglicerida

Reaksi hidrolisis pada penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan asam lemak bebas dari minyak kelapa sawit. Asam lemak bebas yang diperoleh selanjutnya akan digunakan sebagai substrat dalam reaksi sintesis ester glukosa dengan katalis lipase *Candida rugosa*.

Pada dasarnya hidrolisis minyak kelapa sawit dengan katalis basa merupakan reaksi *irreversible* (Suprihastuti Sri Rahayu, 2005). Hidrolisis triglicerida menggunakan katalis basa dilakukan dengan cara mencampurkan minyak kelapa sawit dan KOH 1M dalam alkohol 95% kedalam labu leher tiga. Campuran ini kemudian dipanaskan dengan sistem refluks selama 1 jam pada suhu  $62\pm 2^{\circ}\text{C}$  sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* seperti yang terlihat pada gambar 4.1:

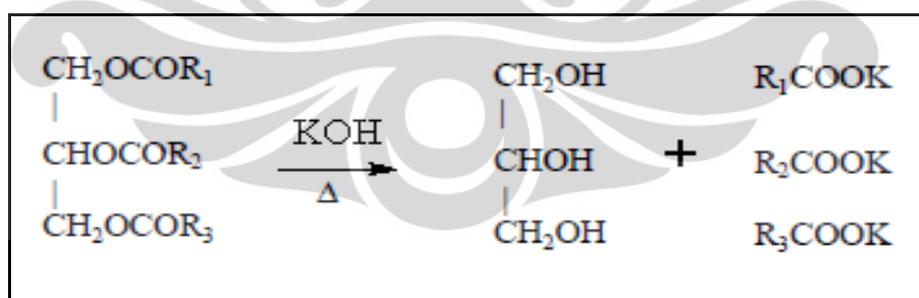


**Gambar 4.1 : Sistem refluks**

Katalis basa yang digunakan dalam reaksi hidrolisis triglicerida ini adalah KOH dalam alkohol 95%. Penggunaan KOH sebagai katalis basa untuk reaksi saponifikasi akan menunjukkan hasil yang lebih baik karena sifat kalium yang lebih reaktif dan mudah membentuk garam asam lemak jika dibandingkan dengan NaOH. Kalium dan natrium berada dalam satu golongan pada tabel periodik, yaitu

golongan IA. Akan tetapi keduanya memiliki nomor atom yang berbeda. Nomor atom kalium adalah 19 dan natrium 11. Semakin besar ukuran atom, semakin jauh jarak elektron valensi dari nukleus, sehingga elektron terluar dari atom akan menjadi semakin mudah untuk dilepas. Oleh karena itu kalium membutuhkan energi yang lebih kecil untuk mengeluarkan elektron yang pertama /terluar dari atom dibandingkan dengan natrium. Energi ionisasi yang dibutuhkan natrium sebesar 496 kJ/mol dan energi ionisasi kalium 419 kJ/mol.

Adanya alkohol dalam KOH dapat membantu KOH untuk memutuskan ikatan-ikatan trigliserida dan membentuk garam kalium dari asam lemak lebih cepat jika dibandingkan dengan alkali dalam aquades. Kepolaran etanol yang bersifat semi polar dapat membantu menurunkan perbedaan kepolaran antara KOH yang bersifat polar dan minyak yang bersifat non-polar. Dengan kepolaran etanol yang berada diantara minyak dan KOH, baik minyak maupun KOH dapat larut dalam etanol. Dengan demikian kemungkinan terjadinya interaksi antara KOH dengan minyak kelapa sawit akan lebih besar di bandingkan dengan KOH dalam air. Triasilgliserol mempunyai berat molekul dan titik didih yang tinggi sehingga. dibutuhkan suhu yang tinggi untuk memutuskan ikatan-ikatan triasilgliserol (Hasnisa bin Hashim, 2008). Oleh karena itu pada percobaan ini proses hidrolisis dilakukan dengan pemanasan pada suhu  $62 \pm 2^\circ\text{C}$ . Reaksi hidrolisis yang terjadi adalah seperti yang terlihat pada Gambar 4.2:

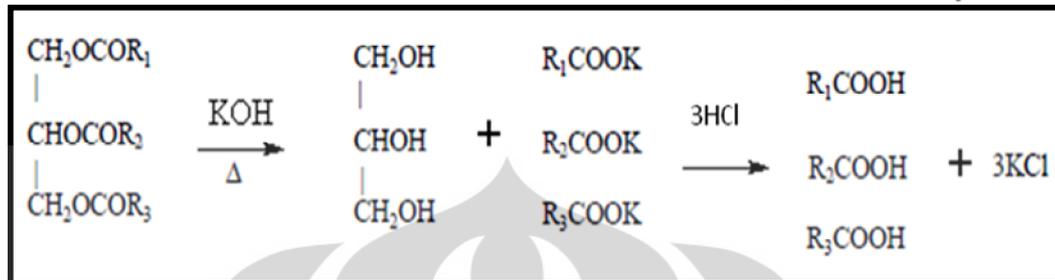


[Sumber Ika Novianingsih 2011]

**Gambar 4.2 : Reaksi saponifikasi**

Setelah pemanasan ke dalam sistem reaksi ditambahkan aquades kemudian campuran diasamkan dengan penambahan HCl 3N dalam jumlah tertentu lalu

campuran diekstrak menggunakan n-heksan. Secara keseluruhan reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 4.3 :



[Sumber Ika Novianingsih, 2011]

**Gambar 4.3 : Reaksi hidrolisis trigliserida**

Penambahan aquades bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar, karena selain menghasilkan asam lemak, reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit juga menghasilkan garam dan gliserol. Gliserol memiliki sifat yang mudah larut dalam air, maka gliserol yang terbentuk dapat dianggap langsung berpindah ke fasa air (Suprihastuti Sri Rahayu, 2005). Penambahan n-heksan bertujuan untuk menarik asam lemak yang telah dibebaskan, karena asam lemak dapat larut dalam n-heksan. Oleh karena itu ketika campuran di ekstrak akan terbentuk 2 fasa yaitu fasa n-heksan (non-polar) pada bagian atas dan fasa air (polar) pada bagian bawah seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.4:



**Gambar 4.4 Hasil ekstraksi asam lemak dari minyak kelapa sawit**

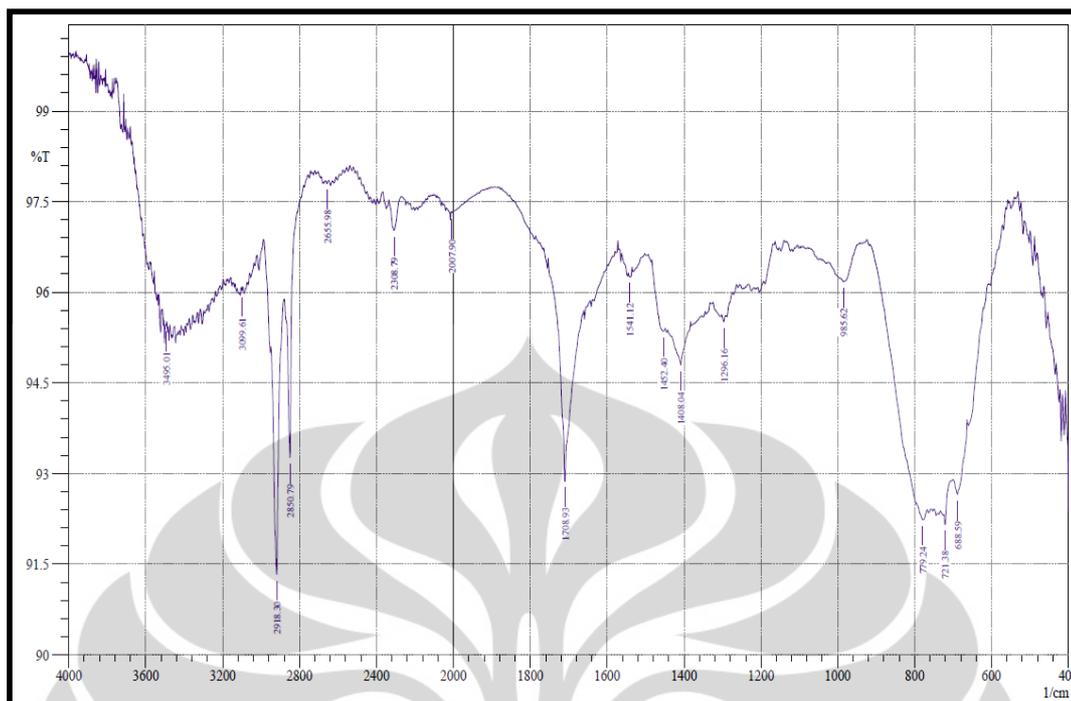
Fasa organik yang diperoleh dipisahkan dalam beaker glass dan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat untuk menarik air yang mungkin terbawa. Untuk memisahkan n-heksan dengan asam lemak, n-heksan diuapkan menggunakan rotator evaporator hingga filtrat pekat. Asam lemak hasil hidrolisis yang diperoleh berwarna kuning terang dan ketika dingin pada suhu ruang, asam lemak bebas hasil hidrolisis berwujud padat dan berwarna putih agak kekuningan.

Dua asam lemak yang dominan dalam minyak kelapa sawit adalah asam palmitat dan asam oleat. Asam palmitat merupakan asam lemak jenuh berantai panjang ( $\text{C}_{16}:0$ ) dan memiliki titik cair yang cukup tinggi yaitu  $64^\circ\text{C}$ , dan asam oleat memiliki titik cair  $14^\circ\text{C}$ . Oleh karena itu asam lemak bebas yang diperoleh dari reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit berupa padatan yang lunak sebanyak 18,12 gram atau sekitar 90,6% dari berat minyak kelapa sawit mula-mula. Asam lemak hasil hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 4.5



**Gambar 4.5 Asam lemak hidrolisis**

Asam lemak bebas hasil hidrolisis minyak kelapa sawit yang diperoleh berbentuk pasta seperti yang terlihat pada Gambar 4.6. Asam lemak hidrolisis kemudian diidentifikasi gugus-gugus fungsinya dengan menggunakan FT-IR. Data spectrum FT-IR dari asam lemak hidrolisis tertera pada Gambar 4.6:



**Gambar 4.6** Spektrum FT-IR asam lemak hidrolisat

**Tabel 4.1** Identifikasi gugus fungsi spektrum IR asam lemak hidrolisat

Identifikasi Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bilangan Gelombang yang teridentifikasi ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H	3400-2400	2850.79
		3099.61
CH <sub>3</sub>	2950-2800	2918.30
CH <sub>2</sub>		2850.79
CH		
C=C	~1600 & ~1475	1541.12
C=O (asam karboksilat)	1730-1700	1708.93
C-O	1320-1210	1296.16

Berdasarkan data spektrum yang diperoleh, terdapat pita serapan yang tajam pada bilangan gelombang 2918,30 dan 2850,79  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan serapan untuk golongan rantai karbon dari asam lemak. Hasil analisis dari

Laboratorium Analisis dan Kalibrasi Balai Besar Industry Agro menunjukkan bahwa kandungan asam lemak tertinggi dalam minyak sawit yang digunakan adalah asam lemak dengan rantai karbon yang panjang, yaitu asam palmitat dengan (C16:0) dan asam oleat dengan (C 18:1). Oleh karena itu serapan untuk ikatan -CH dalam -CH<sub>2</sub> dan -CH<sub>3</sub> memiliki serapan yang tinggi. Dari data spectrum di atas juga teridentifikasi adanya ikatan rangkap C=C pada panjang gelombang 1541,12 cm<sup>-1</sup> yang menandakan bahwa pada asam lemak hidrolisat yang diperoleh dari hasil hidrolisis terdapat asam lemak tak jenuh seperti asam oleat, asam linoleat, dan asam linolenat. Pada bilangan gelombang 1708,93 cm<sup>-1</sup> menunjukkan serapan untuk C=O

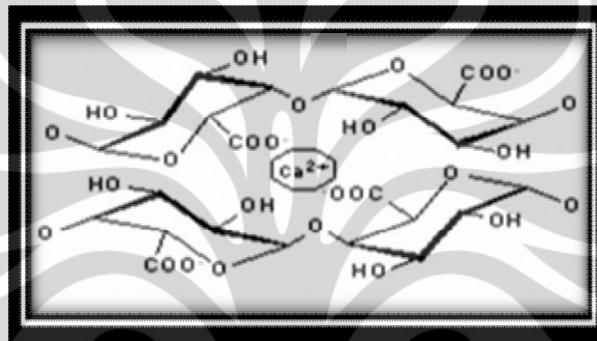
#### 4.2 Immobilisasi Enzim

Alginat dapat membentuk gel apabila direaksikan dengan ion-ion divalen seperti Ca<sup>2+</sup>. Ion divalen Ca<sup>2+</sup> dipilih sebagai suport untuk immobilisasi enzim lipase tersebut karena ion Ca<sup>2+</sup> tidak bersifat inhibitor bagi enzim lipase tersebut. Hal ini dibuktikan dengan banyaknya penelitian yang menggunakan Ca-alginat sebagai matriks immobilisasi enzim lipase *Candida rugosa*, (Vilma Minovska., *et al*, 2004), (Keehoon Won., *et al*, 2005), (J.jeganathan., *et al*, 2006), (N. Sawangpanya., 2010).

