

**PENGARUH VARIASI PERBANDINGAN MOL LAKTOSA
DAN ASAM OLEAT PADA SINTESIS LAKTOSIL OLEAT
MENGUNAKAN LIPASE AMOBIL *Mucor miehei***

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

oleh:

MEI RHOMAWATI

0410920035-92



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**PENGARUH VARIASI PERBANDINGAN MOL LAKTOSA
DAN ASAM OLEAT PADA SINTESIS LAKTOSIL OLEAT
MENGUNAKAN LIPASE AMOBIL *Mucor miehei***

oleh:
MEI RHOMAWATI

0410920035-92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal.....

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes
NIP. 132 300 238

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 132 000 070

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

M. Farid Rahman, S.Si., M.Si
NIP. 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : MEI RHOMAWATI

NIM : 0410920035-92

Jurusan : Kimia

Penulis tugas akhir berjudul:

Pengaruh Variasi Perbandingan Mol Laktosa dan Asam Oleat pada Sintesis Laktosil Oleat dengan Menggunakan Lipase Amobil *Mucor miehei*

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.
Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

**Malang,
Yang menyatakan,**

**(Mei Rhomawati)
NIM. 0410920035-92**

PENGARUH VARIASI PERBANDINGAN MOL LAKTOSA DAN ASAM OLEAT PADA SINTESIS LAKTOSIL OLEAT MENGGUNAKAN LIPASE AMOBIL *Mucor miehei*

ABSTRAK

Laktosil oleat dapat disintesis dari laktosa dan asam oleat dengan menggunakan biokatalis lipase amobil. Enzim lipase dapat diisolasi dari kapang *Mucor miehei*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada sintesis laktosil oleat terhadap aktivitas lipase dan % konversi laktosa. Ekstrak kasar lipase diamobilisasi dengan menggunakan metode penjebakan dengan sistem bilayer dengan menggunakan Ca-alginat-kitosan. Proses esterifikasi dilakukan dengan variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat (1:2; 1:4; 1:6; 1:8; dan 1:10). Aktivitas lipase amobil ditentukan berdasarkan jumlah asam oleat yang bereaksi membentuk laktosil oleat per gram ekstrak kasar lipase amobil per menit. Penentuan jumlah asam oleat dilakukan secara titrasi asam basa menggunakan larutan KOH 0,1949 M dengan indikator fenolftalin 0,1 %. Senyawa hasil esterifikasi diidentifikasi dengan spektrofotometer Inframerah dan Kromatografi Lapis Tipis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbandingan mol optimum antara laktosa dan asam oleat adalah 1:8 dengan nilai aktivitas 32,6 µg/g menit dan konversi laktosa sebesar 83,87 %.

THE INFLUENCE OF LACTOSE AND OLEIC ACID MOLE RATIO VARIATION TO SYNTHESIZED LACTOSYL OLEATE BY USING IMMOBILIZED *Mucor miehei* LIPASE

ABSTRACT

Lactosyl oleate can be synthesized from lactose and oleic acid by using immobilized lipase as biocatalyst. Lipase can be isolated from *Mucor miehei*. The purpose of this experiment was to identify the influence of lactose and oleic acid mole ratio toward enzyme activity and % conversion of lactose. Crude lipase was immobilized by entrapping method in double layer system using Calcium alginate-chitosan. Esterification process was done by varying mole ratio of lactose and oleic acid (1:2; 1:4; 1:6; 1:8; and 1:10). The activity of immobilized lipase was determined through the amount of oleic acid to produce lactosyl oleate in gram of immobilized crude lipase per minute. Determination of oleic acid was done by acid base volumetrically using 0.1949 M KOH solution with 0.1 % phenolphthalin as indicator. The esterification product was identified by Infrared spectrophotometer and Thin Layer Chromatography. The result of this experiment showed that the optimum condition took place at mole ratio of lactose and oleic acid of 1:8 with activity 32.6 µg/g minute and lactose conversion 83.87%.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT, pemilik segala kebenaran dan keagungan. Hanya atas limpahan rahmat serta ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul **“Pengaruh Variasi Perbandingan Mol Laktosa dan Asam Oleat pada Sintesis Laktosil Oleat dengan Menggunakan Lipase Amobil *Mucor miehei*”**.

Penulisan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc., selaku dosen pembimbing I dan II, atas bimbingan, nasehat, pengarahan dan kesabaran yang telah diberikan kepada penulis selama penyusunan tugas akhir ini.
2. Qonitah Fardiyah, S.Si., M.Si., selaku dosen penasehat akademik sekaligus sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan nasehat, saran, dan arahan baik selama perkuliahan maupun dalam perbaikan skripsi ini.
3. Drs. Dinar Purwonugroho, M.Si., Ir. Bambang Ismuyanto, MS., dan Dr. Soebiantoro, Apt.MSc., selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan skripsi ini
4. M.Farid Rahman, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia yang telah membantu terfasilitasinya tugas akhir.
5. Ayah, Ibu, adik dan seluruh keluarga yang selalu mengiringi penulis dengan doa, perhatian, kasih sayang, dan nasehat, serta dukungan hingga terselesaikannya tugas akhir ini.
6. Semua rekan – rekan di Jurusan Kimia, khususnya angkatan 2004 yang telah memberikan semangat dan persahabatan selama ini.

Penulis menyadari tugas akhir ini masih jauh dari sempurna. Dengan kerendahan hati penulis mengharap kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan tugas akhir ini. Akhirnya semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Juli 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Enzim Lipase	4
2.2 <i>Mucor miehei</i> Penghasil Lipase	5
2.3 Alginat dan Kitosan sebagai Media Pengamobil	5
2.3.1 Alginat	5
2.3.1 Kitosan	6
2.4 Amobilisasi dengan Ca-Alginat-Kitosan	6
2.5 Laktosa	7
2.6 Asam Oleat	8
2.7 Esterifikasi	8
2.8 Ester Gula	9
2.9 Spektrofotometri Inframerah	10
2.10 Kromatografi Lapis Tipis	10
2.11 Hipotesis	11

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	12
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	
3.2.1 Bahan penelitian.....	12
3.2.2 Bahan kimia	12
3.2.3 Alat penelitian.....	12
3.3 Tahapan Penelitian	12
3.4 Cara Kerja	
3.4.1 Pembuatan media padat	13
3.4.2 Penanaman biakan murni.....	13
3.4.3 Pembuatan media cair.....	13
3.4.4 Pembuatan inokulum	14
3.4.5 Produksi dan isolasi enzim lipase	14
3.4.6 Penentuan kurva standar kasein	14
3.4.7 Penentuan kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi	15
3.4.8 Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi	15
3.4.9 Amobilisasi ekstrak kasar lipase dengan Ca-alginat-kitosan	16
3.4.10 Penentuan kadar protein ekstrak kasar lipase amobil.....	16
3.4.11 Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada pembuatan laktosil oleat	17
3.4.12 Identifikasi senyawa hasil esterifikasi dengan spektrofotometer Inframerah.....	17
3.4.13 Identifikasi senyawa hasil esterifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	17
3.5 Analisa Data	18

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

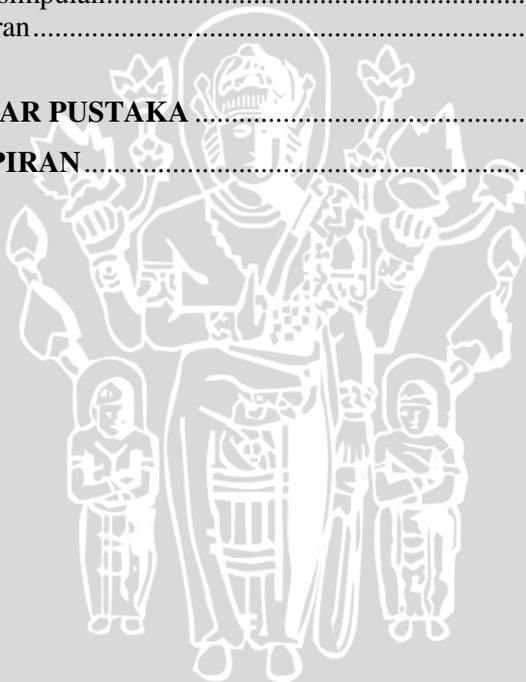
4.1 Pengaruh Variasi Perbandingan Mol Laktosa dan Asam Oleat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil.....	19
4.2 Analisis Senyawa Hasil Esterifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	22
4.3 Analisis Senyawa Hasil Esterifikasi dengan Spektra Inframerah.....	23

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran.....	25

DAFTAR PUSTAKA	26
-----------------------------	----

LAMPIRAN	30
-----------------------	----



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Struktur aktif lipase..... 4
Gambar 2.2	Struktur alginat..... 5
Gambar 2.3	Struktur kitosan..... 6
Gambar 2.4	Struktur laktosa 7
Gambar 2.5	Struktur asam oleat 8
Gambar 2.6	Reaksi esterifikasi..... 8
Gambar 4.1	Mekanisme reaksi esterifikasi Laktosil Oleat..... 20
Gambar 4.2	Kurva aktivitas ekstrak kasar lipase pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat..... 21
Gambar 4.3	Kurva % konversi laktosa pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat..... 21
Gambar L.5.1	Kurva absorbansi larutan kasein..... 49
Gambar L.6.1	Kurva baku larutan kasein 50
Gambar L.14.1	Gambar noda hasil Kromatografi Lapis Tipis..... 66
Gambar L.14.2	Spektra Inframerah laktosa 67
Gambar L.14.3	Spektra Inframerah asam oleat..... 68
Gambar L.14.4	Spektra Inframerah senyawa hasil esterifikasi 69

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	Nilai Rf asam oleat, laktosa dan senyawa hasil esterifikasi dari Kromatografi Lapis Tipis.....	22
Tabel 4.2	Interpretasi spektra Inframerah.....	24
Tabel L.5.1	Data absorbansi larutan standar kasein 833,333 ppm.....	49
Tabel L.6.1	Data absorbansi larutan standar kasein pada λ 540.....	50
Tabel L.7.1	Pembakuan larutan KOH 0,2 M dengan larutan asam oksalat 0,1 M.....	51
Tabel L.8.1	Volume larutan KOH blanko pada titrasi ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi.....	52
Tabel L.8.2	Aktivitas ekstrak kasar lipase.....	52
Tabel L.9.1	Kadar protein ekstrak kasar lipase.....	53
Tabel L.9.2.1	Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi.....	54
Tabel L.9.3.1	Volume larutan ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan	54
Tabel L.9.3.2	Absorbansi larutan ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan	55
Tabel L.9.3.3	Jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi.....	56
Tabel L.9.4.1	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan	57
Tabel L.9.4.2	Berat ekstrak kasar lipase amobil.....	57
Tabel L.9.4.3	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam setiap gram (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase).....	58

Tabel L.9.4.4	Jumlah ekstrak kasar lipase dalam 0,5 gram (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase).....	58
Tabel L.10.1	Volume larutan KOH blanko pada titrasi ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi.....	59
Tabel L.10.2	Volume larutan KOH sampel pada titrasi ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi.....	59
Tabel L.10.3	Aktivitas enzim lipase amobil pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat.....	60
Tabel L.11.1	% Konversi laktosa.....	61
Tabel L.12.1	Pengaruh variasi perbandingan laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil	62
Tabel L.12.2	Analisis ragam pengaruh variasi perbandingan laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil....	63
Tabel L.12.3	Hasil uji BNT 5% pengaruh variasi perbandingan laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil... .	64
Tabel L.13.1	Nilai Rf dari asam oleat, laktosa, dan senyawa dari hasil esterifikasi hasil Kromatografi Lapis Tipis.....	65

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
LAMPIRAN 1	Alur penelitian.....	30
LAMPIRAN 2	Diagram kerja penelitian.....	31
LAMPIRAN 3	Preparasi larutan.....	43
LAMPIRAN 4	Perhitungan preparasi larutan.....	46
LAMPIRAN 5	Penentuan panjang gelombang kasein..	49
LAMPIRAN 6	Pembuatan kurva baku kasein.....	50
LAMPIRAN 7	Pembakuan larutan KOH.....	51
LAMPIRAN 8	Perhitungan aktivitas ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi.....	52
LAMPIRAN 9	Penentuan jumlah ekstrak kasar lipase...	53
LAMPIRAN 10	Perhitungan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	59
LAMPIRAN 11	Perhitungan % konversi laktosa.....	61
LAMPIRAN 12	Uji statistik pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	62
LAMPIRAN 13	Perhitungan nilai Rf laktosa, asam oleat dan senyawa hasil esterifikasi dari Kromatografi Lapis Tipis.....	65
LAMPIRAN 14	Gambar Spektra Inframerah dan noda hasil Kromatografi Lapis Tipis	66

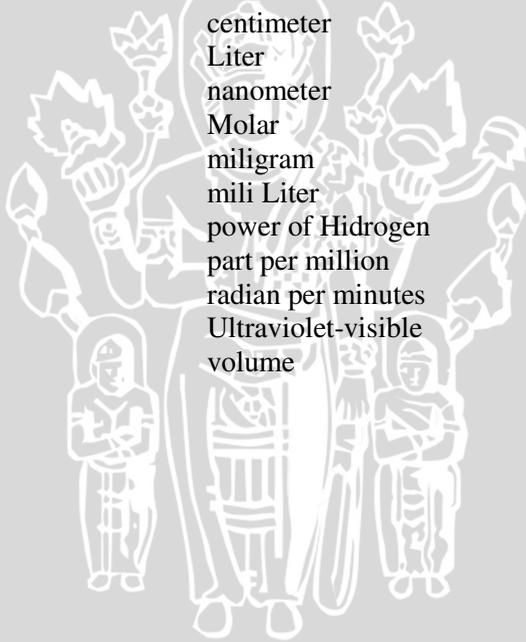
DAFTAR ISTILAH

Simbol/singkatan

β
 α
g
 μ g
 μ mol
 λ
Bj
BM
cm
L
nm
M
mg
mL
pH
ppm
rpm
Uv-vis
V

Keterangan

beta
alpha
gram
mikrogram
mikromol
lamda (panjang gelombang)
Berat jenis
Berat Molekul
centimeter
Liter
nanometer
Molar
miligram
mili Liter
power of Hidrogen
part per million
radian per minutes
Ultraviolet-visible
volume



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ester gula merupakan biosurfaktan yang mempunyai fungsi penting sebagai pereaksi solubilisasi, deterjen, dan emulsifier. Biosurfaktan ini mempunyai karakter yang ramah lingkungan, dapat biodegradasi, tidak beracun, tidak mengiritasi kulit, tidak berbau, dan tidak berasa. Ester gula dapat digunakan dalam berbagai industri bahan makanan, kosmetik, deterjen, dan kebutuhan rumah tangga (Rahman dan Herawan, 2000). Contoh ester gula adalah ester galaktosa, sorbitol 1-(6)-monostearat, dan laktosil oleat. Laktosil oleat dapat disintesis dari laktosa dan asam oleat melalui proses esterifikasi secara enzimatis.

Menurut Kuang, dkk. (2000), pembuatan ester gula dengan cara esterifikasi gula dengan asam lemak secara enzimatis, memiliki kelebihan antara lain reaksi berlangsung spesifik, dapat mengurangi pemakaian pelarut organik dan hasil reaksi samping jika dibandingkan dengan proses pembuatan ester gula dengan menggunakan katalis kimia. Kelemahan reaksi esterifikasi secara enzimatis adalah pada prosesnya enzim tidak dapat dipakai kembali. Untuk mengatasi masalah tersebut, maka enzim yang digunakan harus diamobilisasi terlebih dahulu agar dapat digunakan berulang-ulang dengan stabilitas enzim yang tetap tinggi (Chibata, dkk., 1978).

Metode amobilisasi enzim yang dilakukan adalah metode penjebakan dengan sistem bilayer yaitu enzim dijebak dalam matriks Ca-alginat kemudian bagian luar matriks tersebut dilapisi dengan kitosan yang bertujuan untuk meningkatkan efisiensi pemakaian ulang enzim amobil. Menurut Simanjutak (2005), lipase yang diamobilkan dengan sistem monolayer menggunakan Ca-alginat dapat digunakan sampai 3 kali pemakaian, sedangkan menurut Trisna (2007), selulase yang diamobilkan dengan sistem bilayer menggunakan Ca-alginat-kitosan dapat digunakan sampai 4 kali pemakaian. Selain itu, kitosan juga berfungsi untuk menyerap air yang dihasilkan dari proses esterifikasi, karena adanya air dapat mengakibatkan hidrolisis ester gula menjadi asam lemak kembali.

Reaksi esterifikasi gula dengan asam lemak merupakan reaksi yang reversibel, sehingga perbandingan jumlah reaktan akan

mempengaruhi hasil reaksi. Perbandingan mol antara gula dan asam lemak mempengaruhi aktivitas enzim dan % konversi. Hal ini dibuktikan dari beberapa penelitian misalnya pada pembuatan ester galaktosa, perbandingan mol galaktosa dan asam lemak bebas (1:1) dalam pelarut butanol, galaktosa dapat dikonversi menjadi ester galaktosa sebanyak 25%, tetapi pada perbandingan mol (1:4), galaktosa dapat dikonversi sebanyak 50% (Anonymous, 1998). Gulati, dkk., (2003), pada pembuatan ester sorbitol 1(6)-monostearat dalam pelarut heksana menghasilkan ester sorbitol 1(6)-monostearat optimum pada perbandingan mol sorbitol dan asam stearat pada 1:4 dengan konversi sorbitol 87%.

Enzim yang diperlukan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi adalah enzim lipase (Faber, 1995). Salah satu kapang penghasil lipase adalah *Mucor miehei*. *Mucor miehei* banyak ditemukan di tanah dan bahan organik. Kapang ini bersifat tidak beracun dan tidak patogen pada manusia dan hewan (Jay, 1991)

Pada penelitian ini akan dilakukan esterifikasi laktosa dengan asam oleat menggunakan biokatalis ekstrak kasar lipase amobil dengan variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan senyawa laktosil oleat yang memberikan nilai aktivitas enzim dan % konversi laktosa yang optimum.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah yang dapat diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada pembuatan laktosil oleat secara enzimatis terhadap aktivitas lipase dan % konversi laktosa?
2. Bagaimana karakter senyawa hasil esterifikasi?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Enzim yang digunakan adalah enzim lipase dari kapang *Mucor miehei*
2. Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah kitosan 2%
3. Konsentrasi Na-Alginat yang digunakan adalah Na-Alginat 3%

4. Identifikasi senyawa hasil esterifikasi dilakukan dengan metode spektrofotometri Inframerah dan Kromatografi Lapis Tipis

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mempelajari pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada pembuatan laktosil oleat secara enzimatik terhadap aktivitas lipase dan % konversi laktosa.
2. Mengidentifikasi senyawa hasil esterifikasi.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan merupakan salah satu upaya penyediaan surfaktan yang ramah lingkungan, selain itu dapat memberikan informasi tentang pembuatan senyawa baru ester laktosa yang dapat dimanfaatkan untuk keperluan bahan makanan tambahan, surfaktan, emulsifier dan insektisida.



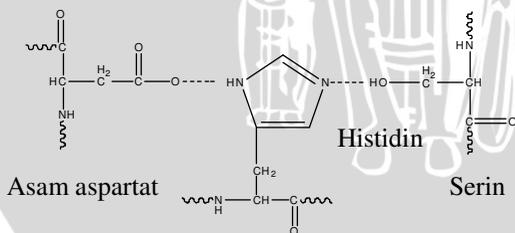
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim Lipase

Enzim adalah biokatalisator untuk reaksi kimia dalam sistem biologis. Reaksi kimia di dalam sel-sel hidup sebagian besar akan terjadi dengan sangat lambat jika tidak dikatalisis oleh enzim. Enzim dapat diisolasi dari jaringan hewan, tanaman, dan mikroba (Martoharsono, 1983), akan tetapi enzim dari mikroba lebih cepat diproduksi dibandingkan dengan enzim dari tanaman dan hewan (Suhartono, 1989), sehingga cara memproduksi enzim yang sering dilakukan yaitu dengan mengisolasi dari mikroba.

Enzim lipase (tryacylglycerol acylhydrolases) adalah enzim yang diperlukan untuk mengkatalisis berbagai macam reaksi, seperti esterifikasi dan hidrolisis (Faber, 1995). Enzim ini dapat dihasilkan oleh mikroorganisme antara lain *Mucor miehei*, *Aspergillus terreus*, *Candida viscosum*, *Candida antartica* dan *Pseudomonas sp.* Enzim lipase merupakan enzim ekstraseluler, sehingga dapat diisolasi dengan cara sentrifugasi (Gulati, dkk., 2003).

Lipase memiliki keunggulan dalam penggunaan substrat yang bervariasi, kestabilan dalam kondisi temperatur tinggi, pH, dan pelarut organik. Selain itu lipase memiliki reaksi yang spesifik terhadap substrat, asam lemak rantai pendek berbeda afinitasnya dibandingkan dengan asam lemak rantai panjang seperti asam oleat dan asam palmitat (Saxena, 2001). Struktur sisi aktif lipase menurut Wong (1995), sesuai dengan Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur sisi aktif lipase

2.2 *Mucor miehei* Penghasil Lipase

Kapang adalah kelompok mikroba yang tergolong dalam jamur (Fardiaz, 1992). Salah satu kapang penghasil lipase adalah *Mucor miehei*. *Mucor miehei* diklasifikasikan sebagai berikut (Charlie dan Walkinson, 1994):

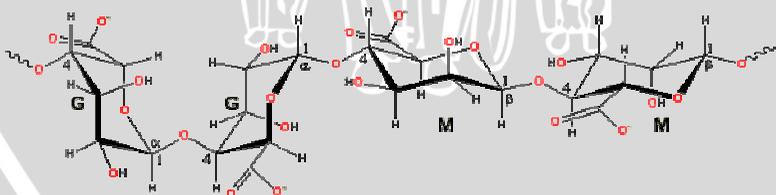
Kingdom	: Thallophyta
Divisi	: Fungi
Sub divisi	: Eumycetes
Kelas	: Phycomyetes
Sub kelas	: Zygomycetes
Ordo	: Mucorales
Famili	: Mucoraceae
Genus	: <i>Mucor</i>
Spesies	: <i>Mucor miehei</i>

Jamur dari ordo *Mucorales* ini berada di tanah, bahan organik dan kotoran hewan herbivora. Jamur ini dimanfaatkan manusia dalam berbagai industri untuk sintesis asam organik dan alkohol (Alves, 1995). *Mucor miehei* merupakan jamur yang berfilamen, penampakan fisiknya berwarna abu-abu, tidak memiliki rhizoid, bersifat non patogenik dan non toksik pada manusia dan hewan (Jay, 1991).

2.3 Alginat dan Kitosan Sebagai Media Pengamobil

2.3.1 Alginat

Alginat ($C_6H_8O_6$)_n adalah polimer yang terdiri dari ikatan residu β -(1 \rightarrow 4)-D-Asam manuronat (M) dan residu ikatan α -(1 \rightarrow 4)-L-Asam guluronat (G). Struktur Alginat menurut Hawley (1987), sesuai dengan Gambar 2.2.



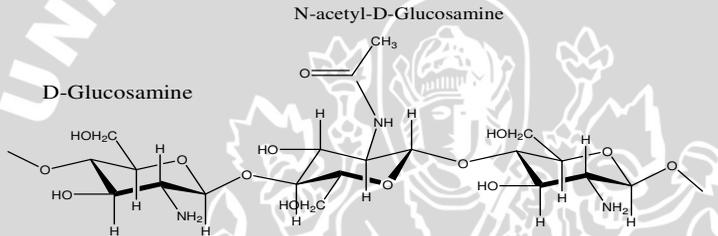
Gambar 2.2 Struktur alginat

Salah satu senyawa turunan dari alginat adalah Na-Alginat yang mempunyai sifat terdispersi dalam air, tetapi bila telah bereaksi

dengan garam kalsium membentuk Ca-Alginat yang tidak larut dalam air, dan juga tidak larut dalam alkohol, eter, kloroform (Hawley, 1987).

2.3.2 Kitosan

Kitosan adalah polimer polisakarida dari kitin yang terdiri lebih dari 5000 unit glukosamin dan asetilglukosamin, serta mempunyai berat molekul lebih dari satu juta Dalton. Secara komersial kitin didapatkan dari exoskeleton (kutikula) dari hewan bertulang keras (ketam, udang dan hewan laut lainnya). Kitosan didapatkan melalui proses deasetilasi dari kitin (Kleinberg, dkk., 2001). Struktur Kitosan menurut Knight (2007) sesuai dengan Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur kitosan

Kitosan merupakan polikationik dalam media asam ($pK_a = 6,5$). Kitosan memiliki kelarutan yang rendah dalam air, asam sulfat, larutan basa dan larutan organik. Dalam larutan asam, gugus amino bebas pada molekul kitosan akan terprotonasi dengan mudah menjadi $-NH_3^+$ dan dapat berinteraksi membentuk suatu ikatan silang dengan molekul bermuatan negatif (Devika dan Varsha, 2006).

2.4 Amobilisasi dengan Ca-alginat-kitosan

Amobilisasi dengan menggunakan carrier Na-alginat yang bersifat polianion merupakan salah satu metode yang paling banyak dilakukan, karena murah dan mudah tata caranya. Amobilisasi dilakukan pada suhu kamar yang menggunakan $CaCl_2$ (Suhartono, 1989).



Pembentukan gel Ca-Alginat disebabkan oleh kation kalsium bivalen dari $CaCl_2$ bereaksi dengan monovalen anion karboksilat

alginat yang akan membentuk jaringan tiga dimensi (Glicsman, 1982).

Amobilisasi ini dilakukan setelah pengebakan dengan alginat, enzim dijawab dengan menggunakan kitosan untuk membentuk amobilisasi bilayer. Sebelumnya gel Ca-Alginat yang terbentuk disuspensi ke dalam larutan tripolifosfat yang berfungsi sebagai mediator terbentuknya ikatan antara alginat dan kitosan (Glicsman, 1982).

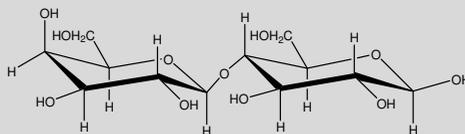
Pembentukan gel Ca-Alginat dan kitosan ini disebabkan oleh muatan positif residu amina dari kitosan bereaksi dengan muatan negatif dari tripolifosfat membentuk ikatan ionik. Tripolifosfat berdifusi ke dalam Ca-Alginat dan kelat ion kalsium berfungsi sebagai adisi pengganti. Kekuatan gel ini akan semakin meningkat dengan kenaikan kitosan yang digunakan (Dautzenberg, 1994).

Sifat polikationik kitosan yang dapat membentuk ikatan silang dengan molekul bermuatan negatif seperti Natrium tripolifosfat, dapat dimanfaatkan dalam meningkatkan amobilisasi enzim dengan membentuk sistem bilayer. Amobilisasi dengan sistem bilayer menggunakan Ca-alginat-kitosan, akan meningkatkan stabilitas enzim terhadap perubahan lingkungan (temperatur, pH) (Taqqieddin dkk., 2002).

2.5 Laktosa

Susu adalah sumber utama dari laktosa. Laktosa merupakan disakarida alamiah yang dijumpai pada binatang menyusui, air susu sapi dan manusia. Laktosa sebagai disakarida tersusun atas glukosa dan galaktosa dan tergolong dalam gula pereduksi (Fessenden dan Fessenden, 1986).

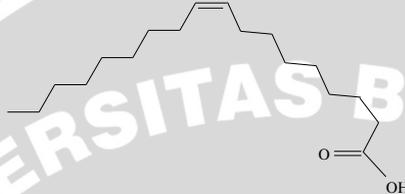
Dalam metabolisme tubuh manusia yang normal, laktosa dihidrolisis secara enzimatik menjadi D-Galaktosa dan D-Glukosa. Struktur laktosa menurut Fessenden dan Fessenden (1986) sesuai dengan Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur Laktosa

2.6 Asam Oleat

Asam oleat adalah asam lemak tak jenuh yang mempunyai rumus molekul $C_{18}H_{34}O_2$ (asam oktadek-9-etanol). Kandungan C 76,54%; H 12,13%; dan O 11,13% (Merk Index, 1989). Struktur asam oleat menurut Harrison (2007), sesuai dengan Gambar 2.5.

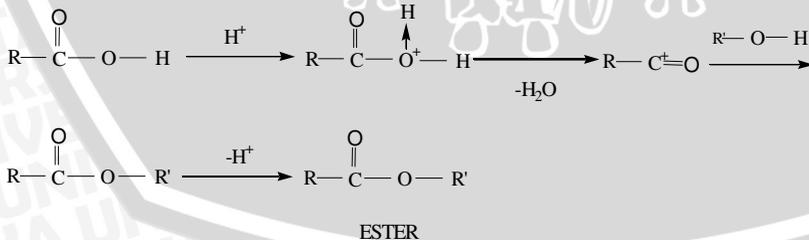


Gambar 2.5 Struktur Asam Oleat

Berat molekul asam oleat adalah 282,46 g/mol, mempunyai titik didih $286^{\circ}C$, titik leleh $4^{\circ}C$, dan densitas 0,895 g/mL pada $25^{\circ}C$. Asam oleat berbentuk cairan minyak berwarna kuning kecoklatan, tidak larut dalam air, larut dalam alkohol. Asam ini stabil dalam kondisi kamar, tetapi dalam udara terbuka asam oleat dapat teroksidasi dan warnanya berubah dari kuning menjadi coklat dengan bau tengik. Asam oleat bebas dapat digunakan dalam industri sabun dan kosmetik, sebagai senyawa penggosok, obat salep, minyak pelumas, sintesis keju, dan mentega, serta dapat digunakan sebagai aroma untuk kue, permen dan es krim (Hawleys, 1987).

2.7 Esterifikasi

Esterifikasi adalah suatu reaksi kimia yang merupakan gabungan dari reaksi adisi dan penataan ulang eliminasi (Tarigan, 2002). Sedangkan menurut Fessenden dan Fessenden (1986), esterifikasi adalah reaksi pembentukan ester dari alkohol dengan asam karboksilat. Reaksi esterifikasi secara umum sesuai dengan Gambar 2.6 (Tarigan, 2002).