Alginat dari sumber yang berbeda, baik secara genetik maupun lingkungan, memiliki komposisi monomer asam D-manuronat dan L-guluronat yang berbeda. Meningkatnya residu  $\alpha$ -L-guluronat dalam rantai alginat akan meningkatkan konsentrasi ion divalen yang digunakan. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi immobilisasi enzim dengan mencari konsentrasi Na-alginat yang optimum untuk menjebak enzim (persen *loading efficient*) dan memiliki aktivitas spesifik enzim yang besar (persen *immobilization yeld*) pada konsentrasi CaCl<sub>2</sub> yang dibuat tetap, yaitu pada 0,05M.

Langkah awal yang dilakukan untuk reaksi immobilisasi adalah mencampurkan enzim ke dalam masing-masing larutan Na-alginat 1% , 1,5%, dan 2% pada perbandingan alginat dengan enzim yaitu (1:8). Semakin tinggi konsentrasi alginat yang digunakan maka semakin kental pula larutan yang

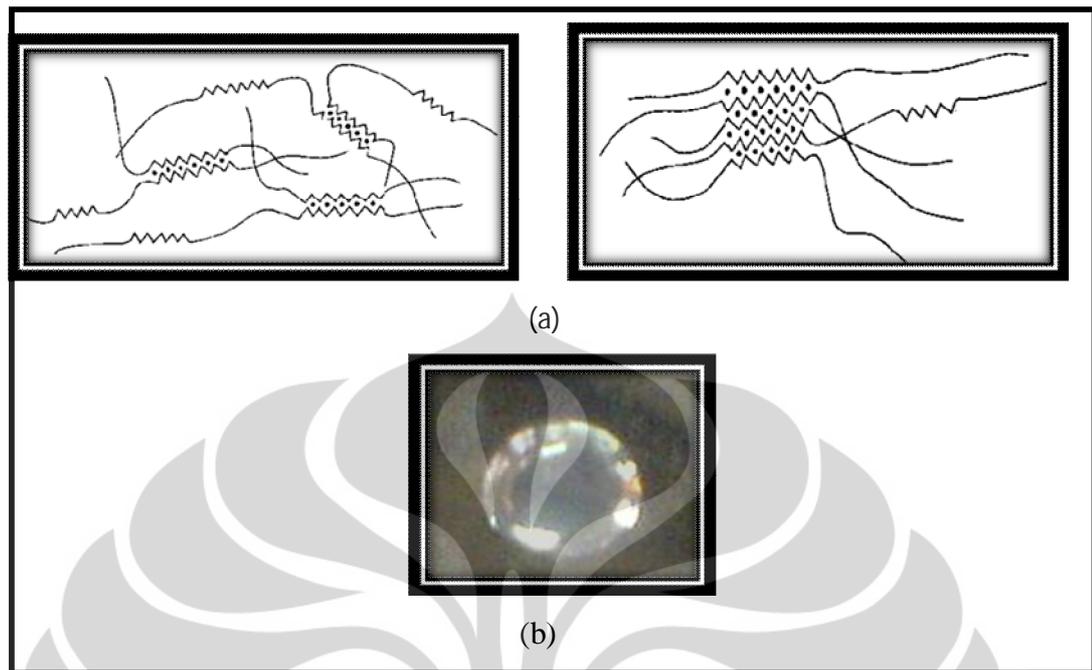
terbentuk. Proses selanjutnya adalah proses pembuatan gel yang dilakukan pada suhu kamar. Pada saat campuran homogen Na-alginat dan enzim diteteskan ke dalam larutan  $\text{CaCl}_2$ , akan terjadi interaksi antara ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan 5 ligan oksigen dari dua rantai alginat yang paralel yaitu gugus OH, pada atom C nomor dua, dan atom C nomor tiga, ikatan O yang menghubungkan 1-4 dan sebuah gugus karboksil serta cincin O dari residu tetangganya (Firdaus Sembiring, 2010). Ikatan yang terbentuk merupakan ikatan silang yang membentuk konformasi *egg-box* seperti yang terlihat pada Gambar 4.7:



[<http://www.springerimages.com>]

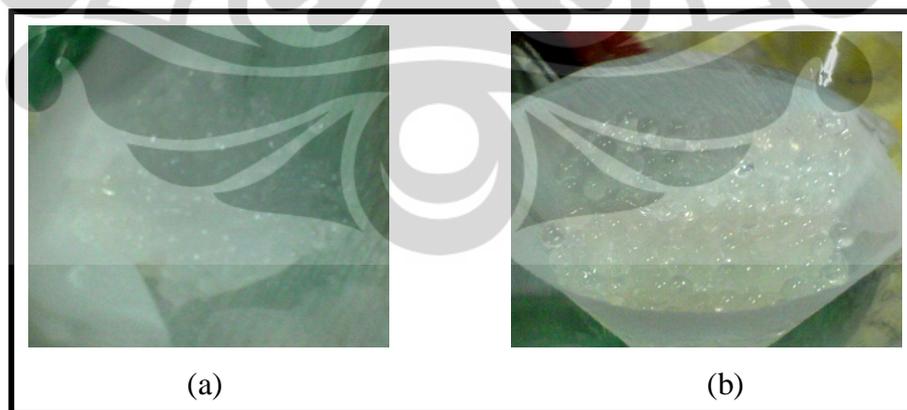
**Gambar 4.7: *Egg-box***

Proses penambahan campuran homogen Na-alginat dan enzim akan menghasilkan gel yang tidak homogen karena pada bagian permukaan gel yang terbentuk lebih kuat dan semakin ke dalam gel semakin lemah. Oleh karena itu pada percobaan ini gel yang telah terbentuk tidak langsung disaring melainkan diinkubasi terlebih dahulu dalam  $\text{CaCl}_2$  selama 20 menit untuk memberikan waktu bagi kalsium untuk berdifusi ke bagian dalam gel, seperti yang diilustrasikan pada Gambar 4.8:



**Gambar 4.8 (a)Ilustrasi metode entrapping (b)Enzim imobil**

*Beads* yang diperoleh tidak sama pada setiap konsentrasi Na-alginat, pada konsentrasi Na-alginat *beads* yang diperoleh berukuran lebih kecil dan rapuh jika dibandingkan dengan *beads* yang diperoleh pada konsentrasi Na-alginat 1,5% dan 2%, seperti pada Gambar 4.9:



Keterangan : (a) Bentuk enzim imobil yang diperoleh pada konsentrasi Na-alginat 1%  
(b) Bentuk enzim imobil yang diperoleh pada konsentrasi Na-alginat 2%

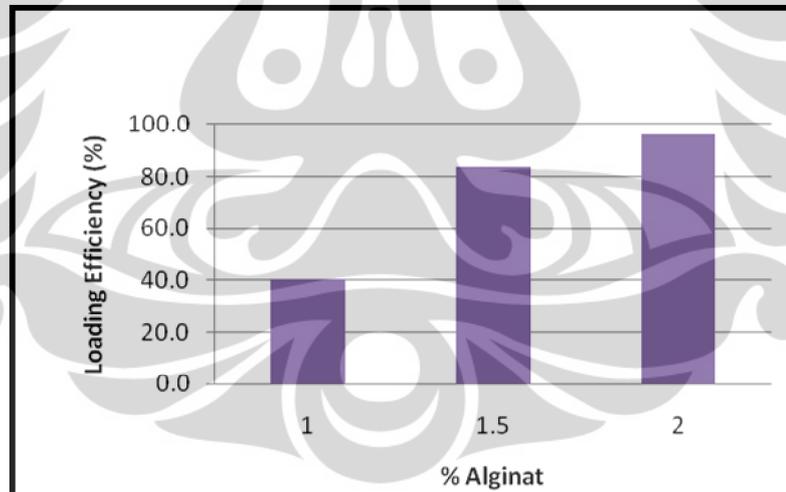
**Gambar 4.9. Enzim imobil**

### 4.2.1 Persen *Loading*

Untuk mengetahui berapa banyak enzim yang terjebak pada matriks alginat maka filtrat yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi Na-alginat ditentukan kadar protein enzim (persen *loading*) menggunakan metode Lowry. Data persen *loading* yang diperoleh dari percobaan ini dapat dilihat pada dilihat pada Tabel 4.2:

**Tabel 4.2** *Loading* enzim lipase

Konsentrasi Na-alginat (%)	Berat enzim mula-mula (gram)	Persen <i>loading</i> (%)
1	0,01	40,5
1,5	0,015	83,8
2	0,02	96,1



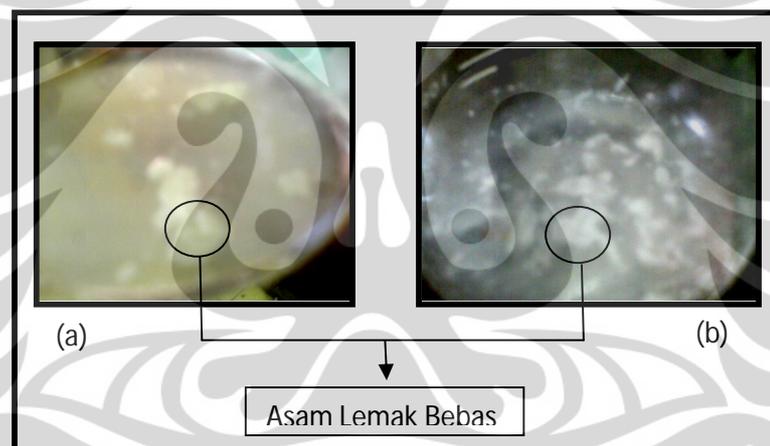
**Gambar 4.10:** Kurva *loading efficiency* enzim lipase

Dari percobaan ini banyaknya enzim yang terperangkap pada masing-masing matriks dengan konsentrasi alginat 1% , 1,5%, dan 2% berturut-turut adalah sebanyak  $\pm 2,56$  gram,  $\pm 3,99$  gram dan  $\pm 6,96$  gram. Semakin tinggi konsentrasi alginat maka semakin banyak enzim yang terperangkap hal ini diduga

karena semakin tingginya konsentrasi alginat semakin banyak konformasi *egg-box* yang terbentuk, sehingga enzim akan lebih sulit untuk lepas.

#### 4.2.2. Persen Effisiensi Immobilisasi

Persen efisiensi immobilisasi adalah perbandingan aktivitas spesifik antara enzim yang terimmobilisasi dengan enzim bebas. Aktivitas spesifik enzim dinyatakan sebagai banyaknya/unit aktivitas enzim per mg protein enzim. Penentuan aktivitas enzim ditentukan dengan menggunakan metode titrimetrik. Pengujian aktifitas hidrolisis minyak kelapa sawit secara enzimatik dilakukan pada suhu 30°C selama 1 jam. Gambar 4.11 memperlihatkan asam lemak bebas yang dihasilkan pada proses hidrolisis dengan menggunakan katalis enzim bebas dan enzim terimmobilisasi:



Keterangan: (a) Hasil hidrolisis dengan enzim bebas  
(b) Hasil hidrolisis dengan enzim terimmobilisasi

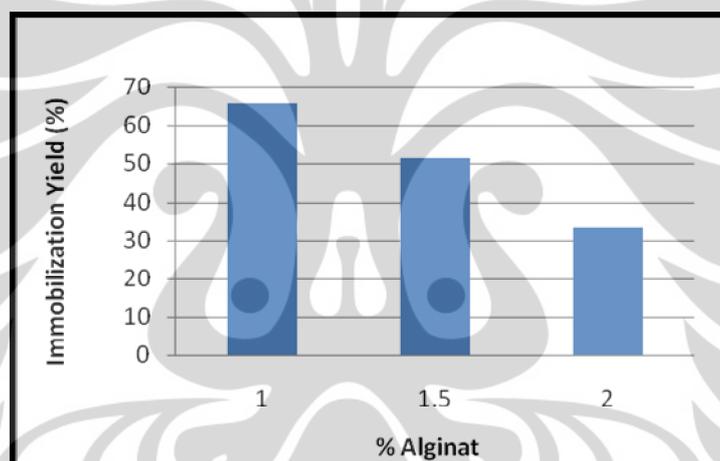
**Gambar 4.11 Hasil hidrolisis secara enzimatik**

Pada proses immobilisasi enzim dengan matriks alginat, enzim hanya terperangkap dalam matriks sehingga enzim masih dapat berinteraksi dengan substrat melalui pori yang terbentuk. Pada Tabel 4.3 terlihat semakin tinggi konsentrasi alginat, maka enzim yang terjebak (persen *loading*) semakin tinggi.