Gambar 2.6 Reaksi esterifikasi

2.8 Ester Gula

Pada umumnya ester gula merupakan senyawa sintetik dan sangat jarang ditemui di alam. Ester gula merupakan senyawa yang disintesis dari gula (poli alkohol) dengan asam lemak. Gula yang diesterifikasi dengan asam lemak rantai panjang dapat berfungsi sebagai surfaktan (Kosaric,1993). Surfaktan jenis ini termasuk dalam golongan surfaktan yang penting, karena mempunyai karakter yang baik untuk emulsifier, pelarutan dan pembentukan busa, selain itu senyawa yang ramah lingkungan, dapat dibiodegradasi baik dalam suasana aerob ataupun suasana anaerob, tidak toksis, tidak mengiritasi kulit, tidak berbau dan tidak berasa. Ester gula dapat digunakan dalam beberapa industri terutama bahan makanan, kosmetik dan deterjen untuk keperluan rumah tangga (Khaled, dkk., 1992).

Ester gula dapat dibuat dengan transesterifikasi metil ester dengan gula dengan katalis basa dalam dimetil formamida, tetapi produknya merupakan campuran mono, di, tri dan poliester gula, ester gula spesifik hanya dapat diperoleh dengan melakukan pemisahan yang panjang dan mahal (Weiss, dkk., 1972). Cara lain yang lebih sederhana untuk memproduksi ester gula adalah dengan cara esterifikasi gula dengan asam lemak atau turunan asam lemak yang berasal dari kelapa sawit secara enzimatis, karena reaksi enzim berlangsung spesifik. Secara ekonomis proses ini mempunyai keunggulan karena ester gula yang terbentuk memiliki komponen yang mudah dibiodegradasi dan tidak beracun (Rahman dan Herawan, 2000).

Reaksi esterifikasi gula dengan asam lemak merupakan reaksi yang reversibel, sehingga perbandingan jumlah reaktan akan sangat mempengaruhi hasil reaksi. Gulati, dkk., (2003), pada pembuatan ester sorbitol 1(6)-monostearat memvariasikan sorbitol dan asam stearat pada perbandingan mol (1:1-1:5) dalam pelarut heksana menghasilkan ester sorbitol 1(6)-monostearat maksimum pada perbandingan mol sorbitol dan asam stearat pada 1:4 dengan biokonversi sorbitol 87%. Pada pembuatan fruktosil laurat dalam pelarut n-heksana menghasilkan fruktosil laurat pada perbandingan mol optimum fruktosa dan asam laurat 1:4 dengan konversi 85 %. (Anonymous, 1998).

2.9 Spektrofotometri Inframerah

Spektroskopi Inframerah merupakan metode analisis yang digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional yang dimiliki suatu senyawa. Setiap ikatan kovalen yang terdapat di dalam suatu molekul mengalami vibrasi, yang kisaran energi vibrasinya sama dengan kisaran energi radiasi inframerah. Apabila suatu molekul berinteraksi dengan radiasi inframerah akan terjadi penyerapan terhadap radiasi inframerah yang energinya bersesuaian dengan energi energi vibrasi molekuler. Akibat penyerapan ini, amplitudo vibrasi mengalami penurunan. Hal ini yang mendasari timbulnya spektra inframerah dari suatu molekul yang mengakibatkan molekul mengalami perubahan tingkat energi vibrasi dan tingkat energi rotasi (Day dan Underwood, 2001).

Laktosil oleat dapat diidentifikasi melalui spektra Inframerah yaitu dengan munculnya pita-pita serapan pada daerah 3200-3650 cm^{-1} yang merupakan vibrasi dari ikatan O-H. Pita serapan pada daerah 1730-1750 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari ikatan C=O, sedangkan vibrasi ikatan C-O terletak pada bilangan gelombang 1000-1150 cm^{-1} . Adapun pita serapan pada daerah 2850-3000 cm^{-1} merupakan vibrasi dari ikatan C-H (Sastrohamidjojo, 1985).

2.10 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu metode pemurnian dan pemisahan senyawa berdasarkan pada sifat polaritas senyawa. Pada kromatografi Lapis Tipis, adsorben dilapiskan pada lempeng kaca yang bertindak sebagai penunjang fasa diam. Fasa gerak akan bergerak sepanjang fasa diam sehingga terbentuk kromatogram. Materi pelapis yang biasa digunakan adalah silika gel dan bubuk selulosa. Metode ini sederhana, analisisnya berdasarkan kedudukan noda relatif terhadap permukaan pelarut menggunakan R_f (*Retardation Factor*) yang didefinisikan sebagai berikut (Khopkar, 2003):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fasa gerak}}$$

2.11 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dari penelitian ini yaitu bahwa variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat mempengaruhi pembuatan ester laktosil oleat secara enzimatis. Semakin besar perbandingan mol laktosa dan asam oleat akan meningkatkan hasil reaksi (% konversi laktosa) dan aktivitas enzim.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai September 2007.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Sampel kapang *Mucor miehei* diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

3.2.2 Bahan kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: dekstrosa, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ZnSO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_6\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaOH, asam oleat, n-butanol, fenoltalin 0,1%, laktosa, asam sitrat, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , glukosa, CaCl_2 , Na-tripoliphospat, Na-alginat, kitosan, asam asetat glasial, kasein, semua bahan tersebut kualitas pro analisis (p.a) kecuali ekstrak yeast, kentang, pepton (for biochemistry), nutrien agar (for biochemistry), aseton, kloroform, metanol, kertas saring, akuades.

3.2.3 Alat kimia

Alat penelitian yang digunakan dalam percobaan ini antara lain jarum ose, alat gelas, aluminium foil, bunsen, magnetik stirer, sentrifuge (Juam MR 1889), neraca analitik (mettler Todelo AL 204), pH meter (schott-gerate tipe C6-820), pengaduk magnet, autoklav model no 25 All American, Uv-visible 1601 (merk Zhimadzu) dengan kuvet, shaker (Edmund Buhler SM 25), inkubator (Memmert), oven (Memmert), pembakar spiritus, penangas air (Memmert NR 900660), sentrifuse dingin (merk Denley BR 401), lemari pendingin, dan Spektrofotometer Inframerah (merk Shimadzu).

3.3 Tahapan Penelitian

Metode percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pembuatan laktosil oleat yang terdiri dari lima perlakuan yaitu

memvariasikan perbandingan mol laktosa dan asam oleat (1:2; 1:4; 1:6; 1:8; 1:10).

Rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan media padat
2. Penanaman biakan murni
3. Pembuatan media cair
4. Pembuatan inokulum
5. Produksi dan isolasi enzim lipase
6. Amobilisasi ekstrak kasar lipase dengan Ca-alginat-kitosan
7. Penentuan pengaruh perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada pembuatan laktosil oleat
8. Identifikasi laktosil oleat dengan spektrofotometer Inframerah dan Kromatografi Lapis Tipis

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan media padat

Media yang digunakan agar dekstroza kentang PDA, yang terdiri atas: kentang 50 gram, dekstroza 5 gram, agar 5 gram, akuades 200 mL. Kentang dipotong kecil-kecil, direbus dalam akuades selama 1 jam kemudian disaring dengan kertas saring, filtrat di tambah dekstroza. Larutan didinginkan dan pHnya diatur dengan menambahkan asam sitrat sampai pH 5 kemudian ditambahkan larutan buffer sitrat fosfat pH 5 sebanyak 20 mL. Setelah itu larutan ditambah tepung agar dididihkan sampai larut. Larutan di atas dipipet 5 mL dimasukkan dalam tabung, disterilkan dalam autoklav pada temperatur 121°C, 15 psi selama 15 menit. Disimpan dalam temperatur kamar dalam keadaan miring dan dibiarkan memadat.

3.4.2 Penanaman biakan murni

Kapang dari biakan dipindahkan secara aseptik sebanyak 1 mata ose ke dalam media padat steril yang masih kosong. Selama perlakuan, mulut tabung disterilkan di atas pembakar bunsen. Selanjutnya diletakkan dalam inkubator pada temperatur 40° C selama 4 hari.

3.4.3 Pembuatan media cair

Media pertumbuhan *Mucor miehei* untuk menghasilkan enzim lipase terdiri atas pepton 0,75 g, ekstrak yeast 2,5 g, NaCl 2,50 g,

KH_2PO_4 6,7 g, K_2HPO_4 8,4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, larutan aktivator 0,5 mL. Kondisi pH diatur hingga 5 dengan penambahan asam sitrat. Ditambah larutan buffer sitrat fosfat pH 5 hingga volume 400 mL. Lalu tiap 200 mL larutan tersebut dituangkan ke dalam erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan 15 mL asam oleat ke dalam masing-masing erlenmeyer. Semua erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas. Selanjutnya disterilkan dengan autoklav pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit.

Laktosa 5 g dan dekstrosa 5 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, lalu tiap 50 mL larutan dituang ke dalam erlenmeyer 250 mL. Semua erlenmeyer ditutup kapas dan kertas lalu disterilkan dengan autoklav pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit. Setelah itu larutan didinginkan pada temperatur ruang kemudian masing-masing larutan dipindah ke dalam larutan pertama.

3.4.4 Pembuatan inokulum

Kapang yang telah tumbuh dalam setiap media padat miring berumur 4 hari ditambahkan dengan akuades steril sebanyak 10 mL, kemudian dikocok. Kemudian suspensi spora ini dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL media cair, diinkubasi pada temperatur kamar dengan pengocokan pada shaker dengan kecepatan 150 rpm sampai setengah fase log (24 jam) (Anugrawati, 2007). Suspensi spora ini berfungsi sebagai inokulum.

3.4.5 Produksi dan isolasi enzim lipase

Dua buah erlenmeyer 500 mL masing-masing diisi 250 mL media cair steril ditambah 30 mL larutan inokulum secara aseptis dan diinkubasi pada temperatur kamar dalam shaker hingga awal fase stasioner yaitu 96 jam (Prabowo, 2007). Isolasi lipase dilakukan dengan menambahkan 25 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5 ke dalam dua buah erlenmeyer yang berisi campuran biakan tersebut. Kemudian campuran biakan dan buffer disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm pada temperatur 4 °C selama 1 jam. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar lipase.

3.4.6 Penentuan kurva baku larutan kasein

Disiapkan 9 tabung reaksi, kemudian masing-masing diisi dengan 2 mL larutan baku kasein dengan konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 ppm. Masing-masing tabung ditambah 8 mL pereaksi Biuret dan 2 mL larutan buffer

dikocok dan didiamkan selama 30 menit selanjutnya diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis. Untuk masing-masing larutan sebelumnya ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimum pada konsentrasi 833,333 ppm. Hasil pengukuran absorbansi pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi liniernya sehingga dihasilkan kurva baku larutan kasein.

3.4.7 Penentuan kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Kadar protein lipase amobil ditentukan dengan metode Biuret, dengan cara 2 mL ekstrak kasar lipase ditambah 2 mL larutan kasein, dan 8 ml pereaksi Biuret dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur kamar. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kadar protein dengan memplotkan absorbansi enzim terhadap kurva baku larutan kasein.

3.4.8 Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (0,0360 g : 0,317 mL) dicampur dan dimasukkan erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya larutan n-butanol 5 mL, 0,5 gram ekstrak kasar lipase, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator goyang dengan temperatur 50 °C. Setelah itu ditambahkan indikator fenolftalin 0,1% sebanyak 3 tetes, dititrasi dengan larutan KOH 0,1949 M sampai larutan berwarna merah muda. Dilakukan ulangan sebanyak 3 kali dengan perlakuan sama seperti di atas. Untuk blanko dibuat sama seperti di atas, namun tanpa dilakukan inkubasi.

Aktifitas enzim lipase didefinisikan sebagai jumlah mikrogram dari asam lemak yang bereaksi dengan laktosa membentuk laktosil oleat pergram enzim permenit pada kondisi optimumnya. Rumus yang digunakan untuk menghitung aktifitas enzim lipase yaitu :

$$\text{Aktivitas} = \frac{M \text{ KOH} \times (V \text{ KOH}_{\text{blanko}} - V \text{ KOH}_{\text{sampel}})}{W_E \times t} \times \text{BM}_{\text{asamoleat}}$$

Keterangan :

M KOH : Konsentrasi larutan KOH = 0,1949 M

V KOH_{blanko} : Volume titrasi yang digunakan untuk blanko

V KOH_{sampel} : Volume titrasi yang digunakan untuk sampel

BM_{asam oleat} : 282,470 mg/mmol

t : Waktu inkubasi = 1440 menit

W_E : berat ekstrak kasar lipase = 500 mg

3.4.9 Amobilisasi ekstrak kasar enzim lipase dengan Ca-alginat-kitosan

Amobilisasi ekstrak kasar lipase dilakukan dengan cara 20 mL larutan Na-alginat 3% w/v dicampur dengan 15 mL larutan ekstrak kasar lipase dan diaduk dengan menggunakan stirer. Campuran ekstrak kasar lipase dan larutan Na-alginat ini diteteskan dengan pipet tetes pada gelas beaker 250 mL yang berisi 50 mL larutan CaCl_2 0,1 M sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Kemudian ekstrak kasar lipase amobil dalam Na-alginat yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,1 M selama 1 jam. Ekstrak kasar lipase amobil dalam Ca-alginat dipisahkan dari larutan dengan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh lipase amobil serta filtrat merupakan campuran larutan CaCl_2 yang mengandung enzim tidak terjebak. Setelah itu dilakukan pencucian dengan akuades terhadap enzim amobil. Kemudian ekstrak kasar lipase amobil dalam Ca-alginat yang telah dicuci tersebut disuspensikan ke dalam larutan kitosan konsentrasi 2% w/v. Ekstrak kasar lipase amobil dalam Ca-alginat diambil dengan menggunakan pipet plastik yang telah dimodifikasi kemudian diteteskan ke dalam larutan natrium tripolifosfat 3% w/v dan direndam selama 15 menit. Kemudian ekstrak kasar lipase amobil dalam Ca-alginat-kitosan direndam dalam larutan natrium tripolifosfat 1% selama 90 menit, dan dicuci dengan akuades.

3.4.10 Penentuan kadar protein ekstrak kasar lipase amobil

Kadar protein ekstrak kasar lipase amobil ditentukan dengan metode Biuret, dengan cara penentuan kadar protein ekstrak kasar lipase amobil yang ditentukan dari kadar protein ekstrak kasar lipase awal dikurangi kadar protein tidak terjebak. Untuk menentukan kadar protein tidak terjebak, maka 2 mL filtrat ekstrak kasar lipase amobil setelah penyaringan ditambah 2 mL larutan kasein, dan 8 mL pereaksi Biuret dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur kamar. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai blanko dipipet 2 mL air ditambah 8 mL pereaksi Biuret dan 2 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5. Kadar protein dengan memplotkan absorbansi enzim terhadap kurva baku larutan kasein.

3.4.11 Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada pembuatan ester laktosil oleat

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; dan 1:10 (0,0360 g : 0,063 mL; 0,0360 g : 0,124 mL; 0,0360 g : 0,190 mL; 0,0360 g : 0,254 mL; 0,0360 g : 0,317 mL) dicampur dan dimasukkan erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya larutan n-butanol 5 mL, 0,5 gram ekstrak kasar lipase amobil, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator goyang dengan temperatur 50 °C. Setelah itu ditambahkan indikator fenolftalin 0,1% sebanyak 3 tetes, dititrasi dengan larutan KOH 0,1949 M sampai larutan berwarna merah muda. Dilakukan ulangan sebanyak 3 kali dengan perlakuan sama seperti di atas. Untuk blanko dibuat sama seperti di atas, namun tanpa dilakukan inkubasi.

3.4.12 Identifikasi senyawa hasil esterifikasi dengan spektrofotometer Inframerah

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (0,0360 g : 0,317 mL) dicampur dan dimasukkan erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya larutan n-butanol 5 mL, 0,5 g ekstrak kasar lipase amobil, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator goyang pada temperatur 50 °C. Setelah diinkubasi, larutan dipisahkan dari sisa reaksi esterifikasi dan enzim lipase amobil melalui proses penyaringan. Kemudian pelarut diuapkan untuk memperoleh produk. Produk dikristalisasi dengan menambahkan aseton hangat (40°C) dan dibiarkan 24 jam dalam refrigerator (Rahman dan Hermawan, 2000). Setelah terbentuk kristal, larutan disaring dengan kertas saring. Kristal yang dihasilkan kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer Inframerah.

3.4.13 Identifikasi senyawa hasil esterifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa hasil esterifikasi sebanyak 1 mg ditambah dengan 1 mL kloroform kemudian ditotolkan pada plat silika sebanyak 3 kali. Diletakkan dalam bejana pengembang dan dielusi dengan larutan pengembang selama 30 menit. Noda hasil elusi ditentukan dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm sehingga dapat ditentukan nilai Rf-nya.

3.5. Analisa Data

Data yang diperoleh dari variasi perbandingan mol antara laktosa dan asam oleat dianalisis dengan menggunakan analisis ragam pola rancangan acak lengkap sederhana (RAL), dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) 5 % yang dapat dilihat pada lampiran 12.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

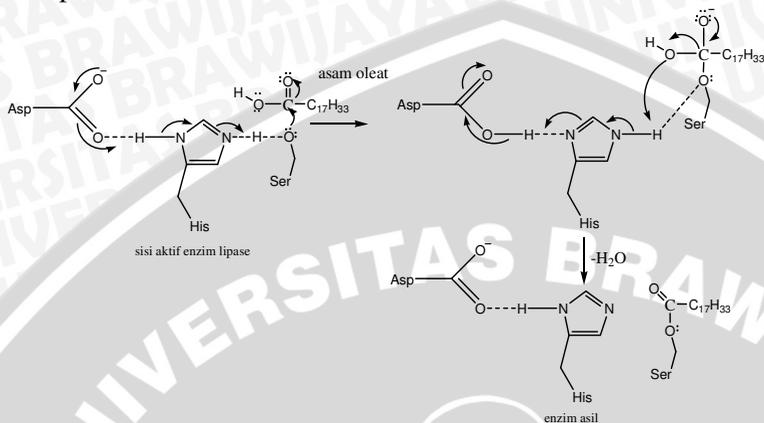
4.1 Pengaruh Variasi Perbandingan mol Laktosa dan Asam Oleat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Reaksi esterifikasi gula dengan asam lemak merupakan reaksi yang reversibel, sehingga perbandingan konsentrasi reaktan akan sangat mempengaruhi hasil reaksi. Pada penelitian ini dilakukan variasi perbandingan mol antara laktosa dan asam oleat yaitu 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; dan 1:10. Pada perbandingan mol ini, mol laktosa dibuat tetap yaitu satu sedangkan yang divariasi adalah mol asam oleat. Hal ini disebabkan laktosa memiliki 8 gugus hidroksi yang berkompetisi bereaksi dengan asam oleat untuk membentuk laktosil oleat. Dalam penelitian ini, proses esterifikasi antara laktosa dan asam oleat menggunakan katalis lipase amobil.

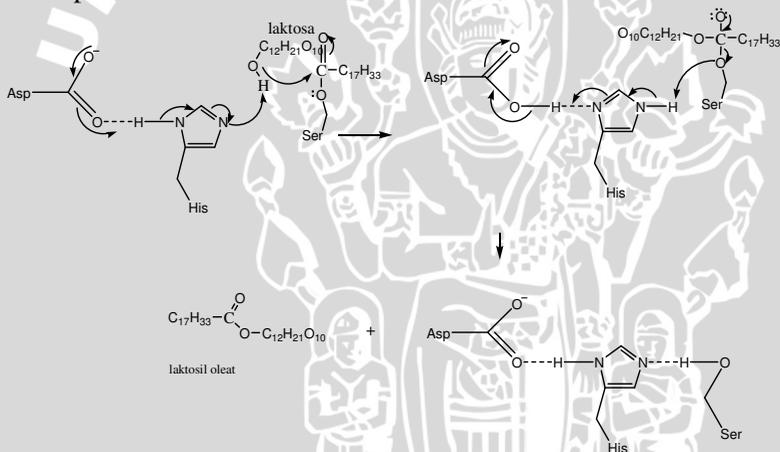
Enzim lipase memiliki tiga macam asam amino yang merupakan sisi aktif lipase dan berperan dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi. Tiga macam asam amino itu antara lain asam aspartat, histidin dan serin. Pada proses esterifikasi enzim lipase bukan sebagai enzim hidrolase melainkan sebagai enzim asil transferase yang berfungsi untuk mengkatalisis pemindahan gugus antara dua substrat yang berbeda.

Mekanisme esterifikasi secara enzimatik oleh lipase terdiri dari dua tahap yaitu tahap asilasi dan tahap deasilasi. Pada tahap asilasi, histidin mendeprotonasi rantai samping hidroksi dari serin dan menyerang atom C karbonil dari asam oleat dan mengalami reaksi penataan ulang. Pada tahap asilasi ini dihasilkan enzim asil dan H₂O. H₂O ini berasal dari gugus OH asam oleat dan H dari serin. Pada tahap deasilasi gugus N dari histidin membentuk ikatan hidrogen dengan serin dan OH pada laktosa menyerang atom C asam oleat sehingga terbentuk produk ester laktosil oleat dan enzim lipase dapat diperoleh kembali. Tahap asilasi berjalan dengan lambat, pada tahap ini semakin banyak enzim yang mengikat asam oleat, maka pada tahap deasilasi akan semakin banyak laktosa yang bereaksi dengan asam oleat, Sehingga produk ester yang dihasilkan semakin banyak pula. Mekanisme reaksi esterifikasi yang dapat diajukan adalah seperti pada Gambar 4.1(Wong, 1995).

1. Tahap asilasi



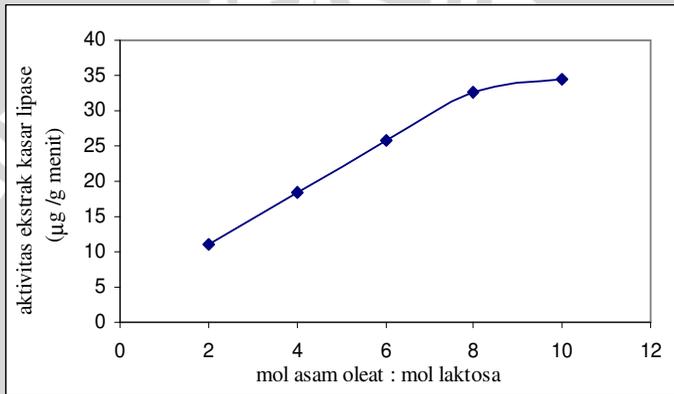
2. Tahap deasilasi



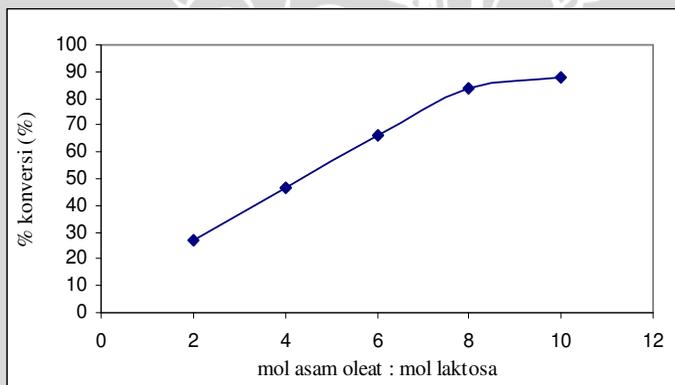
Gambar 4.1 Mekanisme Esterifikasi Laktosil oleat

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam mengkatalisis esterifikasi secara kuantitatif berdasarkan jumlah asam oleat yang bereaksi dengan laktosa membentuk laktosil oleat. Pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil cenderung meningkat dengan meningkatnya perbandingan mol antara laktosa dan asam oleat. Hal ini juga didukung oleh Gambar 4.3 yang menunjukkan bahwa % konversi laktosa juga cenderung meningkat dengan meningkatnya perbandingan mol antara laktosa dan asam oleat. Namun, perbandingan 1:8 dan 1:10 tidak ada peningkatan yang signifikan. Berdasarkan hasil analisa

secara statistik diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}$ (taraf nyata $\alpha = 0,05$) yang menunjukkan bahwa variasi mol laktosa dan asam oleat berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil. Pada uji BNT 5% (Tabel L.12.3) menunjukkan bahwa perbandingan mol laktosa dan asam oleat memberikan beda nyata terhadap perbandingan mol laktosa dan oleat 1:2; 1:4; 1:6; dan 1:8. Sedangkan perbandingan mol laktosa dan asam oleat 1:8 tidak berbeda nyata dengan perbandingan mol 1:10.



Gambar 4.2 Kurva aktivitas ekstrak kasar lipase pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat



Gambar 4.3 Kurva % konversi laktosa pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat

Aktivitas lipase amobil pada perbandingan mol 1:2 - 1:8 cenderung meningkat karena jumlah asam oleat yang ditambahkan

semakin banyak. Selain itu, semakin banyak asam oleat yang ditambahkan akan menyebabkan pembentukan enzim lipase-asam oleat semakin banyak dan hal ini mengakibatkan semakin banyak pula asam oleat yang terikat pada laktosa sehingga produk ester yang dihasilkan juga semakin meningkat. Pada perbandingan 1:8 dan 1:10 tidak ada peningkatan aktivitas yang signifikan. Hal ini terjadi karena setelah mencapai keadaan optimumnya yaitu pada perbandingan mol laktosa dan asam oleat yaitu 1:8, peningkatan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada perbandingan mol laktosa dan asam oleat 1:10 semakin kecil sebab kompetisi antara gugus OH pada laktosa yang bereaksi dengan asam oleat telah berkurang, selain itu kemungkinan semua asam oleat terikat dengan laktosa dan keadaan menjadi jenuh, sehingga penambahan asam oleat tidak meningkatkan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil secara signifikan.

4.2 Analisis Senyawa Hasil Esterifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pemisahan berdasarkan polaritas senyawa. Metode ini didasarkan pada kedudukan noda relatif terhadap permukaan pelarut menggunakan Rf. Pada analisis ini, dilakukan dengan membandingkan nilai Rf laktosa dan asam oleat dengan senyawa hasil esterifikasi. Pada penelitian ini, fasa diam yang digunakan adalah silika gel sedangkan fasa gerak yang digunakan adalah kloroform : metanol : asam asetat glasial : air (40:5:4:1) (Khaled, dkk.,1992).

Tabel 4.1 Nilai Rf asam oleat, laktosa dan senyawa hasil esterifikasi dari Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa	Rf	
	Hasil analisis	Pustaka
Asam oleat	0,8472	0,93
Laktosa	0,0972	1,3
Hasil esterifikasi	0,1549	--

Pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa nilai Rf yang paling besar adalah asam oleat karena pergerakan molekul asam oleat pada fasa gerak cepat. Hal ini disebabkan asam oleat memiliki kesamaan

dengan fasa gerak yaitu bersifat non polar. Laktosa memiliki nilai R_f yang kecil karena laktosa merupakan senyawa yang bersifat polar, sehingga pergerakan molekulnya pada fasa gerak sangat lambat. Adapun nilai R_f senyawa hasil esterifikasi yang lebih besar dari pada laktosa dan lebih kecil dari pada asam oleat karena pergerakan molekulnya pada fase gerak relatif lebih cepat dari pada laktosa dan lebih lambat dari asam oleat, sehingga senyawa hasil esterifikasi lebih bersifat non polar dari pada laktosa dan lebih polar dari pada asam oleat.

Nilai R_f asam oleat dan laktosa dari hasil analisis berbeda dengan pustaka. Hal ini disebabkan oleh perbedaan jenis dan komposisi larutan pengembang yang digunakan. Menurut Chyntia (2008), larutan pengembang yang digunakan untuk analisis asam oleat adalah kloroform : metanol : asam asetat : air (9:6:3:1), sedangkan larutan pengembang yang digunakan pada analisis laktosa adalah kloroform : metanol : air (60:35:8) (Yasutake, dkk., 2004).

4.3 Analisis Senyawa Hasil Esterifikasi dengan Spektra Inframerah

Analisis spektrofotometer Inframerah dilakukan dengan membandingkan spektra asam oleat dan laktosa dengan senyawa hasil esterifikasi. Tujuan dari analisis ini adalah untuk mengetahui bahwa laktosil oleat telah terbentuk. Berdasarkan spektra tersebut menunjukkan pada senyawa hasil esterifikasi muncul beberapa puncak yang khas sesuai dengan gugus fungsi yang ada pada ester, yaitu gugus C=O dan gugus C-O. Pita-pita tersebut muncul pada bilangan gelombang tertentu yang dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Sesuai dengan Gambar L.14.4 dapat dilihat bahwa senyawa hasil esterifikasi yang terbentuk ditunjukkan dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang $1708,81 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan vibrasi C=O dengan intensitas yang lemah. Intensitas yang lemah ini disebabkan konsentrasi senyawa hasil esterifikasi yang kecil, hal ini dimungkinkan karena ester yang diperoleh belum murni dan masih banyak pengotor yang tercampur pada senyawa hasil esterifikasi. Pengotor yang ada kemungkinan adalah n-butanol dan air. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya pita serapan pada bilangan gelombang $3382,91 \text{ cm}^{-1}$ yang intensitasnya masih tajam dan lebar, dan munculnya pita C-O dari alkohol yang berada di daerah sekitar $1033,77 \text{ cm}^{-1}$.