Akan tetapi aktivitas enzim yang dihasilkan semakin rendah. Hal ini terlihat dari persen efisiensi immobilisasi yang menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi Na-alginat. Data efisiensi immobilisasi yang berhasil diperoleh dari percobaan ini terdapat pada Tabel 4.3:

**Tabel 4.3 Efisiensi immobilisasi**

Konsentrasi alginat (%)	Persen efisiensi immobilisasi (%)	Aktivitas spesifik (U/mg protein enzim)
1	65,62	1,214
1,5	51,20	0,946
2	33,39	0,618



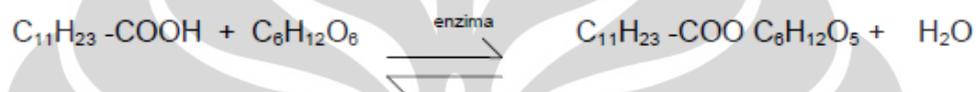
**Gambar 4.12: Kurva immobilization yield**

Turunnya persen efisiensi immobilisasi seiring dengan meningkatnya konsentrasi Na-alginat dimungkinkan karena teknik immobilisasi merupakan teknik yang membatasi difusi bebas sel atau enzim terimobil pada batas-batas tertentu. Pada immobilisasi enzim dengan metode penjebakan (*entrapping*) dapat menyebabkan substrat harus berdifusi ke dalam gel alginat untuk berinteraksi dengan enzim. Semakin besar konsentrasi alginat semakin besar *beads* yang terbentuk, sehingga substrat akan semakin sulit untuk berikatan dengan seluruh enzim dalam *beads*, dan jumlah mol substrat yang diubah oleh enzim pun akan

semakin sedikit. Sedangkan pada kondisi enzim bebas, substrat dengan mudah berinteraksi dengan pusat aktif enzim.

### 4.3 Reaksi Esterifikasi Menggunakan Enzim Imobil

Reaksi esterifikasi secara enzimatik menggunakan lipase *Candida rugosa* merupakan reaksi yang bersifat reversibel. Pada reaksi esterifikasi akan dihasilkan produk samping berupa air yang dapat mengubah kesetimbangan reaksi bergeser ke arah sebaliknya, yaitu reaksi hidrolisis seperti pada persamaan reaksi berikut :



Untuk itu dapat diupayakan agar kesetimbangan reaksi bergeser ke arah pembentukan ester, yaitu dengan menambahkan reaktan secara berlebih atau dengan menghilangkan air yang terbentuk (Yoo, *et al.* 2006).

Pada penelitian ini jumlah air diminimalisir dengan cara menambahkan *molecular sieve* tipe 3 Å ke dalam system reaksi esterifikasi. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa enzim untuk melakukan aktivitasnya sebagai katalis membutuhkan air dalam jumlah kecil yang biasa disebut dengan istilah air esensial. Jumlah air minimum yang diperlukan oleh suatu protein untuk mendapatkan konformasi alaminya hanya sekitar 50 % dari jumlah air yang diperlukan untuk membentuk selapis molekul air (*monolayer*) yang menutup permukaan protein enzim (Rupley *et al.* 1983). Bila air esensial tetap dapat dipertahankan pada molekul enzim, maka penambahan pelarut organik tidak akan mengganggu aktivitas enzim (Klibanov, 1986).

Reaktan berlebih yang dipilih dalam reaksi esterifikasi dengan menggunakan substrat glukosa ini adalah asam lemak minyak sawit. Asam lemak minyak sawit merupakan senyawa non-polar yang dapat larut dalam pelarut non-heksan. Hal yang perlu diperhatikan dalam memilih pelarut adalah tingkat perbedaan kepolaran pelarut dengan glukosa. Glukosa merupakan senyawa yang bersifat polar, sehingga semakin besar nilai log P suatu pelarut, maka perbedaan kepolaran antara glukosa dengan pelarut organik akan semakin tinggi, sehingga

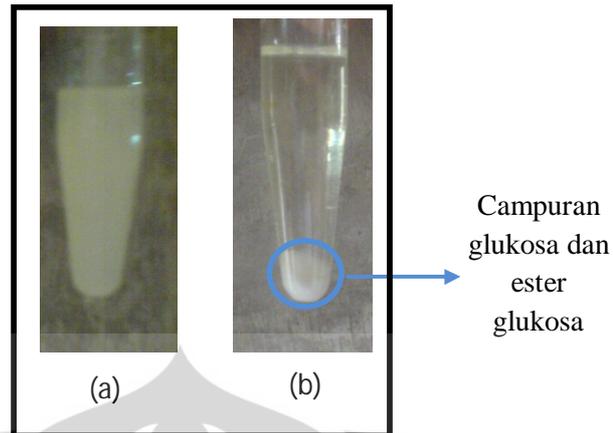
kemungkinan terjadinya kontak antara glukosa dengan asam lemak minyak sawit akan semakin kecil. Nilai P merupakan koefisien partisi dari 1-oktanol dan air yang menyatakan perbandingan antara konsentrasi komponen yang larut dalam n-oktanol terhadap konsentrasi komponen yang larut dalam air. Pemilihan pelarut organik yang digunakan adalah pelarut yang memiliki nilai  $2 < \log P < 4$ . Pelarut organik dengan nilai  $2 < \log P < 4$ , di antaranya adalah n-heksana, toluena, benzena, heptanol, dan oktanol. Pada penelitian sebagai pelarut digunakan n-heksana, karena pelarut ini memiliki nilai  $\log P = 3,5$

Volume n-heksana yang digunakan sebanding dengan volume total substrat 1 : 1 (v : v). Penggunaan pelarut n-heksana pada reaksi esterifikasi dengan katalis lipase dalam konsentrasi yang tinggi dapat mendehidrasi lipase, sehingga konsentrasi minimum air yang diperlukan enzim untuk mempertahankan konformasinya menjadi hilang.

Reaksi esterifikasi dilakukan dengan mencampurkan 1 gram enzim imobil, asam lemak, glukosa, dan *molecular sieve*. Reaksi esterifikasi dihentikan dengan cara pemanasan menggunakan penangas air dengan temperatur  $\pm 80^{\circ}\text{C}$ , yang bertujuan untuk mendenaturasi enzim sehingga enzim tidak dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi.

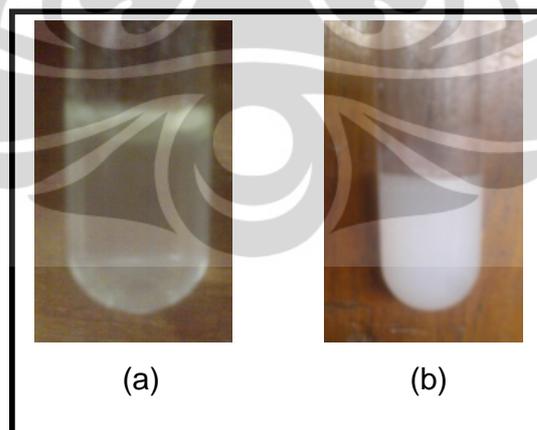
Hasil esterifikasi dengan menggunakan enzim yang terimmobilisasi dalam matriks alginat berbentuk satu fasa. Hal ini dimungkinkan karena air yang terdapat dalam campuran tidak hanya terserap oleh *molecular sieve* tetapi juga oleh matriks alginat. Alginat memiliki kemampuan untuk menyerap air karena alginat memiliki gugus COOH yang merupakan gugus hidrofilik (Kartini Zailanie, *et al.*, 2001).

Pada hasil reaksi campuran berwarna kuning keruh dan terdapat endapan putih. Hal yang sama juga terjadi pada blanko. Pada sampel jumlah endapannya lebih banyak karena endapan yang terbentuk merupakan endapan glukosa yang bercampur dengan produk esterifikasi seperti pada Gambar 4.13 (b). Ester glukosa asam lemak dan glukosa tidak larut dalam heksan dan berbentuk padatan halus berwarna putih.



**Gambar 4.13 (a) Hasil esterifikasi enzim imobil (b) Setelah di sentrifugasi**

Persen konversi untuk reaksi esterifikasi pada keadaan optimum adalah 6,09%. Kecilnya persen konversi dapat disebabkan oleh jumlah enzim yang terdapat pada matriks alginate lebih sedikit jika dibandingkan dengan reaksi esterifikasi menggunakan enzim bebas. Pada satu gram enzim imobil hanya terdapat 1,58 mg enzim. Untuk menguji apakah dalam system reaksi sudah terbentuk produk esterifikasi yang bersifat *emulsifier* maka dilakukan uji emulsi sederhana. Uji emulsi dilakukan dengan mencampurkan minyak kelapa sawit dan aquades dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian campuran di kocok dengan kuat, maka akan di peroleh hasil seperti pada Gambar 4.14:



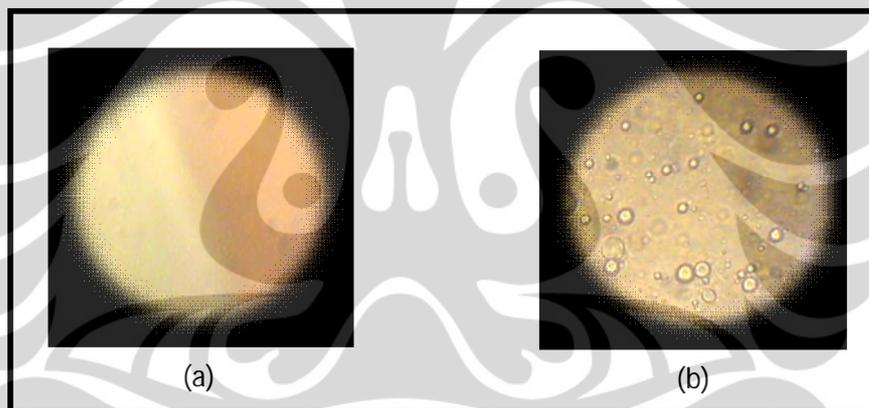
Keterangan: (a) Campuran sebelum ditambahkan produk hasil reaksi  
(b) Campuran setelah ditambahkan produk hasil reaksi

**Gambar 4.14 Campuran minyak dan air**

Universitas Indonesia

Pada tabung satu (a) sebelum ditambahkan produk hasil reaksi esterifikasi, campuran minyak dan air terlihat terpisah, sedangkan pada tabung kedua (b) campuran minyak dan air menyatu dan berubah warna menjadi putih. Dari hasil uji emulsi secara kualitatif, diduga produk yang terbentuk dari reaksi esterifikasi merupakan ester glukosa.

Penentuan jenis emulsi dapat dilakukan dengan cara menambahkan satu tetes eosin ke atas kaca preparat yang berisi tetesan campuran minyak dan air yang telah dicampur dengan produk yang diduga ester. Eosin merupakan zat warna yang dapat bercampur dengan air sehingga dapat digunakan sebagai indikator dalam menentukan jenis emulsi dari ester glukosa asam lemak yang terbentuk. Ketika campuran diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10 x 40, terlihat lingkaran-lingkaran bening agak kuning yang dikelilingi lapisan berwarna agak merah seperti pada Gambar 4.15:



Keterangan: (a) minyak dan air sebelum diberi produk dengan pembesaran 10x10

(b) Minyak dan air setelah diberi produk dengan pembesaran 10x40

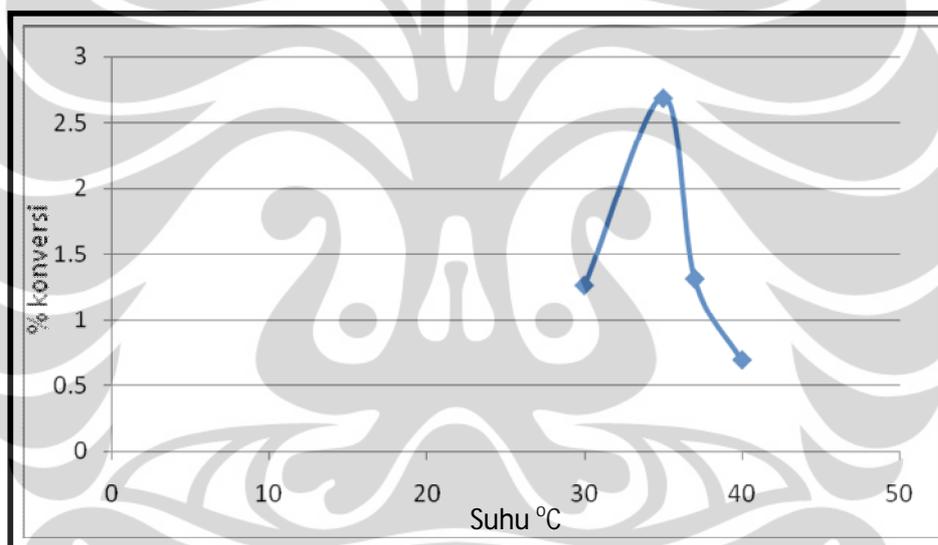
**Gambar 4.15 Campuran minyak dan air dilihat dari mikroskop**

Warna kuning pada *droplet-droplet* tersebut berasal dari minyak kelapa sawit yang berwarna kuning emas sedangkan lapisan luar yang mengelilingi *droplet* berwarna merah agak kekuningan. Hal ini menunjukkan adanya zat warna eosin terlarut dalam air yang terdapat dalam lapisan luar tersebut. Dari hasil uji ini menunjukkan bahwa jenis emulsi yang terbentuk berupa minyak dalam air (o/w),

dan produk yang dihasilkan pada reaksi esterifikasi ini diduga merupakan ester glukosa dengan sifat sebagai *emulsifier*.