Tabel 4.2 Interpretasi Spektra Inframerah (Sastrohamidjojo, 1985):

Vibrasi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})			
	Laktosa	Asam oleat	Senyawa hasil esterifikasi	Korelasi
C=O	Tidak ada	1720,19	1708,81	1730–1750
C–O ester	Tidak ada	Tidak ada	1259,43	1200-1300
O–H	3452,57	3247,54	3382,91	3200–3650
C–O alkohol	1144,79	Tidak ada	1033,77	1000-1150
C–H	2926,78	2954,41	2915,84	2850–3000
C=C	Tidak ada	Overlap dengan pita C=O	1652,88	1620-1680
C–C	1442,43	1450,21	1428,19	1375–1465

Munculnya pita serapan pada $1259,43 \text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi stretching asimetris C–O ester yang mendukung keberadaan gugus ester pada senyawa hasil esterifikasi. Pita-pita kuat disekitar $2915,84 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ikatan C–H dalam CH_2 atau CH_3 . Pita serapan di sekitar $1428,19 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ikatan C–C. Munculnya pita serapan pada bilangan gelombang $1652,88 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi C=C dari ester karena senyawa hasil esterifikasi disintesis dari asam oleat yang memiliki vibrasi C=C yang pita serapannya kemungkinan overlap dengan pita C=O karena pita serapan C=C dari asam oleat seharusnya muncul pada panjang gelombang $1620-1680 \text{ cm}^{-1}$.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Perbandingan mol antara laktosa dan asam oleat berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil. Semakin besar perbandingan mol laktosa dan asam oleat, maka aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dan % konversi laktosa semakin meningkat. Perbandingan mol laktosa dan asam oleat 1:8 menghasilkan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil yang optimum yaitu 32,6 $\mu\text{g/g}$ menit dengan konversi laktosa sebesar 83,87%.
2. Senyawa hasil esterifikasi dianalisis dengan spektrofotometer Inframerah dan Kromatografi Lapis Tipis. Adanya senyawa ester ditunjukkan dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang 1708,81 cm^{-1} (ikatan ester C=O), 3382,91 cm^{-1} (ikatan O-H), 2915,84 cm^{-1} (ikatan C-H), 1259,43 cm^{-1} (ikatan ester, C-O), 1652,88 cm^{-1} (ikatan alkena C=C), dan 1442,19 cm^{-1} (ikatan C-C). Nilai Rf senyawa hasil esterifikasi adalah 0,1549.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya, sebaiknya dilakukan proses pemurnian produk ester dengan metode yang lain, sehingga diharapkan mendapatkan ester yang lebih murni dan dapat dikarakterisasi lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Alves, M. H., K. Okada, I. H. F. Pessoa, dan A. I. Millanez, 2005, *Detection of Extracelullar Protease in Mucor Species*, Journal of Microbiology, pp 114-117
- Anonymous, 1998, Production of Sugar Fatty Acid Esters from Renewable Agricultural Resources: *An Integrated Optimazation of Enzymatic Purification Processes and of Surfactive Properties*, BioMatnet Item; AIR3-CT94-2291
- Anugrawati, R. 2007, *Penentuan suhu dan waktu inkubasi Optimum Aktivitas Lipase Dari Rhizopus oryzae Untuk Pembuatan Ester Laktosa*, Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
- Charlie, M.J., dan Wilkinson, 1994, *Fungi*, Academic Press, London
- Chintya, 2008, *Chromatography of Lipid*, www.uvm.edu/~clittle/-hw/lab6.doc, diakses tanggal 25 Juni 2008
- Chibata, I., H. Horitsu, S. Adachi, dan Y. Takashi, 1978, *Immobilized Enzymes*, John Willey and Sons Inc., New York, hal.191-197, 219
- Day, R.A. dan A.L. Underwood, 2001, *Analisa Kimia Kuantitatif*, Edisi Keempat, Cetakan Keempat, Erlangga, Jakarta
- Dautzenberg, H., W. Jaeger, J. Kotz, B. Philip, Ch. Seidel, dan D. Sischerbina, 1994, *Polyelectrolytes Formation, Characterization and Application Card Hanser Verlag*, Munich, Chapter2, p.11-84, chapter 7, pp.272-320
- Devika, R.B dan D.R. Varsha, 2006, *Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note*, AAPS PharmSciTech, 7(2):1-10.
- Faber, K., 1995, *Biotransformation in Organic chemistry*, Spinger, Berlin, pp 69-80
- Fardiaz, 1992, *Microbiologi Pangan*, PAU Pangan dan Gizi, IPB Bogor, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta

- Fessenden, R.J., dan J.S. Fessenden, 1986, Kimia Organik Jilid 2, Edisi Ketiga, Alih Bahasa: A.H.Pudjaatmaka, Erlangga, hal 351
- Glicksman, M., 1982, *Food Hydrocolloid*, CRC Press Inc., Florida, pp.13-14
- Gulati, R., P. Arya, B. Malhotra, A.K. Prasad, R.K. Saxena, J., Kumar, A.C. Watterson dan V.S. Parmar, 2003, Novel Biocatalytic Esterification Reactions on Fatty acids: *Syntesis of sorbitol 1(6)-monostearate*, Arkivoc.159-170
- Hawley's, G. 1987. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 7th ed., Van Nostran Reinhold, New York, pp. 143 dan 870
- Harrison, K., 2007, *Oleic Acid Unsaturated Fatty Acid*, <http://www.-3dchem.com/molecules.asp?ID=384>, diakses tanggal: 8 Desember 2007
- Jay, J.M. 1991. *Modern Food Biotechnology*, fourth ed., Van Nostrand Reinhold, New York
- Khaled, N., D. Montet, M. Farines, M. Pina, dan J. Graille, 1992, *Shynteses de Monoesters de Sucre par Biocatalyse*, Oleagineux, Vol. 47(4):181-189
- Khopkar, S.M., 2003, *Konsep Dasar Kimia Analitik*, Penerbit UI Press, Jakarta
- Klinkenberg, G., K.Q. Lystad, dan D.W. Levine, 2001, *Cell Release from Alginate Immobilized Lactococcus lactis ssp. lactis in Chitosan and Alginate Coated Beads*. J. Dairy Science, 84:1118-1127.
- Knight, 2007, Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomedical material Research Part A*, 83:787-798.
- Kosaric, N., 1993, *Biosurfactants*, Marcel Decker Inc., New York
- Kuang, D., O.J. Obaje, dan A.M. Ali, 2000, *Syntesis and Characterization of Acetylated Glucose'Fatty Esters from Palm and Palm Kernel Oil Fatty Methyl Esters*, J. Oil Palm Res. 12 (2)117-122

- Martoharsono, S., 1983, *Biokomia*, Jilid 1, UGM Press
- Prabowo, H., 2007, *Optimasi produksi lipase dari *Mucor miehei* Untuk Esterifikasi Laktosa*, Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
- Rahman, R.A. dan T. Herawan, 2000, *Properties of Biosurfactant Enzymatically Prepared from Fructose and Palm Oil Fatty Acid*, J. Oil Palm Res. 12 (1)14-19
- Sastrohamidjojo, H., 1985, *Spektroskopi*, Liberty, Yogyakarta, hal 99-100
- Smith, J. E., 1995, *Biotechnology*, edisi 2, Alih bahasa: Andry Hartono, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 76-81
- Taqquiedin, E., L. Carolin, dan A. Mansoor, 2002, *Perm-Selective Chitosan Alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology*, The Official Journal of ISPE, 22(6):1-3.
- Tarigan, J.B., 2002, *Ester Asam Lemah*, Digitilized by USU Digital Library, <http://library.usu.ac.id/download/-Fmipa-/Kimia-Juliati.pdf>, diakses tanggal 8 Desember 2007
- Trisna, N.H., 2007, *Pengaruh Konsentrasi Kitosan dalam Amobilisasi *Tricoderma viridae* menggunakan Ca-alginat-Kitosan terhadap Aktivitas Selulase*, Skripsi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang, hal. 27-45
- Suhartono, T.M., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Dirjen Dikti Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor, Hal 40-43
- Saxena, R.K., P.K. Ghosh, R. Gupta, W.S. Davidson, S. Bradoo, dan R. Gulati, 2001, *Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for the Future Industry*, Journal of Biotechnology
- Wang, N.S., 2007, *Protocol Entrapment In Alginate Gel*, <http://www.glue.umd.edu/hsw/ench485/labTbhtm>, diakses tanggal: 8 Desember 2007

Weiss, T.J., M. Brown, R.O. Feuge, dan H.J. Zeringue, 1972, *Influence of Solvent on Degree of Acylation in the Formation of Sucrose esters*, J.Am. Oil Chem Soc., 49:524

Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd ed., Ellis Harwood Limited, England

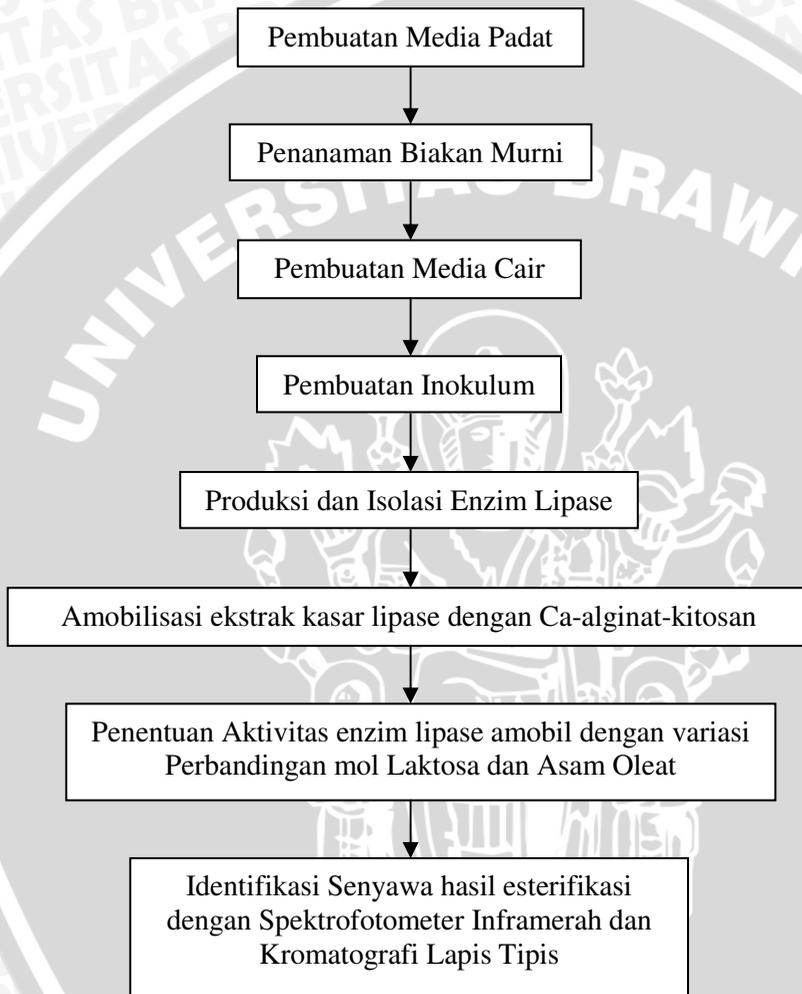
Wong, D.W.S., 1995, *Food Enzyme: Structure and Mechanism*, Chapman and Hall, New York

Yasutake, N., S. Miyoshi, T. Usui, T. Murata, dan K. Totani, 2004, *Process for Producing Glycoside*, Bioschi. Biotechnol. Biochem., 64(9), pp. 1821-1826



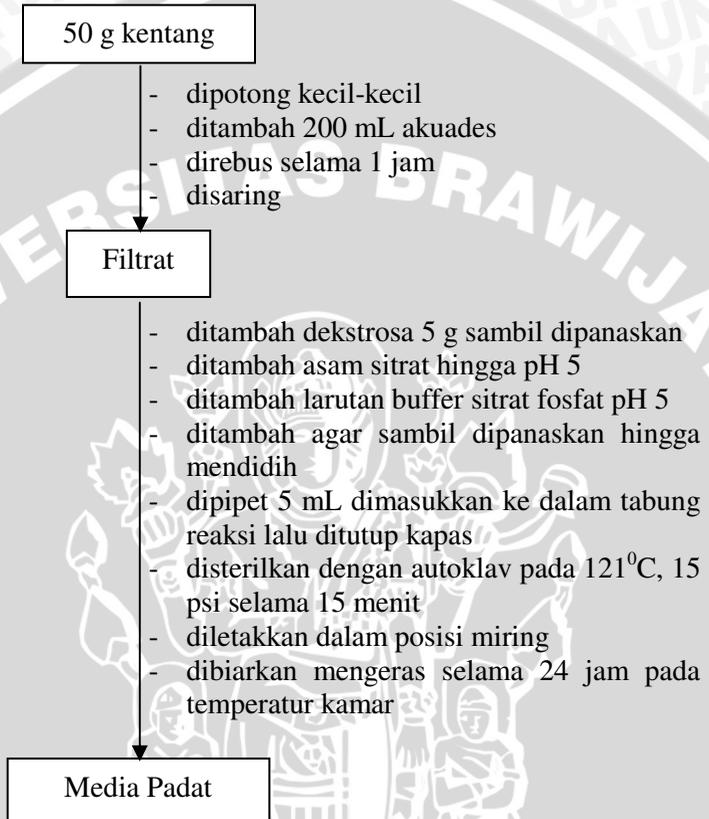
LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Diagram Kerja Penelitian

L.2.1 Pembuatan Media Padat



L.2.2 Penanaman Biakan Murni

Kultur murni *Mucor miehei*

- dipindahkan secara aseptik sebanyak 1 mata ose ke dalam tabung reaksi yang berisi media padat
- dibakar mulut tabung dengan api dari bunsen, kemudian ditutup dengan kapas
- diinkubasi selama 4 hari pada temperatur 40 °C

Hasil biakan



L.2.3 Pembuatan Media Cair

Pepton 0,75 g, ekstrak yeast 2,5 g, NaCl 2,5 g, KH_2PO_4 6,7 g, K_2HPO_4 8,4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, larutan aktivator 0,5 mL

- dilarutkan dalam 350 mL akuades
- ditambah asam sitrat hingga pH 5
- ditambah larutan buffer sitrat fosfat hingga volume 400 mL
- dituang tiap 200 mL larutan ke dalam 2 erlenmeyer 500 mL
- ditambah 15 mL asam oleat ke dalam tiap erlenmeyer
- ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklav pada 121°C , 15 psi selama 15 menit

Laktosa 5 g dan dekstrosa 5 g

- dilarutkan dalam 100 mL akuades
- dituang tiap 50 mL larutan ke dalam erlenmeyer 250 mL
- ditutup kapas dan kertas
- disterilkan dalam autoklav pada 121°C , 15 psi selama 15 menit

- dicampurkan tiap 50 mL larutan laktosa dan dekstrosa ke dalam larutan pertama

Media Padat

L.2.4 Pembuatan Inokulum

Kapang dari media padat

- ditambah 10 mL akuades steril dan dikocok
- dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL media cair
- diinkubasi pada temperatur kamar dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam

Larutan inokulum

L.2.5 Produksi dan Isolasi Enzim Lipase

Larutan inokulum

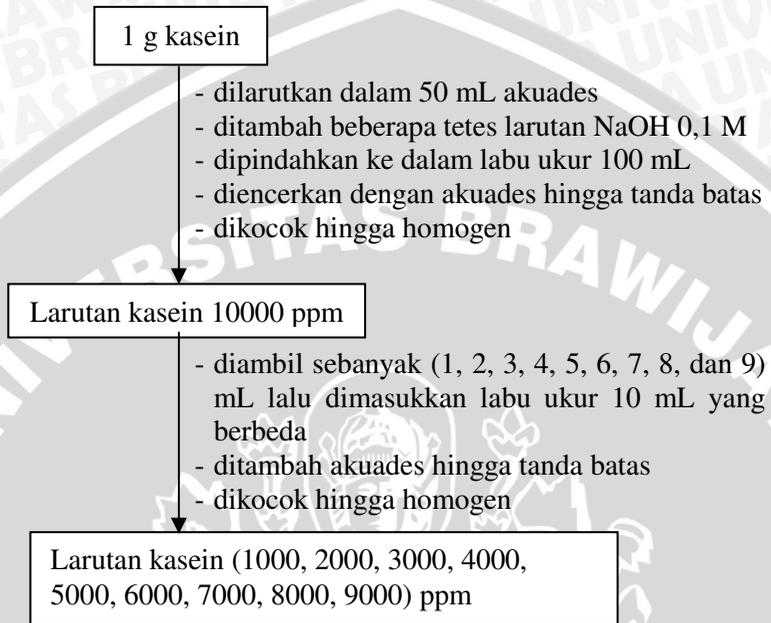
- dipindahkan secara aseptis ke dalam 2 buah erlenmeyer masing-masing berisi 250 mL media cair steril
- diinkubasi pada temperatur kamar dalam shaker selama 96 jam

Hasil inkubasi

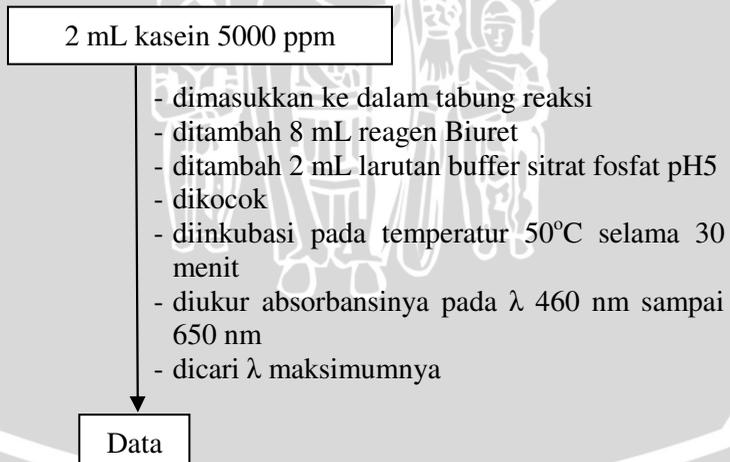
- ditambah masing-masing 25 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5
- disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 jam pada temperatur 4⁰C

Ekstrak kasar lipase

L.2.6 Pembuatan Larutan Stok Kasein 10000 ppm



L.2.7 Penentuan λ maks Kasein



L.2.8 Penentuan Kurva Baku Kasein

2 mL larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 8 mL reagen Biuret
- ditambah 2 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5
- dikocok
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ 540 nm

Data

L.2.9 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Lipase sebelum Amobilisasi

2 mL ekstrak kasar lipase

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 2 mL larutan kasein 5000 ppm
- ditambah 8 mL reagen biuret
- dikocok
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ 540 nm
- diplotkan pada kurva baku larutan kasein

Data

L.2.10 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase sebelum Amobilisasi

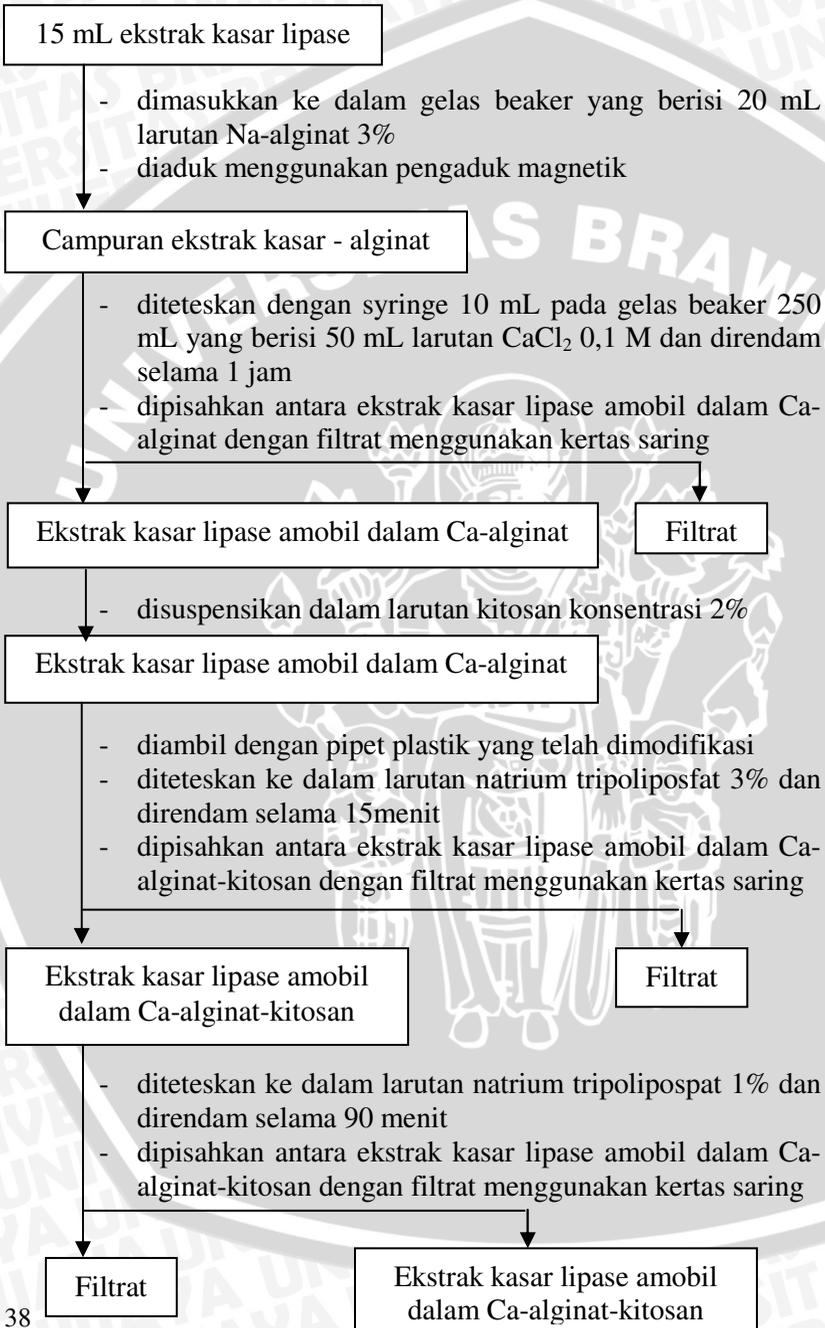
Laktosa : asam oleat (1:10)

- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL n-butanol
- ditambah 0,5 g ekstrak kasar enzim lipase
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 24 jam
- ditambah 3 tetes fenolftalein 0,1 %
- dititrasi dengan larutan KOH 0,1949 M sampai berwarna merah muda

Hasil



L.2.11 Amobilisasi Ca-alginat-kitosan



L.2.12 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Lipase setelah Amobilisasi

2 mL filtrat

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 2 mL larutan kasein 5000 ppm
- ditambah 8 mL reagen biuret
- dikocok
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ 540 nm
- diplotkan pada kurva baku larutan kasein

Data

L.2.13 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase setelah Amobilisasi

Laktosa : asam oleat (1:10)

- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL n-butanol
- ditambah 0,5 g enzim amobil
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 24 jam
- ditambah 3 tetes fenolftalein 0,1 %
- dititrasi dengan larutan KOH 0,1949 M sampai berwarna merah muda

Hasil

L.2.14 Penentuan Pengaruh Rasio Mol Laktosa dan Asam oleat pada Pembuatan Laktosil Oleat

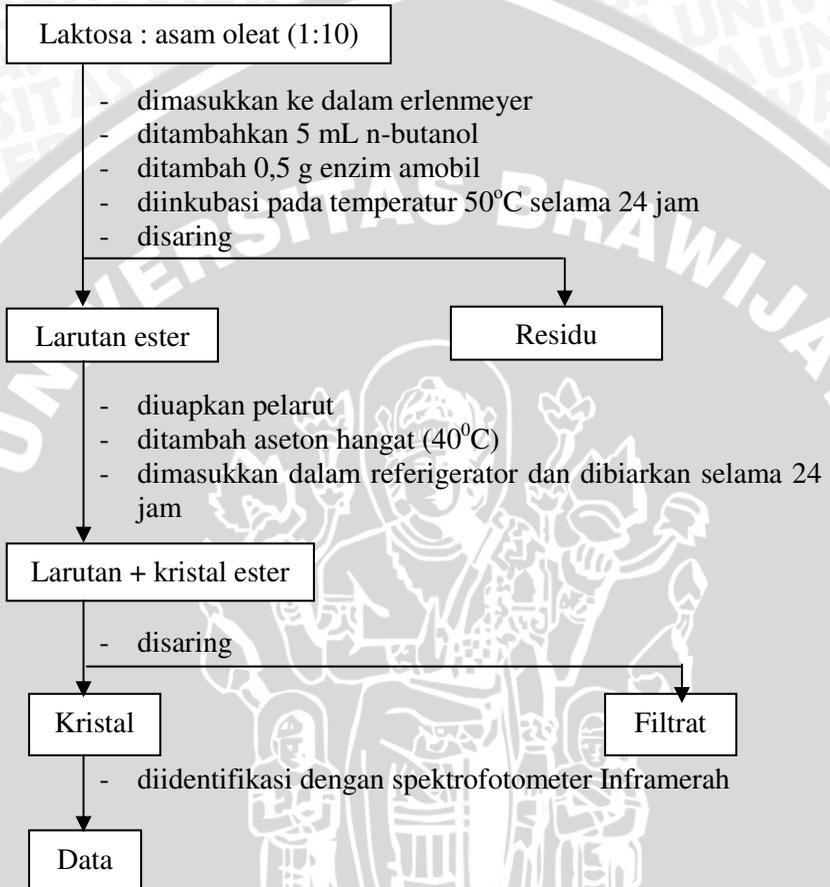
Laktosa : asam oleat (1:2, 1:4, 1:6, 1:8, dan 1:10)

- dimasukkan ke dalam 5 erlenmeyer yang berbeda
- ditambahkan 5 mL n-butanol
- ditambah 0,5 g enzim amobil
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 24 jam
- ditambah 3 tetes fenolftalein 0,1 %
- dititrasi dengan larutan KOH 0,1949 M sampai berwarna merah muda

Hasil



L.2.15 Identifikasi Senyawa Hasil esterifikasi dengan Spektrofotometer Inframerah



L.2.16 Identifikasi Senyawa hasil Esterifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

1 mg ester laktosil oleat hasil sintesis

- ditambahkan 1 mL kloroform
- ditotolkan pada plat silika sebanyak 3 kali
- dikeringkan
- diletakkan dalam bejana pengembang
- dielusi dengan larutan pengembang selama 30 menit
- dikeringkan

Noda hasil elusi

- disinari lampu UV pada λ 254 nm
- ditentukan Rf-nya

data

Lampiran 3. Preparasi Larutan

3.1 Larutan Asam Sitrat 0,1 M

Ditimbang 1,92 gram asam sitrat kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.2 Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,2 M

Ditimbang 2,84 gram asam sitrat kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.2 Larutan Buffer Sitrat Fosfat pH 5

Sebanyak 100 mL larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dimasukkan dalam gelas beaker, lalu kedalamnya dimasukkan pengaduk magnetik. Elektroda dipasang dan dicelupkan dalam larutan. Dilakukan penambahan asam sitrat sedikit demi sedikit ke dalam larutan hingga mencapai pH 5.

3.3 Larutan Aktivator

Komposisi bahan-bahan larutan aktivator sebagai berikut:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,22 gram

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,05 gram

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = 0,016 gram

Semua bahan dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 mL dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.4 Larutan Stok Kasein 10000 ppm

Ditimbang 1 gram kasein, kemudian dilarutkan dengan akuades 50 mL dalam gelas beaker dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M hingga kasein larut, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.5 Larutan Standar Kasein

Disiapkan 9 buah labu ukur 10 mL, masing-masing labu ukur diisi dengan larutan stok kasein 10000 ppm sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; dan 9,0 mL. kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000 ppm.

3.6 Pereaksi Biuret

Ditimbang 0,15 gram $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan 0,60 gram NaKC_4O_6 , dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian ditambahkan 30 mL NaOH 10% sambil diaduk. Selanjutnya dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.7 Larutan Indikator Fenolftalein 0,1%

Ditimbang 0,1 gram fenolftalein, dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 50 mL dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian dituangkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan etanol 70% sampai tanda batas.

3.8 Larutan KOH 0,2 M

Ditimbang 2,8 gram KOH , dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 100 mL dalam gelas beaker 250 mL. Kemudian dituangkan dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan dengan etanol 70% sampai tanda batas.

3.9 Pembakuan Larutan KOH 0,2 M

Ditimbang 1,26 gram asam oksalat dihidrat dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 mL dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Dipipet 10 mL larutan asam oksalat dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan 3 tetes indikator fenolftalein 0,1 %, dititrasi dengan larutan KOH 0,2 M sampai larutan berwarna merah muda dan dicatat volume KOH yang digunakan. Dilakukan 3 kali.

3.10 Larutan Asam asetat 0,1 M

Dipipet 0,57 mL asam asetat glasial, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

3.11 Larutan Kitosan 2% (w/v)

Ditimbang 2 gram kitosan, dilarutkan dengan larutan asam asetat 0,1 M sebanyak 100 mL dalam gelas beaker 250 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik.

3.12 Pembuatan larutan Na-alginat 3% (w/v)

Ditimbang 3 gram Na-alginat, dilarutkan dengan 100 mL akuades dalam gelas beaker 250 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik.

3.13 Larutan Na-tripolifosfat 3% (w/v)

Ditimbang 3 gram Na-tripolifosfat kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.14 Larutan Na-tripolifosfat 1% (w/v)

Ditimbang 1 gram Na-tripolifosfat kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.15 Larutan CaCl₂ 0,1 M

Ditimbang 1,47 gram CaCl₂ kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

3.16 Larutan Pengembang untuk Kromatografi Lapis Tipis

Dipipet akuades sebanyak 0,4 mL ditambah dengan 1,6 mL asam asetat glasial, 16 mL kloroform dan 2 mL metanol. Dimasukkan ke dalam bejana pengembang dan ditutup rapat. Dibiarkan selama 4 jam atau sampai larutan pengembang jenuh.

Lampiran 4. Perhitungan Preparasi Larutan

4.1 Larutan Asam Sitrat ($C_6H_8O_7$) 0,1 M

Larutan Asam Sitrat 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (BM $C_6H_8O_7 = 192,06$ g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{Mol } C_6H_8O_7 &= [C_6H_8O_7] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat } C_6H_8O_7 &= \text{mol } C_6H_8O_7 \times \text{BM } C_6H_8O_7 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 192,06 \text{ g/mol} \\ &= 1,92 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, asam sitrat yang harus ditimbang untuk membuat larutan asam sitrat 0,1 M adalah 1,92 gram.

4.2 Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,2 M

Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM $Na_2HPO_4 = 142$ g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{Mol } Na_2HPO_4 &= [Na_2HPO_4] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat } Na_2HPO_4 &= \text{mol } Na_2HPO_4 \times \text{BM } Na_2HPO_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol} \\ &= 2,84 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, dinatrium hidrogen fosfat yang harus ditimbang untuk membuat larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M adalah 2,84 gram.

4.3 Pembuatan Buffer Sitrat Fosfat pH 5

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan dibuat dengan mencampur larutan asam sitrat dan larutan dinatrium hidrogen fosfat, berdasarkan persamaan dibawah ini:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{Garam}]}{[\text{Asam}]}$$

Misalkan untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 5, larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 100 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah:

$$pK_a \text{ Asam sitrat} = 4,62$$

$$5 = 4,62 + \log \frac{(100 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/L})}{(V \times 0,1 \text{ mmol/L})}$$

$$0,38 = \log \frac{20 \text{ mL}}{0,1 V}$$

$$2,399 = \frac{20 \text{ mL}}{0,1 V}$$

$$V = 83,37 \text{ mL}$$

4.4 Pembuatan larutan KOH 0,2 M

Larutan KOH 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL dalam larutan etanol 70 % (BM KOH = 56 g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned} \text{Mol KOH} &= [\text{KOH}] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \\ &= 0,05 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat KOH} &= \text{mol KOH} \times \text{BM KOH} \\ &= 0,05 \text{ mol} \times 56 \text{ g/mol} \\ &= 2,8 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi, KOH yang harus ditimbang untuk membuat larutan KOH 0,2 M adalah 2,8 gram.