#### 4.3.1 Optimasi Suhu Reaksi

Laju reaksi enzimatis seperti halnya reaksi lain dapat dipengaruhi oleh suhu. Variasi suhu yang digunakan adalah 30°C, 35°C, 37°C, dan 40 °C variasi suhu tersebut dipilih karena suhu optimum lipase pada umumnya berada pada kisaran 30°C - 40°C (Rikza Khafi Qudsiyyah, 2003) (Banu ÖZTÜRK, 2001). Dari hasil pengamatan didapatkan kurva optimasi suhu ditunjukkan pada Gambar 4.16 dan Tabel 4.4:



Gambar 4. 16. Grafik persen konversi terhadap suhu

Tabel 4.4. Data persen konversi dari variasi suhu reaksi esterifikasi

Suhu Reaksi ( °C )	Persen Konversi (%)
30	1,26
35	2,69
37	1,31
40	0,69

Dari Tabel 4.4 terlihat bahwa pada suhu reaksi esterifikasi di bawah 35°C, persen konversi ester glukosa sangat rendah yaitu 1,26 %. Hal ini karena molekul substrat belum memiliki cukup energi kinetik untuk terjadinya suatu reaksi berjalan dengan baik, sehingga reaksi berjalan sangat lambat. Pada suhu 35°C enzim pada kondisi paling aktif, dengan persen konversi mencapai 2,69%. Hal ini disebabkan adanya peningkatan suhu reaksi akan meningkatkan energi kinetik molekul sehingga frekuensi terjadinya tumbukan antar molekul meningkat. Selain itu viskositas sistem dan tegangan antar muka semakin berkurang sehingga mempercepat transfer massa substrat dan produk pada permukaan ataupun sisi dalam partikel enzim.

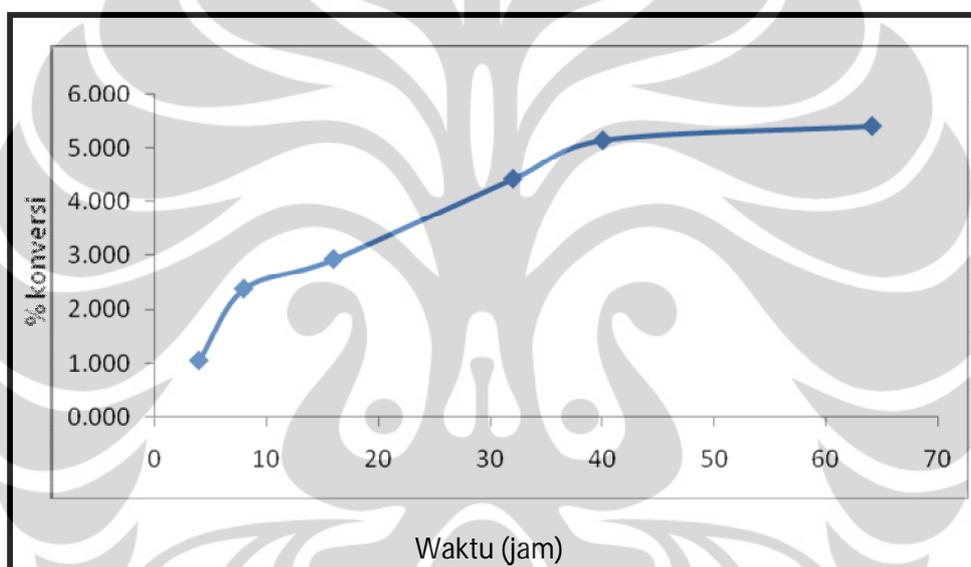
Kenaikan suhu di atas 35°C menyebabkan konversi substrat turun. Ini menunjukkan bahwa kenaikan suhu di atas suhu optimum dapat menyebabkan enzim kehilangan aktivitasnya. Pada suhu yang terlalu tinggi akan terjadi vibrasi dan gerakan molekul yang dapat mempengaruhi ikatan-ikatan hidrogen dan ikatan lain dalam struktur enzim dan menyebabkan enzim mengalami deformasi struktur tersier dan kuartier. Perubahan struktur protein enzim mengakibatkan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Pada Tabel 4.5 terlihat bahwa persen konversi menurun drastis dari 2,69% pada 35°C menjadi 1,31% pada 37°C.

#### **4.3.2 Optimasi Waktu Inkubasi**

Waktu reaksi adalah waktu yang dibutuhkan enzim untuk berikatan dengan substrat, Variasi waktu yang digunakan untuk mendapatkan reaksi esterifikasi yang optimum adalah 4; 8; 16; 32; 40; dan 60 jam:

**Tabel 4.5 Data persen konversi dari variasi waktu inkubasi**

Waktu Reaksi (jam)	Persen Konversi (%)
4	1,98
8	2,37
16	2,93
32	4,42
40	5,14
60	5,40

**Gambar 4.17 Grafik persen konversi terhadap waktu inkubasi**

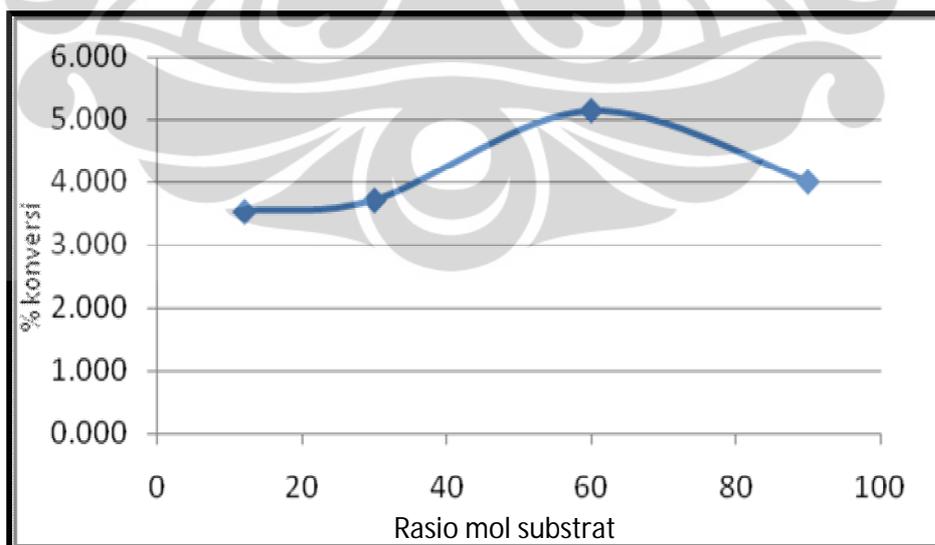
Gambar 4.17 menunjukkan bahwa dengan semakin bertambahnya waktu reaksi persen konversi substrat pun meningkat, hingga keadaan stimbang tercapai. laju awal esterifikasi berlangsung sangat tinggi yaitu pada kisaran 4 – 8 jam, akan tetapi setelah 40 jam, konversi substrat cenderung dalam kondisi yang konstan. Hal ini disebabkan karena laju reaksi sudah mencapai keadaan setimbang.

### 4.3.3 . Optimasi Rasio Mol Substrat (mol Glukosa : mol Asam Lemak)

Pada optimasi rasio mol substrat, substrat yang ditambahkan secara berlebih adalah mol asam lemak hidrolisat. Penambahan mol asam lemak hidrolisat secara berlebih dilakukan agar reaksi kesetimbangan bergeser ke arah pembentukan ester, karena dengan menambahkan reaktan berlebih reaksi akan bergeser ke arah pembentukan produk (Yoo., *et al*, 2006). Optimasi kondisi reaksi pada percobaan ini menggunakan variasi rasio mol substrat (mol glukosa: mol asam lemak hidrolisat) sebagai berikut 1:12 ; 1:30 ; 1:60 ; dan 1:90. Optimasi rasio mol substrat dilakukan pada kondisi suhu dan waktu optimum dari data yang diperoleh pada percobaan sebelumnya. Data yang diperoleh dari optimasi rasio mol substrat dapat dilihat pada Gambar 4.18 dan Tabel 4.6:

**Tabel 4.6 Data persen konversi dari variasi rasio mol substrat**

Rasio mol Substrat	Persen Konversi (%)
1:12	3,53
1:30	3,71
1:60	5,14
1:90	4,00



**Gambar 4.18. Grafik persen konversi terhadap rasio mol substrat ( Glukosa : Asam Lemak )**

Dari Tabel 4.6 terlihat bahwa semakin bertambahnya mol asam lemak hidrolisat yang ditambahkan maka semakin besar persen konversi yang diperoleh hingga perbandingan rasio mol substrat ( mol glukosa: asam lemak hidrolisat) 1:60. Hal ini dimungkinkan karena semakin banyak molekul substrat yang ditambahkan semakin banyak molekul yang memasuki tempat aktif enzim, hingga semua tempat aktif enzim telah ditempati oleh substrat. Segera setelah produk meninggalkan tempat aktif, molekul substrat yang lain akan masuk. Hingga pusat aktif enzim telah jenuh oleh substrat (Neil A. Cambel., *et al*, 2002). Pada rasio 1:90 terjadi penurunan persen konversi, hal ini mungkin disebabkan karena dengan bertambahnya jumlah mol asam lemak hidrolisat dapat menyebabkan pH lingkungan menjadi bertambah asam. Dengan bertambah asamnya pH lingkungan enzim maka struktur tersier dan kuartir protein enzim menjadi tidak stabil dan menyebabkan pecahnya ikatan ionik dan ikatan hydrogen (Sriyono Poerwanto., *et al*, 2010). Perubahan struktur protein enzim menyebabkan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya (terdenaturasi).

Penurunan persen konversi asam lemak juga dapat disebabkan oleh reaksi esterifikasi yang bersifat reversible, sehingga molekul air yang terbentuk dari reaksi esterifikasi dapat menggeser kesetimbangan ke arah pembentukan asam karboksilat (hidrolisis). Persen konversi akan menurun ketika jumlah asam lemak bertambah, karena persen konversi ditentukan sebagai banyaknya mol asam lemak yang digunakan untuk reaksi dibagi mol asam lemak mula-mula.

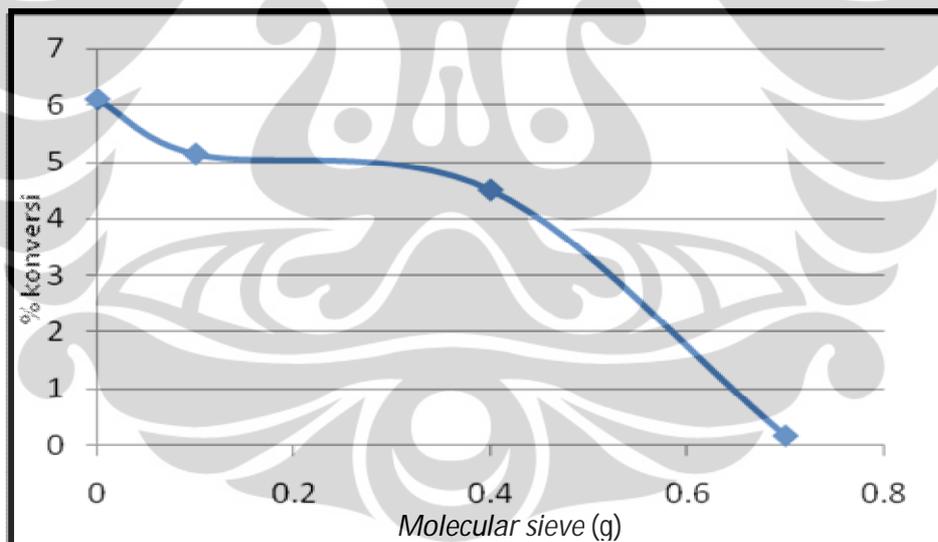
#### 4.3.4 Optimasi *Molecular Sieve*

Enzim yang kita gunakan pada penelitian kali ini adalah enzim lipase *Candida rugosa* yang terimobilisasi pada matriks alginate. Lipase dari *Candida rugosa* memiliki kemampuan dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis maupun esterifikasi. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi kebalikan esterifikasi sehingga tingkat hidrasi sistem reaksi antara asam lemak hidrolisat dan glukosa sangat mempengaruhi persen konversi esterifikasi. Dalam penelitian ini, *molecular sieve* digunakan untuk menyerap air yang kemungkinan terkandung dalam substrat

maupun yang terbentuk selama reaksi berlangsung. Hal ini dilakukan untuk mencegah kesetimbangan reaksi bergeser ke arah reaksi hidrolisis. Untuk mendapatkan reaksi esterifikasi yang optimum maka dilakukan uji terhadap variasi banyaknya *molecular sieve* yang ditambahkan yaitu. 0; 0,1; 0,4; 0,7 gram *molecular sieve*. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4.19 dan Tabel 4.7:

**Tabel 4.7 Persen konversi untuk *molecular sieve***

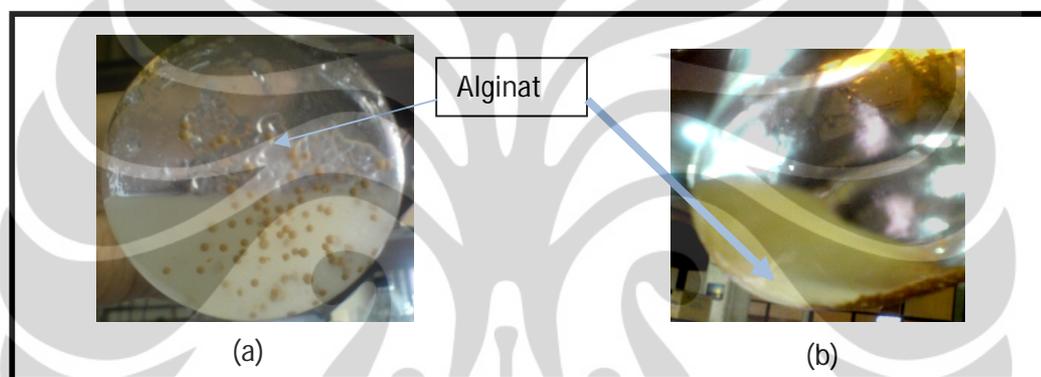
<i>Molecular sieve</i> (g)	Persen konversi (%)
0	6,09
0,1	5,14
0,4	4,50
0,7	0,16



**Gambar 4.19 Grafik persen konversi terhadap jumlah *molecular sieve***

Dari Gambar 4.19 terlihat bahwa semakin banyak *molecular sieve* yang ditambahkan menyebabkan persen konversi menjadi semakin menurun. Pada optimasi *molecular sieve* kondisi optimum dicapai ketika tidak dilakukan

penambahan *molecular sieve*. Hal ini mungkin dikarenakan pada reaksi esterifikasi ini enzim yang digunakan terimmobilisasi dalam matriks alginat. Matrik alginat yang digunakan memiliki kemampuan menyerap air, sehingga penambahan *molecular sieve* tidak menambah kecepatan reaksi. Bahkan penambahan *molecular sieve* yang berlebih dapat mengganggu kerja enzim, karena enzim masih membutuhkan air dalam jumlah sedikit untuk melakukan aktivitas katalitiknya, kurangnya jumlah air dapat menyebabkan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Selain itu dari pengamatan terlihat bahwa penambahan *molecular sieve* sebanyak 0,4 dan 0,7 gram membuat matriks alginat menjadi pecah dan hasil reaksi menjadi dua fasa (Gambar 4.20):

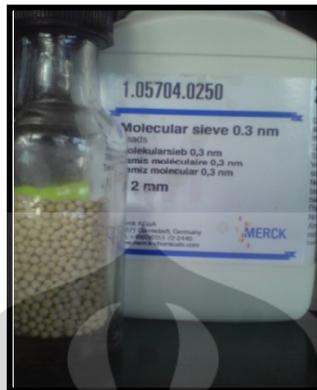


**Gambar 4.20 (a) Hasil Esterifikasi pada penambahan *molecular sieve* 0.1 gram (b) Penambahan *molecular sieve* 0.7 gram**

*Molecular sieve* yang digunakan adalah tipe  $3\text{\AA}$  yang memiliki kemampuan menyerap air dan mampu mengeringkan pelarut polar, sehingga diduga air yang terkandung dalam matriks alginat tertarik oleh *molecular sieve* sehingga menyebabkan beads dari alginat rusak.

Rusaknya matriks alginat diduga membuat enzim menjadi lepas. Enzim yang lepas memiliki kondisi optimum yang berbeda dengan enzim yang terimmobilisasi, enzim yang terimmobilisasi memiliki kestabilan yang lebih baik dibandingkan enzim bebas. Oleh karena itu turunnya persen konversi pada penambahan *molecular sieve* 0,4 dan 0,7 gram diduga karena enzim yang terlepas telah mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya. karena kondisi

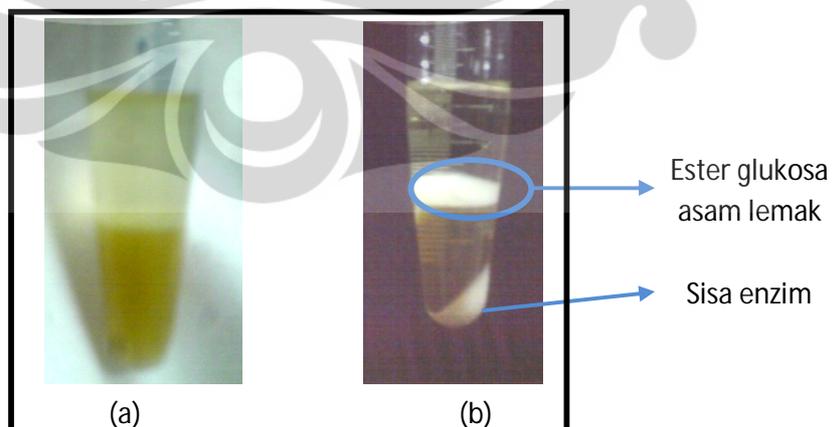
lingkungan yang tidak optimum Gambar 4.21 menunjukkan *molecular sieve* yang digunakan pada penelitian ini:



Gambar 4.21 *molecular sieve*

#### 4. 4 Reaksi Esterifikasi dengan Enzim Bebas

Untuk membuktikan bahwa enzim lipase *Candida rugosa* dapat digunakan untuk reaksi esterifikasi antara glukosa dengan asam lemak hidrolisat, dilakukan reaksi esterifikasi menggunakan enzim bebas dengan berat enzim 5% dari berat total substrat. Percobaan ini dilakukan karena jika yang digunakan enzim bebas dan tanpa penambahan *molecular sieve* diharapkan tidak ada air yang terserap sehingga air esensial yang dibutuhkan enzim dapat tercukupi. Setelah di sentrifugasi produk akhir reaksi membentuk tiga fasa karena terjadi pemisahan antara fasa non-polar, fasa polar, dan zat pengemulsi. Dari reaksi esterifikasi menggunakan enzim bebas diperoleh hasil esterifikasi seperti pada Gambar 4.22:



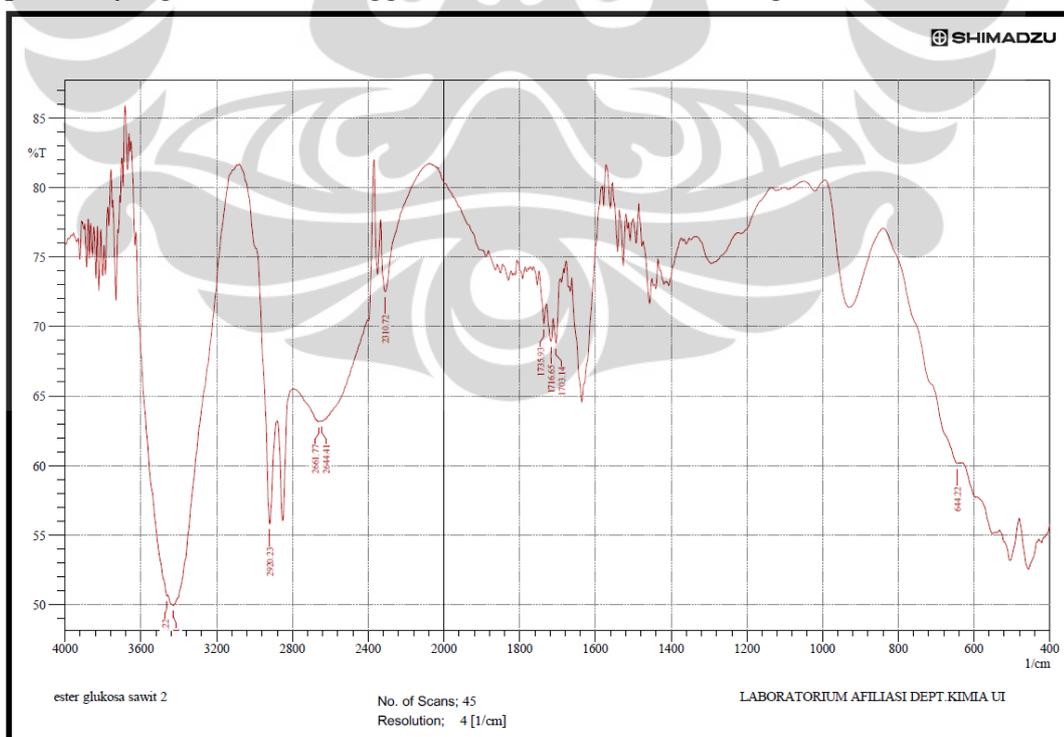
Keterangan: (a) hasil esterifikasi sebelum di sentrifugasi

(b) hasil esterifikasi setelah di sentrifugasi

Gambar 4.22 Hasil esterifikasi dengan free enzim

Setelah dilakukan sentrifugasi terbentuk 3 lapisan yaitu, fasa satu nonpolar (n-heksana) Hal ini terlihat dari fisik larutan berwarna kuning terang yang mengindikasikan bahwa larutan mengandung sisa asam lemak minyak sawit. Fasa tiga yang berada pada lapisan bawah merupakan fasa polar dan fasa dua yang berada dilapisan tengah di antara fasa nonpolar dan fasa polar yang berbentuk seperti padatan berwarna putih merupakan produk yang diduga *emulsifier* ester glukosa asam lemak. Berdasarkan massa jenis larutan diketahui bahwa massa jenis air lebih besar dari massa jenis n-heksana ( $\rho_{\text{air}} = 1 \text{ gram ml}^{-1}$ ,  $\rho_{\text{heksan}} = 0,678 \text{ gram ml}^{-1}$ ). Pada bagian bawah tabung reaksi terdapat endapan putih yang merupakan enzim yang tidak larut dan ikut mengendap ketika disentrifugasi.

Setelah sentrifugasi, fasa yang berada di antara fasa n-heksana (atas) dan fasa air (bawah) kemudian dipisahkan, dan kandungan air dihilangkan dengan cara pemanasan dalam oven dengan suhu berkisar  $\pm 80^{\circ}\text{C}$ . Pemanasan hingga suhu  $185^{\circ}\text{C}$  tidak mengganggu ikatan ester, namun pada suhu  $\pm 140^{\circ}\text{C}$ , akan terjadi perubahan warna menjadi coklat akibat glukosa yang terkaramelisasi. Penghilangan molekul air dilakukan untuk identifikasi keberadaan gugus ester dari padatan yang terbentuk menggunakan FT-IR (Ika Novianingsih, 2011):



**Gambar 4.23** Spektrum FT-IR Ester glukosa dari enzim bebas

**Tabel 4.8 Identifikasi gugus fungsi spektrum FT-IR ester glukosa dari enzim bebas**

Identifikasi Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bilangan Gelombang yang teridentifikasi ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H stretch Glukosa	~3650 or 3400-3300	3462,22
		3427,51
C-H stretch	2950-2800	2920,23
O-H stretch	3400-2400	2661,77
C=O stretch (Ester)	1750-1735	1735,93
C=O stretch (asam lemak)	1730-1700	1716,65

Pada spektrum FT-IR yang dihasilkan dari endapan yang terbentuk pada reaksi esterifikasi, terlihat puncak pada panjang gelombang  $1735,93\text{cm}^{-1}$ . Puncak serapan pada daerah 1750-1735 mengidentifikasi adanya gugus C=O ester. Pada spectrum FT-IR produk juga terdapat puncak pada panjang gelombang  $3462,22\text{cm}^{-1}$ , panjang gelombang pada daerah tersebut menunjukkan adanya gugus -OH. Gugus -OH yang teridentifikasi dimungkinkan merupakan gugus -OH dari glukosa yang tidak berikatan dengan asam lemak. Pada spectrum juga terdapat puncak pada panjang gelombang  $1716,65\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya serapan C=O asam lemak. Dari hasil identifikasi menggunakan FT-IR dapat disimpulkan bahwa glukosa dapat membentuk ester glukosa dengan asam lemak yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit (percobaan 3.2.1) dan ester glukosa yang dihasilkan berbentuk endapan berwarna putih.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi Na-alginat yang digunakan untuk imobilisasi enzim adalah 1% dengan aktifitas spesifik 1,214 U/mg protein
2. Reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak sawit dengan glukosa dapat dikatalisis dengan menggunakan enzim yang terimmobilisasi dalam matriks alginat dengan persen konversi asam lemak 6,095%
3. Kondisi optimum reaksi esterifikasi asam lemak bebas dan glukosa dengan enzim yang terimobilisasi dalam matriks alginat diperoleh pada :
  - Perbandingan mol substrat (glukosa:asam lemak) 1:60
  - Suhu optimum pada 35<sup>0</sup>C
  - Waktu optimum yang dibutuhkan adalah 40 jam
  - Dan tanpa penambahan *molecular sieve*
4. Ester glukosa asam lemak memiliki aktivitas sebagai *emulsifier*