4.5 Pembuatan larutan asam asetat 0,1 M

Larutan asam asetat 0,1 M dibuat dari asam asetat 98% (Bj : 1,05 g/mL; BM : 60 g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi asam asetat} &= \frac{\text{Berat jenis}}{\text{BM}} \\ &= \frac{1,05 \text{ g/mL} \times 1000 \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 17,5 \text{ M} \end{aligned}$$

Untuk membuat konsentrasi 0,1 M dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 17,5 &= 100 \times 0,1 \\ V_1 &= 0,57 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, asam asetat 98% yang dipipet sebanyak 0,57 mL

4.6 Pembuatan larutan CaCl_2 0,1 M

Larutan CaCl_2 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (BM:147 g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{mol CaCl}_2 &= [\text{CaCl}_2] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol} \\ \text{g CaCl}_2 &= \text{mol CaCl}_2 \times \text{BM CaCl}_2 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 147 \text{ g/mol} \\ &= 1,47 \text{ g}\end{aligned}$$

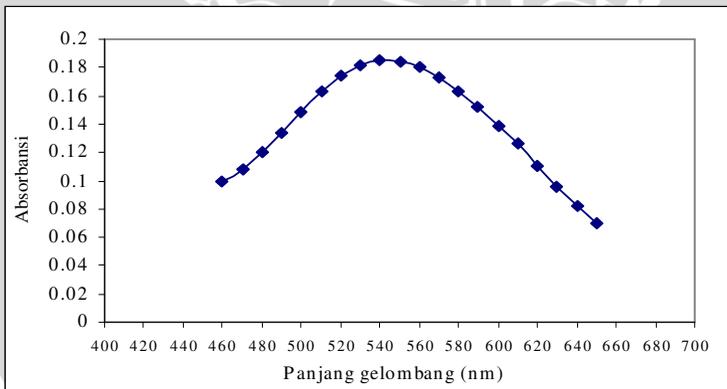
Jadi CaCl_2 yang harus ditimbang untuk membuat larutan CaCl_2 0,1 M adalah 1,47 gram.



Lampiran 5. Penentuan Panjang Gelombang Kasein

Tabel L.5.1 Data absorbansi larutan baku kasein 833,33 ppm

λ (nm)	Absorbansi		Rerata
	1	2	
460	0,100	0,097	0,099
470	0,109	0,107	0,108
480	0,121	0,119	0,120
490	0,135	0,132	0,134
500	0,150	0,147	0,149
510	0,164	0,161	0,163
520	0,175	0,172	0,174
530	0,183	0,180	0,182
540	0,186	0,183	0,185
550	0,185	0,182	0,184
560	0,181	0,178	0,180
570	0,174	0,171	0,173
580	0,164	0,162	0,163
590	0,153	0,151	0,152
600	0,140	0,138	0,139
610	0,126	0,125	0,126
620	0,111	0,110	0,111
630	0,096	0,096	0,096
640	0,081	0,082	0,082
650	0,069	0,070	0,070

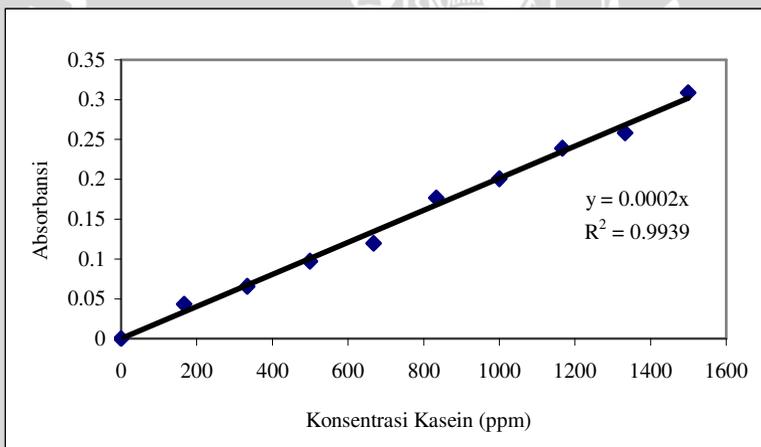


Gambar L.5.1 Kurva absorbansi larutan kasein

Lampiran 6. Pembuatan Kurva Baku Larutan Kasein

Tabel L.6.1 Data absorbansi larutan baku kasein λ 540 nm

Kasein (ppm)	A1	A2	A3	Rerata
0	0	0	0	0
166,667	0,042	0,042	0,045	0,043
333,333	0,067	0,063	0,069	0,066
500,000	0,098	0,093	0,100	0,097
666,667	0,123	0,120	0,116	0,120
833,333	0,180	0,174	0,176	0,177
1000,000	0,206	0,196	0,200	0,201
1166,667	0,237	0,241	0,239	0,239
1333,333	0,255	0,266	0,255	0,258
1500,000	0,308	0,310	0,310	0,309



Gambar L.6.1 Kurva baku larutan kasein

Lampiran 7. Pembakuan Larutan KOH

Tabel L.7.1 Pembakuan larutan KOH 0,2 M dengan larutan asam oksalat 0,1 M

Volume asam oksalat (mL)	Volume KOH (mL)			Rerata (mL)
	1	2	3	
10	10,25	10,30	10,25	10,267

Konsentrasi larutan asam oksalat:

$$\frac{W_{\text{asam oksalat}}}{BM_{\text{asam oksalat}}} = \frac{1,26\text{g}}{126\text{g/mol}} = 0,01\text{mol}$$

$$M_{\text{asam oksalat}} = \frac{0,01\text{mol}}{100 \times 10^{-3}\text{ L}} = 0,1\text{M}$$

Reaksi antara asam oksalat dengan KOH:



1 mol asam oksalat akan bereaksi dengan 2 mol KOH, sehingga:

$$M_{\text{KOH}} = \frac{2 \times \text{volume asam oksalat} \times M_{\text{asam oksalat}}}{\text{volume KOH}}$$
$$= \frac{2 \times 10\text{mL} \times 0,1\text{M}}{10,267\text{mL}} = 0,1949\text{M}$$

Lampiran 8. Perhitungan aktivitas ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

$$\text{Aktivitas} = \frac{M \text{ KOH} \times (V_{\text{KOH blanko}} - V_{\text{KOH sampel}})}{W_E \times t} \times \text{BM}_{\text{asamoleat}}$$

Keterangan :

M KOH : Konsentrasi larutan KOH = 0,1949 M

V KOH_{sampel} : Volume larutan KOH yang digunakan untuk sampel

V KOH_{blanko} : Volume larutan KOH yang digunakan untuk blanko

W_E : Berat enzim = 500 mg

t : Waktu inkubasi = 1440 menit

BM_{asamoleat} : 282,470 mg/mmol

Tabel L.8.1 Volume larutan KOH blanko pada titrasi ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Analit	Volume KOH (mL)			Rerata (mL)
	1	2	3	
Blanko	7,20	7,20	7,10	7,167
Sampel	6,85	6,85	6,65	6,783

Contoh perhitungan aktivitas enzim lipase amobil:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{M \text{ KOH} \times (V_{\text{KOH blanko}} - V_{\text{KOH sampel}})}{W_E \times t} \times \text{BM}_{\text{asamoleat}} \\ &= \frac{0,1949 \text{ M} \times (7,20 \text{ mL} - 6,85 \text{ mL})}{500 \text{ mg} \times 1440 \text{ menit}} \times 282,470 \text{ mg/mmol} \\ &= 26,7621 \text{ } \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

Keterangan:

aktivitas ekstrak kasar lipase adalah banyaknya μg asam oleat yang bereaksi dengan laktosa per gram enzim lipase dalam setiap menit.

Tabel L.8.2 Aktivitas ekstrak kasar lipase

Protein	Volume KOH _{blanko- sampel} (mL)			Aktivitas ($\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata
	1	2	3	1	2	3	
Ekstrak kasar lipase	0,35	0,35	0,45	26,7621	26,7621	34,4084	29,3109

Lampiran 9. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Lipase

L.9.1 Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

L.9.1.1 Kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi ditentukan melalui konversi nilai absorbansi ekstrak kasar lipase pada kurva baku kasein

Diketahui persamaan regresi kasein :

$$Y = 2.10^{-4}X$$

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar kasein _{5000 ppm} yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$2 \text{ mL} \times 5000 \text{ ppm} = 12 \text{ mL} \times C_2$$

$$C_2 = 833,333 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Protein Enzim + Konsentrasi kasein
833,333 ppm

Contoh perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase dengan absorbansi 0,475 adalah:

$$Y = 2.10^{-4}X$$

$$0,475 = 2.10^{-4}X$$

$$X = 2375 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein yang ditambahkan
= 2375 ppm - 833,333 ppm
= 1541,667 ppm
= 1,542 mg/mL

Sehingga jumlah ekstrak kasar lipase = 1,542 mg/mL x $\frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}$
= 9,250 mg/mL

Tabel L.9.1 Kadar protein ekstrak kasar lipase

Absorbansi			Rerata	Kadar protein (mg/mL)			Rerata (mg/mL)
1	2	3		1	2	3	
0,475	0,476	0,474	0,475	9,250	9,280	9,220	9,250

L.9.2 Penentuan jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa kadar protein enzim bebas sebelum amobilisasi adalah 9,250 mg/mL ekstrak kasar lipase, sehingga jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi dapat ditentukan dengan rumus berikut:

$$W = \text{kadar protein ekstrak kasar lipase} \times V \text{ ekstrak kasar lipase}$$

Keterangan:

V : volume ekstrak kasar lipase yang digunakan untuk amobilisasi

W : jumlah ekstrak kasar lipase mula-mula sebelum amobilisasi (mg)

Maka jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi adalah:

$$W = 9,250 \times 15 \text{ mL} = 138,750 \text{ mg}$$

Tabel L.9.2.1 Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Protein	Volume (mL)			Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	1	2	3	
Ekstrak kasar lipase	15	15	15	138,750	139,200	138,300	138,750

L.9.3 Jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

Tabel L.9.3.1 Volume larutan ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

Filtrat ekstrak kasar lipase	Volume Filtrat (mL)			Rerata (mL)
	1	2	3	
Setelah direndam dalam larutan CaCl_2 0,1 M	68	67	68	68
Setelah direndam larutan Natripolifosfat 3%	64	63	63	63
Setelah direndam larutan Natripolifosfat 1%	71	70	72	71

Volume filtrat yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan kasein $_{5000 \text{ ppm}}$ yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi ekstrak kasar lipase yang tidak terjebak dengan persamaan regresi kasein.

Contoh perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dengan volume filtrat dalam Ca-alginat 68 mL dan nilai absorbansinya 0,198 adalah:

Diketahui persamaan regresi :

$$Y = 2.10^{-4}X$$

$$0,198 = 2.10^{-4}X$$

$$X = 1216 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = konsentrasi protein enzim + konsentrasi kasein
833,333 ppm

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein yang ditambahkan
= 1216 ppm - 833,333 ppm
= 156,667 ppm
= 0,157 mg/mL

Diketahui volume filtrat setelah amobilisasi dalam Ca-alginat 68 mL sehingga jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi:

$$382,667 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 68 \text{ mL} = 64,056 \text{ mg}$$

Tabel L.9.3.2 Absorbansi larutan ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

Filtrat ekstrak kasar lipase	Absorbansi			Rerata
	1	2	3	
Setelah direndam dalam larutan CaCl ₂ 0,1 M	0,198	0,199	0,199	0,199
Setelah direndam larutan Na-tripolifosfat 3%	0,181	0,181	0,182	0,181
Setelah direndam larutan Na-tripolifosfat 1%	0,176	0,176	0,175	0,176

Tabel L.9.3.3 Jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

Filtrat ekstrak kasar lipase	Jumlah ekstrak kasar lipase (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	
Setelah direndam dalam larutan CaCl_2 0,1 M	64,056	64,990	65,960	65,002
Setelah direndam larutan Natripolifosfat 3%	27,520	27,090	28,980	27,863
Setelah direndam larutan Natripolifosfat 1%	19,880	19,600	18,000	19,160

L.9.4 Penentuan jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat-kitosan

Untuk menentukan jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat-kitosan dilakukan dengan mengurangi jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat dengan jumlah ekstrak kasar lipase yang terlepas dari Ca-alginat-kitosan

$$W_{\text{terjebak}} = W_{\text{dalam Ca-alginat}} - W_{\text{yang terlepas}}$$

Keterangan:

$W_{\text{dalam Ca-alginat}}$: jumlah ekstrak kasar lipase dalam Ca-alginat (mg)

$W_{\text{yang terlepas}}$: jumlah ekstrak kasar lipase yang terlepas setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan (mg)

Jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat ditentukan dengan mengurangi jumlah ekstrak kasar lipase bebas sebelum amobilisasi dengan jumlah ekstrak kasar lipase yang terlepas dalam Ca-alginat

W : jumlah ekstrak kasar lipase bebas - jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terjebak dalam Ca-alginat

Keterangan:

W : jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat

Tabel L.9.4.1 Jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

Ekstrak kasar lipase yang terjebak	Jumlah ekstrak kasar lipase (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	
Setelah direndam dalam larutan CaCl ₂ 0,1 M	74,694	73,760	72,790	73,748
Setelah direndam larutan Natripolifosfat 3%	47,174	46,670	43,810	45,885
Setelah direndam larutan Natripolifosfat 1%	27,294	27,070	25,810	26,725

Jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam setiap gram (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{W_{\text{terjebak}}}{W_c}$$

Keterangan:

W_{terjebak} : jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat kitosan (mg)

W_c : berat enzim amobil (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) setelah amobilisasi (g)

Contoh perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam setiap gram (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) dengan W_c sebesar 15,894 g dan W_{terjebak} sebesar 27,294 mg adalah:

$$= \frac{27,294 \text{ mg}}{15,894 \text{ g}} = 01,717 \text{ mg/g}$$

Tabel L.9.4.2 Berat enzim amobil

Berat enzim amobil (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) (g)			Rerata (g)
1	2	3	
15,894	15,904	15,770	15,856

Tabel L.9.4.3 Jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam setiap gram (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase)

Jumlah ekstrak kasar lipase tiap gram (Ca-alginat-kitosan+ekstrak kasar lipase) (mg/g)			Rerata (mg/g)
1	2	3	
1,717	1,702	1,637	1,685

Berat (ekstrak kasar lipase + Ca-alginat-kitosan) yang digunakan pada saat pengukuran aktivitas = 0,5 g. Sehingga jumlah ekstrak kasar lipase dalam 0,5 g (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$= \frac{0,5 \text{ g}}{W_c} \times W_{\text{terjebak}}$$

Keterangan:

W_{terjebak} : jumlah ekstrak kasar lipase yang terjebak dalam Ca-alginat kitosan (mg)

W_c : berat enzim amobil (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) (g)

Contoh perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi dalam 0,5 g (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) dengan W_c sebesar 15,894 g

$$= \frac{0,5 \text{ g}}{15,894 \text{ g}} \times 27,294 \text{ mg} = 0,859 \text{ mg}$$

Tabel L.9.4.4 Jumlah ekstrak kasar lipase dalam 0,5 g (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase)

Jumlah ekstrak kasar lipase dalam 0,5 gram (Ca-alginat-kitosan+ekstrak kasar lipase) (mg)			Rerata (mg)
1	2	3	
0,859	0,851	0,818	0,843