#### 5.2. Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya, perlu melakukan optimasi imobilisasi dengan variasi yang lebih beragam seperti variasi konsentrasi CaCl<sub>2</sub>, variasi waktu perendaman enzim imobil, dan variasi ion divalent.
2. Mencari metode pemurnian yang lebih baik untuk senyawa ester hasil sintesis dan cara yang tepat untuk uji adanya gugus ester yang dapat dilakukan secara sederhana.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arifam, Fahmi., *et al.* (2011). *Pengembangan Bioreaktor enzimatik untuk Produksi Asam Lemak dari hasil samping Penggilingan Padi Secara In Situ*. Semarang: Jurusan Teknik Kimia PSD III Teknik UNDIP
- Betha, Ofa Suzanti. (2009). *Amobilisasi Sel Lactobacillus Acidophilus FNCC116 dan Bacilluz licheciformis F114 untuk Demineralisasi dan Deprotonasi Limbah Udang dalam pengolahan Kitin*. Depok: Farmasi FMIPA UI
- Carioca, Jose Osvaldo Bezerra., *et al.* *Esters Enzymatic Synthesis of Cashew Nut Shell Oil With Glucose and Fructose Sugars*. Universidade federal do Ceara
- Cambel, Niel A., *et al.* (2002). *Biologi* (Rahayu Lestari., *et al.*, Penerjemah.) . (Jilid1). Jakarta: Penerbit Erlangga
- Coruh, Hale Aylin. (2005). *Use of Calsium Alginate as a Coagulant in Water*. Natural and Applied Siences of Middle East Technical University
- Demirkan, Elif., *et al.* (2011). *Immobilization of B amyloliquefaciens  $\alpha$ -amilase and Comparison of Some of its Enzymatic Properties with the free form*. Turkey: Science and Art Faculty Departmen of Biology trakya University.
- Destiana, Mescha., *et al.* (2007). *Intensifikasi Proses Produksi Biodiesel*. Bandung: Institut Teknologi Bandung dan PT. ReKayasa Industri
- E Sitompul. (2010). *Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kawa*. Sumatra Utara: Universitas Sumatra Utara
- Erizat. *et al.*, (2007) *Sintesis Hidrogel Poliakrilamida (PAAM)-Ko-Alginat dengan Iradiasi Sinar Gamma dan Karakterisasinya*. Jakarta Selatan: Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR )-(BATAN)
- Firman Sebayang. (2006) *Imobilisasi Enzim Papain dari Getah Pepaya dengan Alginat*. Medan: Departemen Kimia FMIPA Universitas Sumatra Utara
- Fessenden.Fessenden.(1982). *Kimia Organik Jilid 2.*( Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Penerjemah.). Jakarta: Penerbit Erlangga

- Seçkin GÜLAY.(2009). *Immobilization of Thermophilic Recombinant esterase Enzyme by Entrapment in Coated Ca-alginate Beads*. Izmir: Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.
- Hariyadi P. 1995. *Synthesis of Monoester and Mono- and Diacylglycerol from Butteroil by Lipase-Catalyzed Esterification in Microaqueous Media. [Disertasi]*. Graduate School of University of Wisconsin Madison USA
- Hariyadi, Purwiyatno. (1996). *Katalisis enzimatis dalam pelarut organik*. Bogor: Fakultas Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor.
- Hartoto,Liesbetini. (2008). *Imobilita Enzim*. Bogor: IPB
- Hashim, Hasnisa Binti., et al (2008). *Kajian Pengoptimuman Tindak Balas Hidrolisis Minyak Kacang Soya*. Malaysia: Fakulti Sains dan Teknologi Universiti kebangsaan Malaysia
- Indah, Mutiara. (2004). *Enzim*. Medan: Fakulkas Kedokteran Universitas Sumatra Utara
- Indraswari, sekar.(2006). *Pencirian Surfaktan nonionic Ester Glukoa Laurat, Ester Glukosa Miritat, dan Ester Glukosa StearatSebagai Pengemuli Deterjen, dan Pembusaan*. Bogor: Departemen Kimia FMIPA IPB
- J Utama. (2011). *Bab 2 Tinjauan Pustaka*.Sumatra: Univeritas Sumatra Utara.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia
- Lowry, Oliver H., et al. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Luna, Prima. (2011). *Optimasi sintesis Monolaurin Menggunakan katalis Enzim Lipase Imobil Pada Circulated Packed Bed Reaktor*. Bogor : IPB
- Maharani, Marita Agusta., Widayanti, Rizki. *Pembuatan Alginat dari Rumpun Laut untuk Menghasilkan Produk dengan REndemen dan Viskositas Tinggi* Semarang : Teknik Kimia Universitas Diponegoro

- Masyithah, Zuhriana. (2008). *Sintesis Biosurfaktan Dietanolamida Menggunakan Lipase dari Rhizomucor meihei dan Candida rugosa*. Medan: Fakultas Teknik Universitas Sumatra Utara
- Murray, Robert K., et al. (1999). *Biokimia Harper* (Alexander H. Santoso, Penerjemah.). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Novianingsih, Ika. (2011). *Studi Reaksi Sintesis Ester Sukrosa Secara Enzimatis Menggunakan Lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3 Antara Sukrosa dengan Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Sawit*. Depok: FMIPA UI
- Ozturk, Banu. (2001). *Immobilization lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. Turkey: Institute of Technology
- Pasaribu, Nurhida. (2004). *Minyak Buah Kelapa Sawit*. Sumatra Utara: Universitas Sumatra Utara
- Pertiwi, Emilia. (1998). *Mempelajari Spesifitas Esterifikasi Enzim Lipase Candida antarctica dalam Lingkungan Mikroakueus*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Bogor
- Poerwanto, Sriyono., et al. (2010). *Sintesis Lipida Terstruktur dari Asam Laurat dan Gliserol dalam Pelarut Isooktana dengan Biokatalis Lipase Candida rugosa*. Yogyakarta: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada.
- Prihanjani, Megasari. (2006). *Sintesis Ester Glukosa Miristat Melalui Interesterifikasi antara Metil Miristat dan Glukosa Pentaasetat*. Bogor: Departemen Kimia FMIPA IPB
- Qudsiyyah, Rizka Khafi. (2003). *Mempelajari Spesifitas Alkohol, Spesifitas posisi, dan Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Lipase Ekstraselular dari Kapang Mucor javanicus M26 II/2*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Rahmawati, Mariana. 2008. *Sintesis Glukosa Oleat dari Metil Oleat dan Glukosa Pentaasetat Menggunakan katalis Zeolit Alam Cikembar*. Bogor: Kimia FMIPA IPB

- Rusiana, Indra Bayu. (2006). *Sintesis Ester Glukosa Laurat dari Metil Laurat dan Glukosa Pentaasetat*. Bogor: Departemen Kimia FMIPA IPB
- Samosir, Yustina. 2011. *Sintesis Metil Ester Sulfonat dari Asam Stearat dan Metal Ester Sulfonat dari Asam Oleat*. Medan: Farmasi Universitas Sumatra Utara
- Sari, Ika. 2006. *Intesis Ester Glukosa Stearat Melalui reaksi Interesteerifikasi Dengan Metode Bebas Pelarut*. Bogor: kimia FMIPA IPB.
- Sembiring, Firdaus. (2010). *Penggunaan film Pelapis Ca-alginat Kitosan dan Pelapis Plastik Terhadap Kadar Pati Roti Tawar dan Pertumbuhan Isolat bakteri*. Medan: Kimia FMIPA USU
- Su'I, Moh., et al. *Perubahan Aktifitas Enzim Amobil Lipase dari Kentos Kelapa*. Malang: Universitas Widyagama Malang
- Sufriani, Rini. 2006. *Perincian Surfaktan Nonionic Ester Glukosa Stearat dan Ester Glukosa Oleat Sebagai Pengemulsi, Deterjen, dan Pembusa*. Bogor : Departemen Kimia FMIPA IPB
- Sugiharni, Nanik. (2010). *Isolasi lipase ekstrak kasar dari pseudomonas fluorescens sebagai biokatalisator dalam studi pendahuluan reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak kelapa dengan sukrosa*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- Sumarlin. (2010). *Enzim Lipase dari Mikroba*. Kendari: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universita Haluoleo
- Suryani, Ani.(2005).*Kontribusi SCRD (Surfactant Research and Development Center)LPPM.IPB untuk Pengembangan Industri Oleokimia di Indonesia*. Bogor: LPPM –IPB
- Tarigan, Juliata Br. 2002. *Ester Asam Lemak*. Medan : Kimia FMIPA Universitas Sumatra Utara.
- Tarigan, Juliata Br. 2009. *Ester Asam Lemak*. Medan : Kimia FMIPA Universitas Sumatra Utara.

- Won, Keehoon., *et al.* 2005. Optimization of Lipase Entrapment in Ca-alginat gel Beads. *Prosess Biochemistry* 40, 2149-2154.
- Wulandari, Siska Ayu. 2011. *Pra Rencana Pabrik Palmitamida dari Asam Palmitat dan Urea dengan Kapasitas Produksi 6500 Ton/Tahun*. Medan: Teknik Kimia Universitas Sumatra Utara
- Wulan,Praswati., Rejoso,Muhamad Titis., Hermansyah,Heri. *Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase Rizopus Oryzae yang di Imobilisasi Menggunakan Metode Adsorpsi*. Depok: Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Yoo, I, *et al.* (2007). *Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters* . Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Kyunggi 461-701, Korea.
- Yu, Jiugao., *et al.* 2007. Study Of Glucose Ester Synthesis By Immobilized Lipase from Candida sp. *Catalysis Communication* 9, 1369-1374.
- Zailani,Kartini., *et al* (2001) *Ekstraksi dan Pemurnian alginate dari Sargassum filipendula Kajian dari Bagian Tanaman, Lamam Ekstraksi dan Konsentrasi Isopropanol*. Jurnal Teknologi Pertanian.
- Zuhra, Cut Fatimah. (2002). *Penyediaan asam Eikosapentanoat (EPA) dan Asam Dokosaheksanoat (DHA) Melalui Transesterifikasi Minyak Ikan dengan Etanol yang Dikatalisis oleh Lipase*. Sumatra Utara: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Kimia Universitas Sumatra Utara.

Lampiran 1  
Perhitungan BM Hidrolisat Asam Lemak Minyak Sawit

Parameter	Hasil (%)	BM	BM(%)
Asam Lemak Jenuh			
Kaprilat	0.09	144	0.13
Kaprat	0.13	172	0.22
Laurat	0.51	200	1.02
Miristat	1.24	228	2.83
Palmitat	35.50	256	90.88
Stearat	2.82	284	8.01
Asam Lemak Tidak Jenuh			
Oleat	41.10	282	115.99
Linoleat	17.80	280	49.84
Linolenat	0.78	278	2.17
BM rata-rata			271.09

Lampiran 2  
Perhitungan Penentuan Rasio Bahan

1. Menentukan & Asam Lemak

untuk menentukan & asam lemak digunakan pikno berukuran 10 mL

massa asam lemak = 8.405 gram

maka  $\rho$  asam lemak = 8.405 gram/10 ml = 0.8405 gram/mL

2. Menentukan Volume dan Mol Asam Lemak

$$mol = \frac{m}{Mr} \rightarrow m = mol \times Mr$$

$$m = 6 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 271.09 \text{ gram/mol} = 1.626 \text{ gram}$$

$$\rho = \frac{m}{v} \rightarrow v = \frac{m}{\rho} = \frac{1,626 \text{ gram}}{0,8405 \text{ gram/ml}} = 1,934 = \text{mL}$$

3. Menentukan Volume Glukosa Monohidrat

$$mol = \frac{m}{Mr} = \frac{1,90 \text{ gram}}{198 \text{ gram/mol}} = 0,01 \text{ mol}$$

$$M = mol/v = 0.01 \text{ mol} / 0.1 \text{ L} = 0.1 \text{ M}$$

$$v = \frac{M}{mol} = \frac{0.1M}{0.0001 \text{ mol}} = 1000 \text{ l} = 1 \text{ ml}$$

5. Menentukan Volume Pelarut (n – heksana)

$$v \text{ n – heksan} = v \text{ glukosa} + v \text{ asam lemak}$$

$$= 1 \text{ mL} + 1,934 \text{ mL} = 2,934 \text{ mL}$$

Lampiran 3  
Penentuan Konsentrasi Ezim dengan Metode Lowry

Zat	Blanco	Standar							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA 400ppm		0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
Alginat									
Alginat + Enzim									
Filtrat									
CaCl <sub>2</sub>									
Triss buffer HCl									
H <sub>2</sub> O	0.5	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	
Lowry	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Folin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Volume total	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Zat	Blanco	Sampel				
	1	10	11	12	13	14
BSA 400ppm						
Alginat		0.5				
Alginat + Enzim			0.5			
Filtrat				0.5		
CaCl <sub>2</sub>					0.5	
Triss buffer HCl						0.5
H <sub>2</sub> O	0.5					
Lowry	5	5	5	5	5	5
Folin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Volume total	6	6	6	6	6	6

Menginkubasi seluruh larutan pada suhu kamar selama 30 menit, baca %transmitan pada panjang gelombang 700nm.

Larutan lowry dibuat dengan cara:

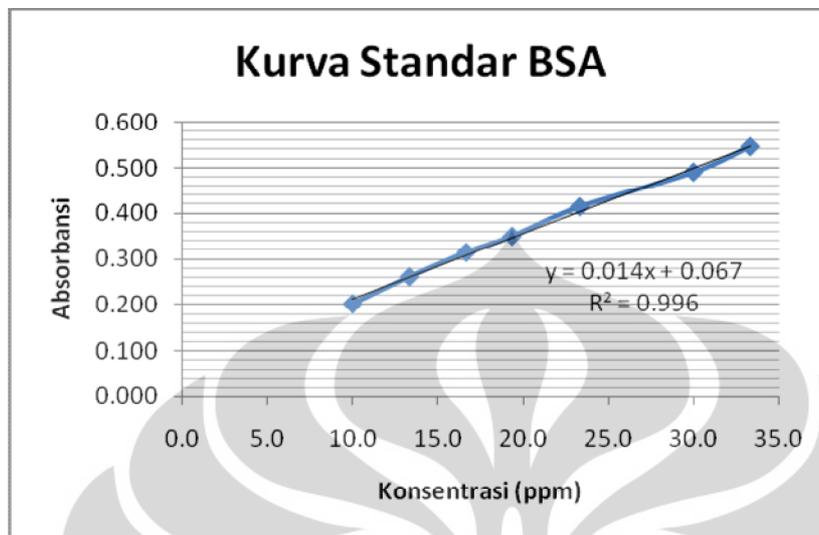
Lowry (Larutan C) = B<sub>1</sub> 1mL + B<sub>2</sub> 1mL + 98 ml larutan A

Larutan A = 2 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam 100 mL NaOH 0,1 N

B<sub>1</sub> = 0,1 gram CuSO<sub>4</sub> dalam 10 mL aquades

B<sub>2</sub> = 0,27 gram K.Na tartat dalam 10 ml aquades

Lanjutan



	Absorbansi	
	Alginat + Enzim	Filtrat
Na-alginat 1%	0.222	0.109
Na-alginat 1.5%	0.328	0.086
Na-alginat 2%	0.405	0.073

$$Y = 0.014x + 0.067$$

$$x = \frac{(y - 0.067)}{0.014}$$

$$\text{Konsentrasi enzim dalam filtrate 1\%} = x = \frac{(y - 0.067)}{0.014}$$

$$\text{Konsentrasi enzim dalam filtrate 1\%} = \frac{(0.109 - 0.067)}{0.014} = 3$$

$$\text{Konsentrasi mula-mula enzim+ alginat 1\%} = \frac{(0.222 - 0.067)}{0.014} = 11.07$$

$$\text{loading efficiency (\%)} = \left( \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \right) \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{loading efficiency (\%)} &= \left( \frac{(11.07 \times 9) - (3 \times 20)}{11.07 \times 9} \right) \times 100\% \\ &= \frac{39.63}{60} \times 100\% = 66.05\% \end{aligned}$$

Lampiran 4  
Penentuan persen immobilization yield

	enzim bebas	enzim imobile		
		1%	1.50%	2%
volume minyak (mL)	0.425	0.425	0.425	0.425
berat minyak (gram)	0.383	0.383	0.383	0.383
berat enzim yang ditimbang (mg)	15	10	15	20
N NaOH	0.050	0.098	0.098	0.098
V blanko	5.952	3.100	3.100	3.100
Sampel V1	21.500	3.600	4.000	3.900
V2	21.500	3.500	3.600	4.300
V rata-rata sampel	21.500	3.550	3.800	4.100
Waktu	73	60	60	150
Aktivitas	27.758	1.919	2.985	1.705
mg protein (yang direaksikan)	15	1.58	3.15	2.76
aktivitas spesifik	1.851	1.214	0.947	0.618
%immobilization		65.586	51.161	33.387

$$\text{immobilization efficiency (\%)} = \left( \frac{a_{\text{imob}}}{a_{\text{free}}} \right) \times 100$$

$$\text{immobilization efficiency (\%)} = \left( \frac{1.214}{1.851} \right) \times 100\% = 65.586$$

Lampiran 5  
Data Optimasi Esterifikasi

Kondisi perbandingan rasio mol substrat glukosa:enzim (1:60), 0,1 gram molecular sieve, dan waktu inkubasi 4 jam

	OPTIMASI TEMPERATUR				
Variasi	30	35	37	40	45
mol asam lemak	6	6	6	6	6
[NaOH]	0.0948	0.124049	0.09268	0.09268	0.094897
V Blanko	20.60	25	23.1	24.1	26.7
Sampel V1	19.4	24	21.8	23.7	26.3
V2	20.1	23.4	22.7	23.8	25.9
V3	19.9	23.7	22.2	23.45	26.1
V sampel rata-rata	19.8	23.7	22.25	23.65	26.1
%konversi	1.264	2.687728	1.312967	0.6951	0.85

Kondisi temperatur 35<sup>0</sup>C perbandingan rasio mol substrat glukosa:enzim (1:60) dan 0,1 gram molecular sieve

	OPTIMASI WAKTU					
Variasi waktu (jam)	4	8	16	32	40	64
mol asam lemak	6	6	6	6	6	6
[NaOH]	0.208	0.048	0.048	0.049	0.096	0.049
V Blanko	12.800	19.000	19.000	45.500	33.400	47.000
Sampel V1	12.300	16.100	15.500	40.200	30.400	40.200
V2	12.700	15.600	15.400	40.100	30.300	40.400
V3	12.400	16.300	15.000	40.000	29.000	40.600
V sampel rata-rata	12.500	16.000	15.300	40.100	30.200	40.400
%konversi	1.042	2.375	2.929	4.419	5.141	5.401

Kondisi temperatur 35<sup>0</sup>C waktu inkubasi 40 jam dan 0,1 gram molecular sieve

	OPTIMASI RASIO			
Variasi rasio (mol glukosa:mol as.lemak)	1:12	1:30	1:60	1: 90
mol asam lemak	1.2	3	6	9
[NaOH]	0.106	0.106	0.0964	0.106
V Blanko	4.4	15.5	33.4	36.3
Sampel V1	4.1	14.15	30.400	32.8
V2	3.7	14.9	30.300	33.2
V3	4.2	14.3	29.000	32.7
V sampel rata-rata	4	14.45	30.2	32.9
%konversi	3.533	3.710	5.141	4.004

Kondisi temperatur 35<sup>0</sup>C perbandingan rasio mol substrat glukosa:enzim (1:60) dan waktu inkubasi selama 40 jam

	OPTIMASI MOLECULAR SIEVE			
Variasi	0	0.1	0.4	0.7
mol asam lemak	9	9	9	9
[NaOH]	0.106	0.0964	0.0964	0.0964
V Blanko	22.5	33.4	36.2	29.6
Sampel V1	19.1	30.400	32.9	29.1
V2	19.0	30.300	34.1	29.2
V3	19.05	29.000	33.4	30.2
V sampel rata-rata	19.05	30.2	33.4	29.5
%konversi	6.095	5.141	4.499	0.161

## Lampiran 6

## Perhitungan Konversi Asam Lemak dari Minyak Sawit

Titrasi asam basa digunakan untuk menentukan persen konversi dari asam lemak.

$$\% \text{ konversi} = \frac{(V1 - V2) \times [NaOH] \times 100\%}{\text{mol asam lemak}}$$

Persen konversi pada kondisi 35<sup>0</sup>C waktu inkubasi 40 jam dan perbandingan rasio mol substrat (1:60) tanpa penambahan molecular sieve:

$$\% \text{ konversi} = \frac{(22,5 - 19,05) \times 0,106 \times 100\%}{6} = 6,095\%$$

6

## Lampiran 7

## Data Analisis Kandungan Asam Lemak Minyak Sawit

	KEMENTERIAN PERINDUSTRIAN RI BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN INDUSTRI <b>BALAI BESAR INDUSTRI AGRO</b> LABORATORIUM ANALISIS DAN KALIBRASI BALAI BESAR INDUSTRI AGRO ANALYTICAL AND CALIBRATION LABORATORIES CENTER FOR AGRO-BASED INDUSTRY Jalan Ir. H. Juanda 11, Bogor 16122 Telp. : (0251) 8324068, 8323339 Faks. : (0251) 8323339	 Komite Akreditasi Nasional Laboratorium Pengujian LP-057-IDN
<p><b>Kepada :</b>  <i>To</i> DEPARTEMEN KIMIA UI          KAMPUS UI          DEPOK</p>		
<p><b>LAPORAN HASIL UJI</b>  <i>TEST REPORT</i></p>		
<p><b>Balasan surat/</b>  <i>Permintaan tanggal :</i> -  <i>Reply to your letter/</i>  <i>request dated</i></p>	<p><b>Nomor / Number :</b> 11528/LHU/B4/ABICAL.1 / XI / 2010  <b>Nomor Analisis</b>  <i>Analysis Number</i> : 12663 dan 12664  <b>Nomor Seri</b>  <i>Serial Number</i> : 11528  <b>Halaman</b> : 1 dari / of 2  <b>Tanggal penerbitan</b>  <i>date of issue</i> : 19 Nopember 2010</p>	
<p><b>Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian</b>  <i>The undersigned avails that the testing of</i></p>		
<p><b>Contoh</b>  <i>Sample (s)</i></p>	<p>: Minyak Goreng Kode : A &amp; B</p>	
<p><b>Untuk analisis</b>  <i>for analysis</i></p>	<p>: Kimia</p>	
<p><b>Keterangan contoh</b>  <i>Description of sample</i></p>	<p>: Dikemas dalam botol</p>	
<p><b>Diambil dari</b>  <i>Taken from</i></p>	<p>: -</p>	
<p><b>Oleh</b>  <i>by</i></p>	<p>: -</p>	
<p><b>Tanggal penerimaan contoh</b>  <i>Date of sample</i></p>	<p>: 25 Oktober 2010</p>	
<p><b>Tanggal pelaksanaan analisis</b>  <i>Date of analysis</i></p>	<p>: 26 Oktober 2010</p>	
<p><b>Pengambilan contoh</b>  <i>Sampling</i></p>	<p>: -</p>	
<p><b>adaah sebagai berikut</b>  <i>The result is as follows</i></p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN            DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH            TERSEBUT DIATAS.             PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB            ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.</p> </div>	
<p>FAD.04a</p>		

Lanjutan

**H A S I L**  
**TEST RESULT**

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

Nomor Analisis : 12663 dan 12664  
 Analysis Number

Halaman / Page : 2      Dari / of 2

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

**ASLI**  
ORIGINAL

Laboratorium Analisis dan Kalibrasi  
Balai Besar Industri Agro  
Analytical and Calibration Laboratories  
Center for Agro-Based Industry  
Manajer Teknis Pengujian  
*(Mulhaquddin S. M.Si)*

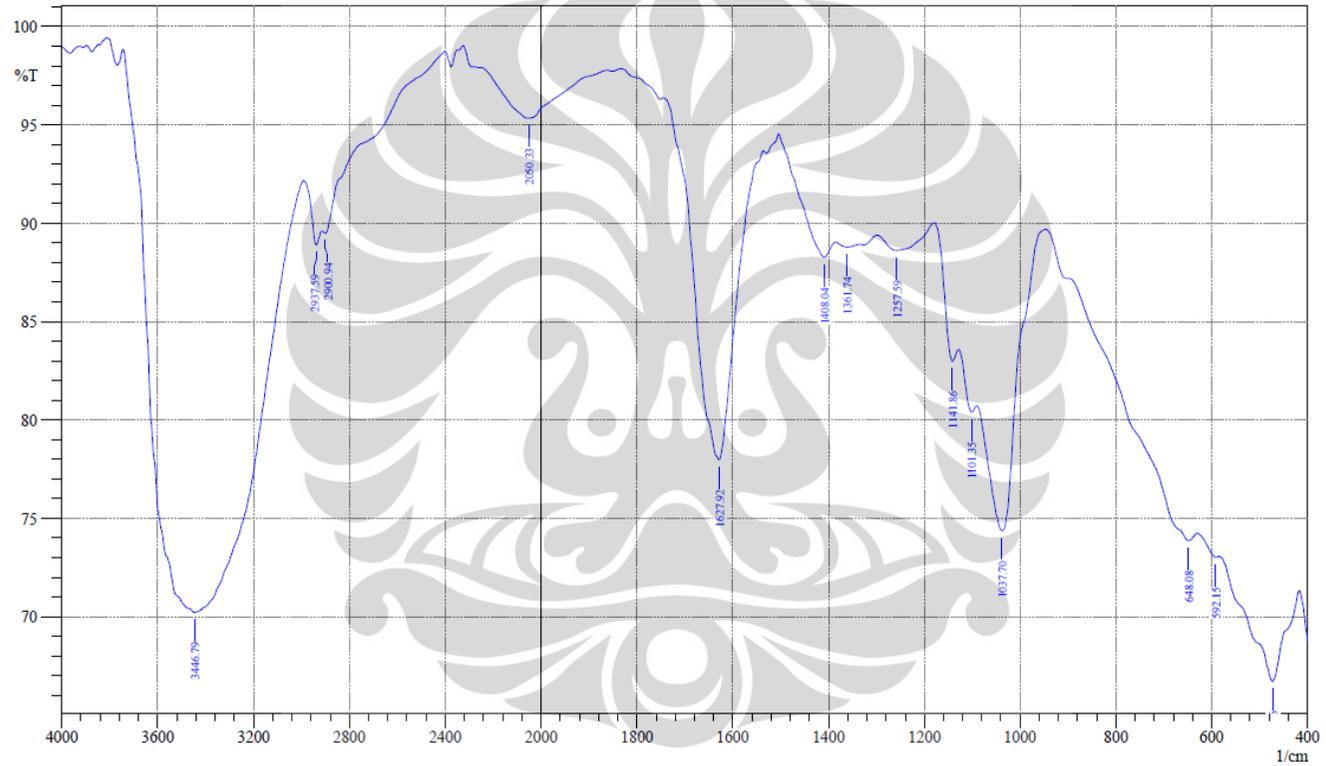
es/ef

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

FAD.04a

### Lampiran 8 Spectrum IR Glukosa

SHIMADZU

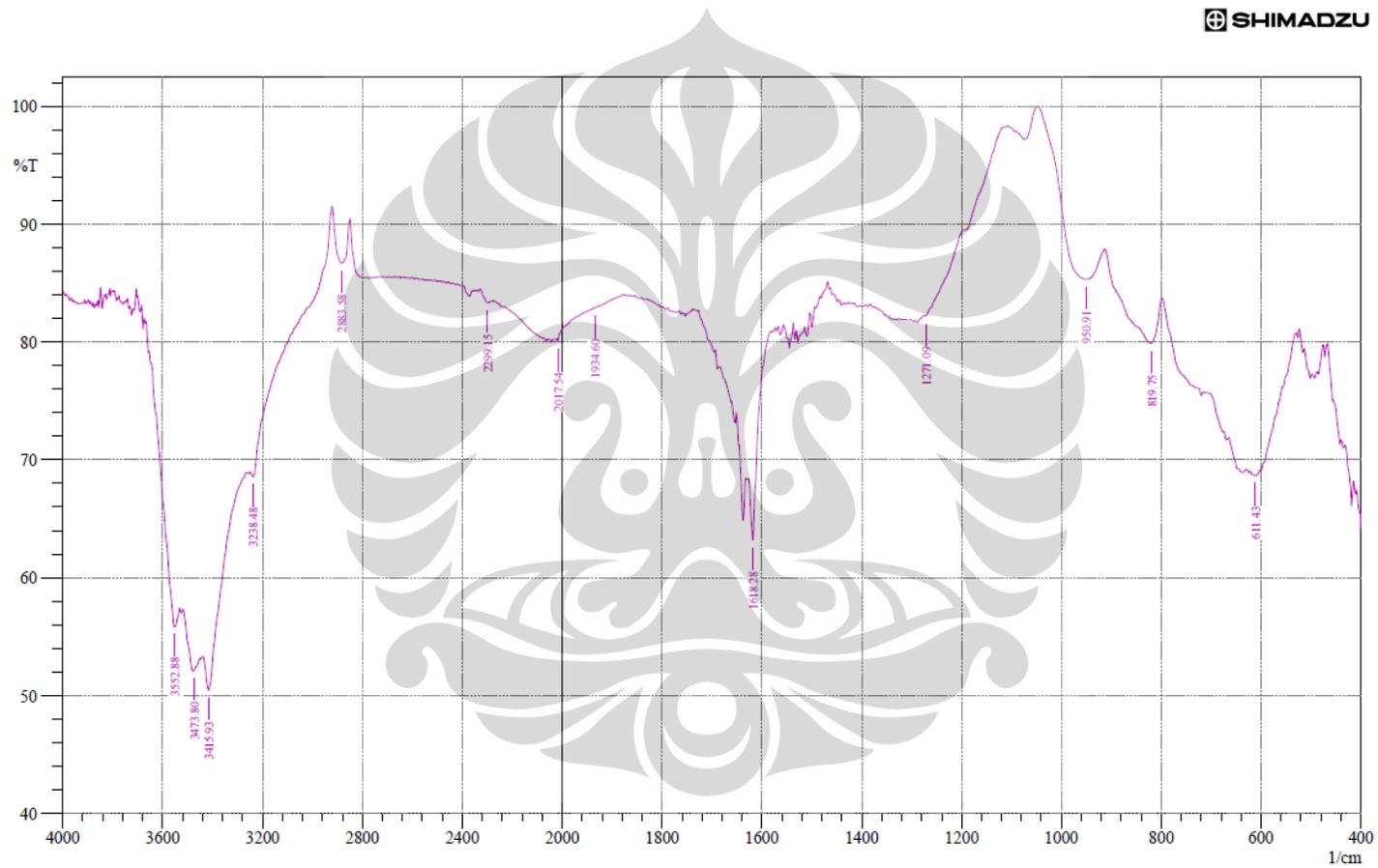


Smooth 1

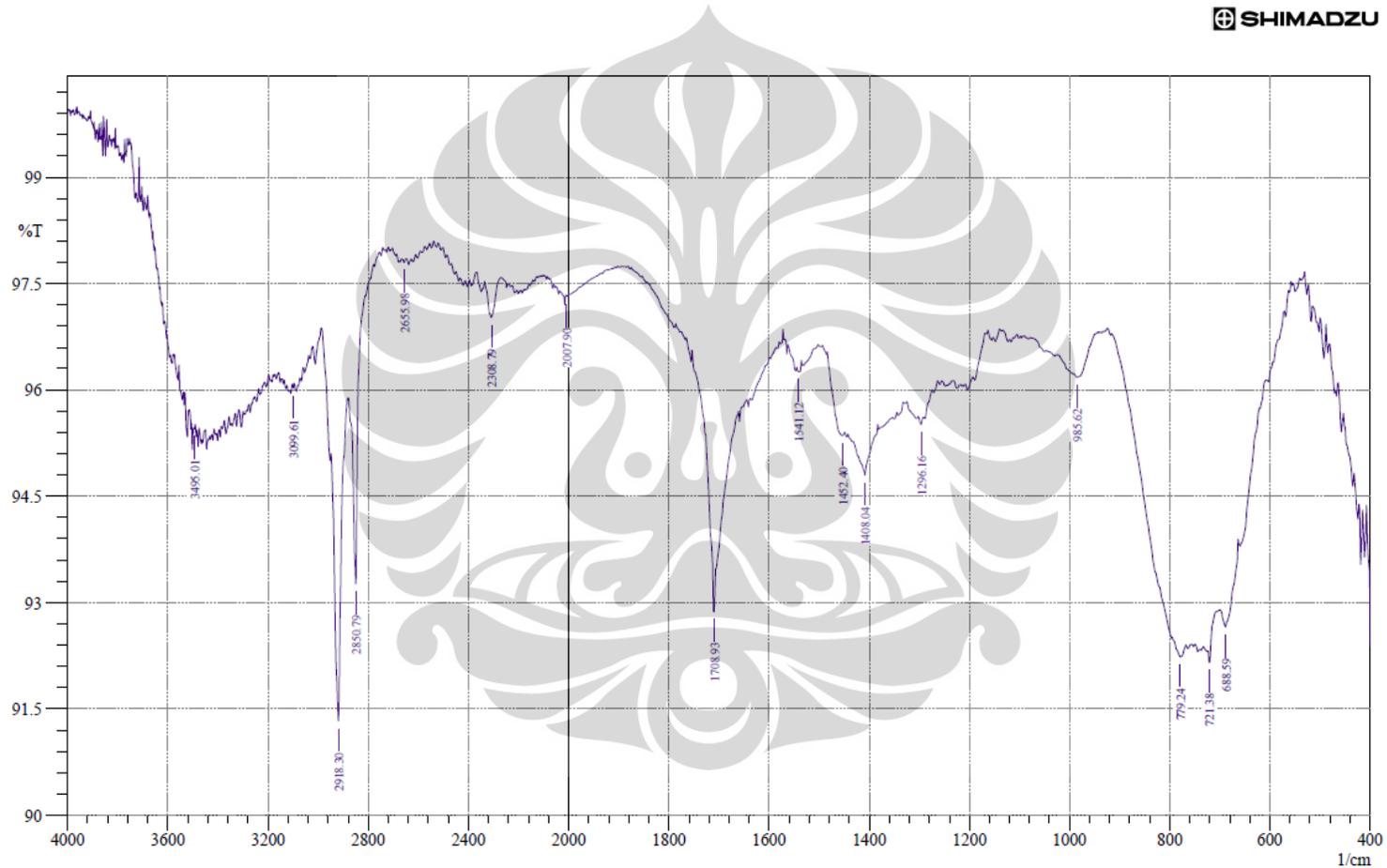
No. of Scans; 45  
Resolution; 4 [1/cm]

LABORATORIUM AFILIASI DEPT KIMIA UI

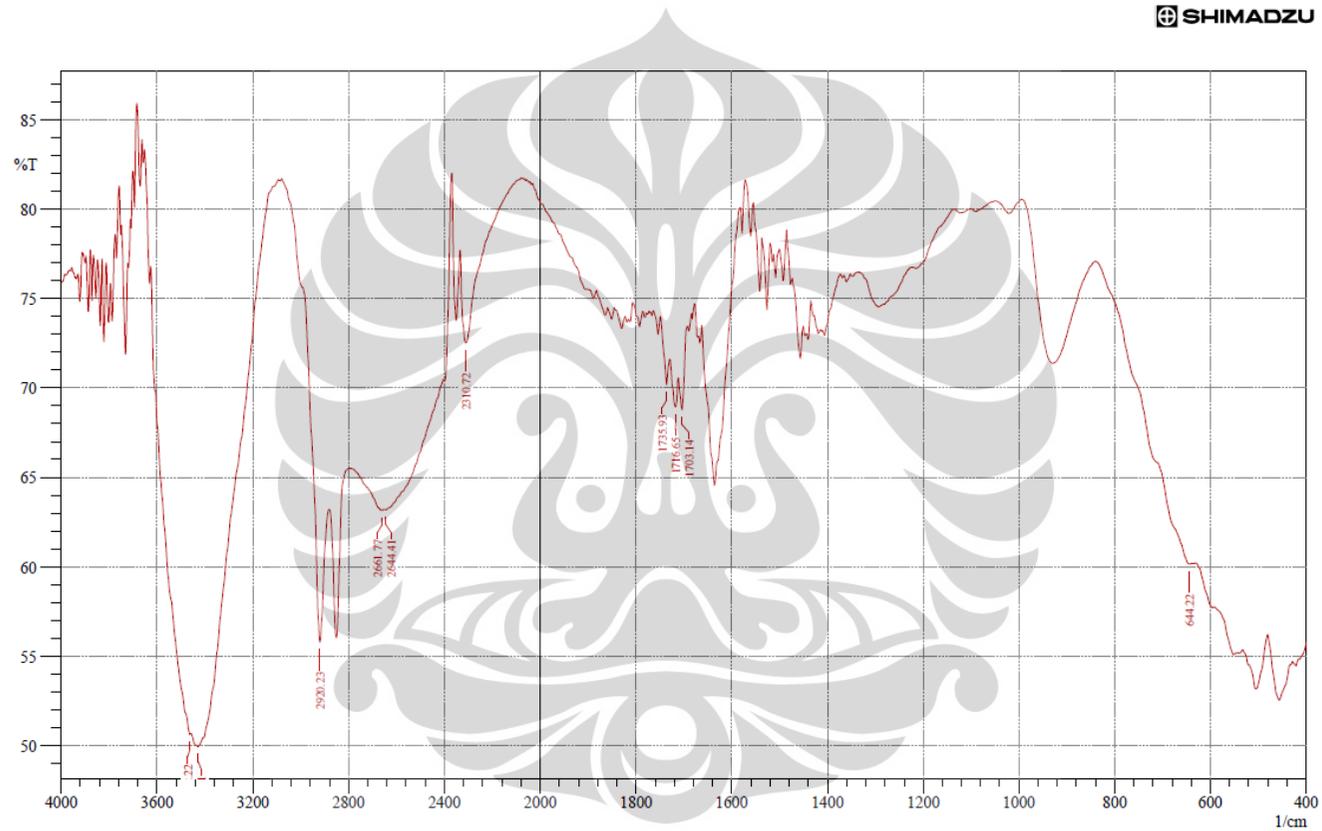
Lampiran 9  
Spectrum IR Alginate



Lampiran 10  
Spectrum IR Asam Lemak Minyak Sawit



Lampiran 11  
Ester Glukosa dengan Free Enzim



ester glukosa sawit 2

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

LABORATORIUM AFILIASI DEPT. KIMIA UI