Lampiran 10. Perhitungan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

$$\text{Aktivitas} = \frac{M_{\text{KOH}} \times (V_{\text{KOH blanko}} - V_{\text{KOH sampel}})}{W_E \times t} \times BM_{\text{asamoleat}}$$

Keterangan :

- M KOH : Konsentrasi larutan KOH = 0,1949 M
 V KOH_{sampel} : Volume larutan KOH yang digunakan untuk sampel
 V KOH_{blanko} : Volume larutan KOH yang digunakan untuk blanko
 W_E : Berat enzim amobil = 500 mg
 t : Waktu inkubasi = 1440 menit
 BM_{asamoleat} : 282,470 mg/mmol

Tabel L.10.1 Volume larutan KOH blanko pada titrasi ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi

Perbandingan mol laktosa dan asam oleat	Volume titrasi KOH (mL)			Rerata (mL)
	1	2	3	
1 : 2	1,21	1,25	1,19	1,22
1 : 4	2,23	2,26	2,20	2,23
1 : 6	3,15	3,21	3,19	3,18
1 : 8	4,44	4,50	4,46	4,47
1 : 10	5,25	5,27	5,22	5,25

Tabel L.10.2 Volume larutan KOH sampel pada titrasi ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi

Perbandingan mol laktosa dan asam oleat	Volume titrasi KOH (mL)			Rerata (mL)
	1	2	3	
1 : 2	1,08	1,11	1,03	1,07
1 : 4	1,98	2,02	1,97	1,99
1 : 6	2,83	2,87	2,84	2,85
1 : 8	4,02	4,05	4,05	4,04
1 : 10	4,82	4,83	4,75	4,80

Contoh perhitungan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada perbandingan mol laktosa dan asam oleat 1:2 dengan volume blanko 1,22 mL dan volume sampel 1,07 mL adalah:

$$\text{Aktivitas} = \frac{M_{\text{KOH}} \times (V_{\text{KOH blanko}} - V_{\text{KOH sampel}})}{W_E \times t} \times BM_{\text{asamoleat}}$$

$$= \frac{0,1949M \times (1,21mL - 1,08mL)}{500mg \times 1440 \text{ menit}} \times 282,470mg/mmol$$

$$= 9,9402 \mu g/g \text{ menit}$$

Keterangan:

aktivitas ekstrak kasar lipase adalah banyaknya μg asam oleat yang bereaksi dengan laktosa per gram ekstrak kasar enzim lipase + Ca-alginat-kitosan dalam setiap menit.

Tabel 10.3 Aktivitas enzim lipase amobil pada variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat

Perbandingan mol laktosa dan asam oleat	Volume KOH _{blanko-sampel} (mL)			Aktivitas ($\mu g/g$ menit)			Rerata
	1	2	3	1	2	3	
1 : 2	0,13	0,14	0,16	9,9402	10,7048	12,2341	10,9597
1 : 4	0,25	0,24	0,23	19,1158	18,3511	17,5865	18,3511
1 : 6	0,32	0,34	0,35	24,4682	25,9974	26,7621	25,7426
1 : 8	0,42	0,45	0,41	32,1145	34,4084	31,3498	32,6242
1 : 10	0,43	0,44	0,48	32,8791	33,6437	36,7022	34,4083

Lampiran 11. Perhitungan % Konversi Laktosa

$$\% \text{ konversi} = \frac{W_{\text{laktosa yang bereaksi}}}{W_{\text{laktosa awal}}}$$

mol laktosa = mol asam oleat

$$\% \text{ konversi} = \frac{M_{\text{KOH}} \times (V_{\text{KOH blanko}} - V_{\text{KOH sampel}})}{W_{\text{laktosa awal}}} \times BM_{\text{laktosa}}$$

Keterangan :

M KOH : Konsentrasi larutan KOH = 0,1949 M

V KOH_{samplel} : Volume larutan KOH yang digunakan untuk sampel

V KOH_{blanko} : Volume larutan KOH yang digunakan untuk blanko

W_{laktosa awal} : Berat laktosa = 36 mg

BM_{laktosa} : 360,280 mg/mmol

Contoh perhitungan % konversi pada perbandingan mol laktosa dan asam oleat 1:2 dengan V_{KOH blanko}-V_{KOH sampel} rata-rata sebesar 0,14 mL adalah:

$$\begin{aligned} \% \text{ konversi} &= \frac{0,1949 \text{ M} \times 0,14 \text{ mL}}{36 \text{ mg}} \times 360,280 \text{ mg/mmol} \times 100\% \\ &= 27,31 \% \end{aligned}$$

Keterangan:

% konversi adalah persentase jumlah mg laktosa yang terkonversi menjadi laktosil oleat per mg laktosa.

Tabel 11.1 % konversi laktosa

Perbandingan mol laktosa dan asam oleat	Volume KOH _{blanko-sampel} (mL)			Rerata (mL)	% Konversi (%)
	1	2	3		
1 : 2	0,13	0,14	0,16	0,14	27,31
1 : 4	0,25	0,24	0,23	0,24	46,81
1 : 6	0,32	0,34	0,35	0,34	66,32
1 : 8	0,42	0,45	0,41	0,43	83,87
1 : 10	0,43	0,44	0,48	0,45	87,77

Lampiran 12. Uji Statistik pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Untuk mengetahui pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil maka harus dianalisis dengan menggunakan pola RAL sebagai berikut:

Tabel L.12.1 Pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Perbandingan mol laktosa dan asam oleat	Aktivitas (µg/g menit)			Rerata
	1	2	3	
1 : 2	9,9402	10,7048	12,2341	10,9597
1 : 4	19,1158	18,3511	17,5865	18,3511
1 : 6	24,4682	25,9974	26,7621	25,7426
1 : 8	32,1145	34,4084	31,3498	32,6242
1 : 10	32,8791	33,6437	36,7022	34,4083

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh setiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung faktor Korelasi

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} = \frac{134144,8493}{15} = 8942,9899$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. $JK_{total} = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$
 $= 10123,3771 - 8942,9899$
 $= 1180,3872$

- b. $JK_{perlakuan} (JK_p) = \left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right] - FK$
 $= 10103,4986 - 8942,9899$

$$= 1160,5087$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK}_{\text{galat percobaan}} (\text{JK}_G) &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\ &= 1180,3872 - 1160,5087 \\ &= 19,8785 \end{aligned}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

$$\begin{aligned} \text{a. Kuadrat Tengah}_{\text{perlakuan}} (\text{KT}_P) &= \frac{\text{JK}_P}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{1160,5087}{4} \\ &= 290,1272 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Kuadrat Tengah}_{\text{galat percobaan}} (\text{KT}_G) &= \frac{\text{JK}_G}{\text{db}_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{19,8785}{10} \\ &= 1,9879 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KT}_P}{\text{KT}_G} = \frac{290,1272}{1,9879} = 145,9466$$

Keterangan : Y_{ij} = aktivitas enzim amobil
 p = banyaknya percobaan
 n = banyaknya ulangan

Tabel L.12.2 Analisis ragam pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	4	1160,5087	290,1272	145,9466	3,48
Galat Percobaan	10	19,8785	1,9879		
Total	14	1180,3872	292,1151		

5. Menghitung nilai BNT 5%

$$\begin{aligned} \text{BNT}(\alpha) &= t_{\text{dbg}}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\ &= 2,228 \sqrt{\frac{2 \times 1,9879}{3}} \\ &= 2,5649 \end{aligned}$$

Tabel L.12.3 Hasil uji BNT 5% pengaruh variasi perbandingan mol laktosa dan asam oleat pada esterifikasi laktosil oleat terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

mol laktosa : asam oleat	mol laktosa : asam oleat	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 8	1 : 10	Notasi
		Rataan					
1 : 2	10,9597	0					a
1 : 4	18,3511	7,3914	0				b
1 : 6	25,7426	14,7829	7,3915	0			c
1 : 8	32,6242	21,6645	14,2731	6,8816	0		d
1 : 10	34,4083	23,4486	16,0572	8,6657	1,7842	0	d

Lampiran 13. Perhitungan nilai Rf Laktosa, Asam oleat, dan senyawa hasil esterifikasi dari hasil Kromatografi Lapis Tipis

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fasa gerak}}$$

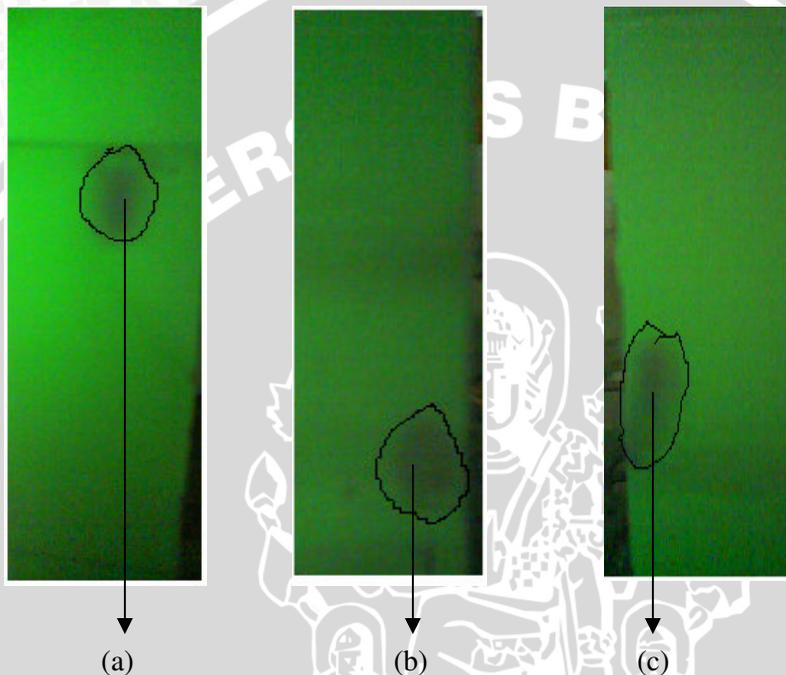
Contoh perhitungan nilai Rf asam oleat:

$$R_f = \frac{6,1 \text{ cm}}{7,2 \text{ cm}} = 0,8472$$

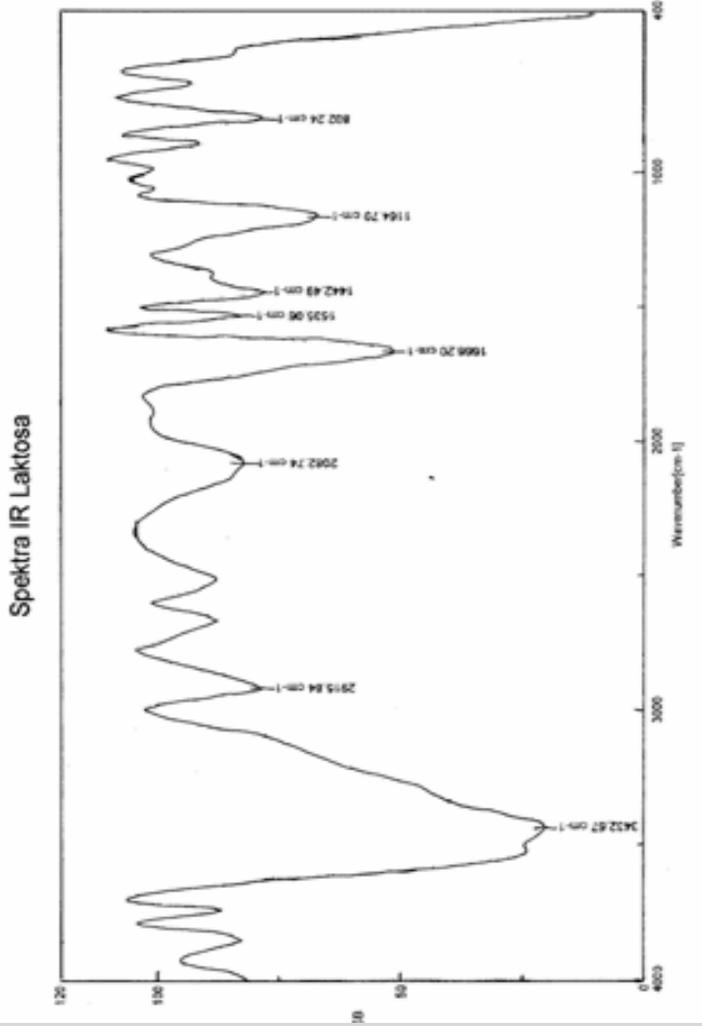
Tabel L.13.1 Nilai Rf dari asam oleat, Laktosa, dan senyawa dari hasil esterifikasi hasil Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa	Jarak yang ditempuh (cm)		Rf
	Senyawa	Fasa gerak	
Asam oleat	6,1	7,2	0,8472
Laktosa	0,7	7,2	0,0972
Senyawa hasil Esterifikasi	1,1	7,1	0,1549

Lampiran 14. Gambar Noda Hasil Kromatografi Lapis Tipis dan Spektra Inframerah

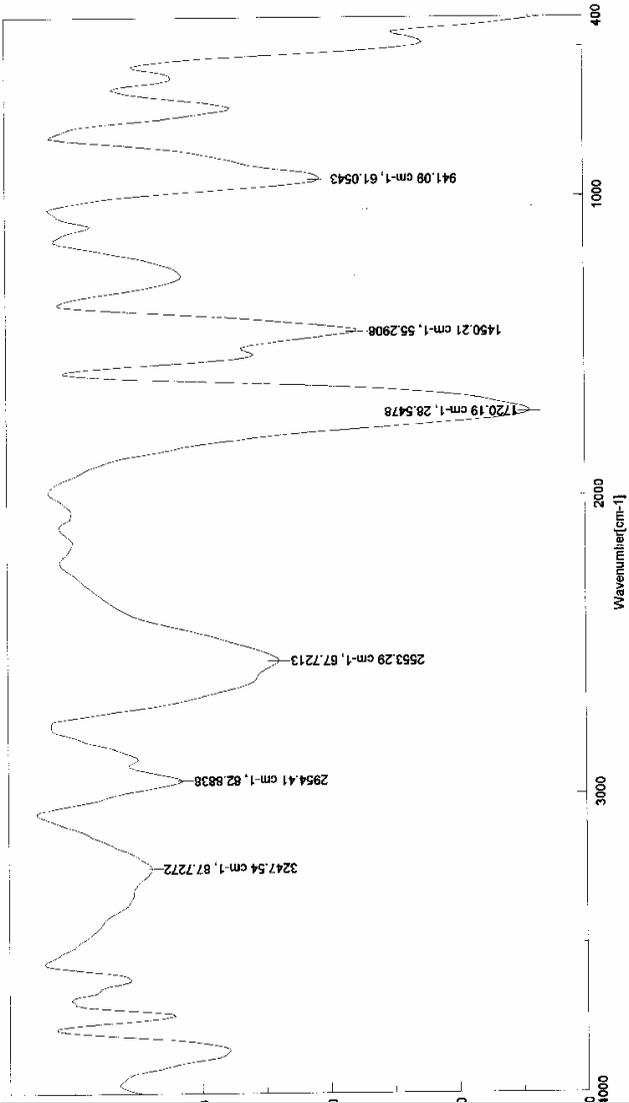


Gambar L.14.1 Gambar Noda hasil Kromatografi Lapis tipis: (a) Asam oleat, (b) Laktosa, (c) Senyawa hasil esterifikasi

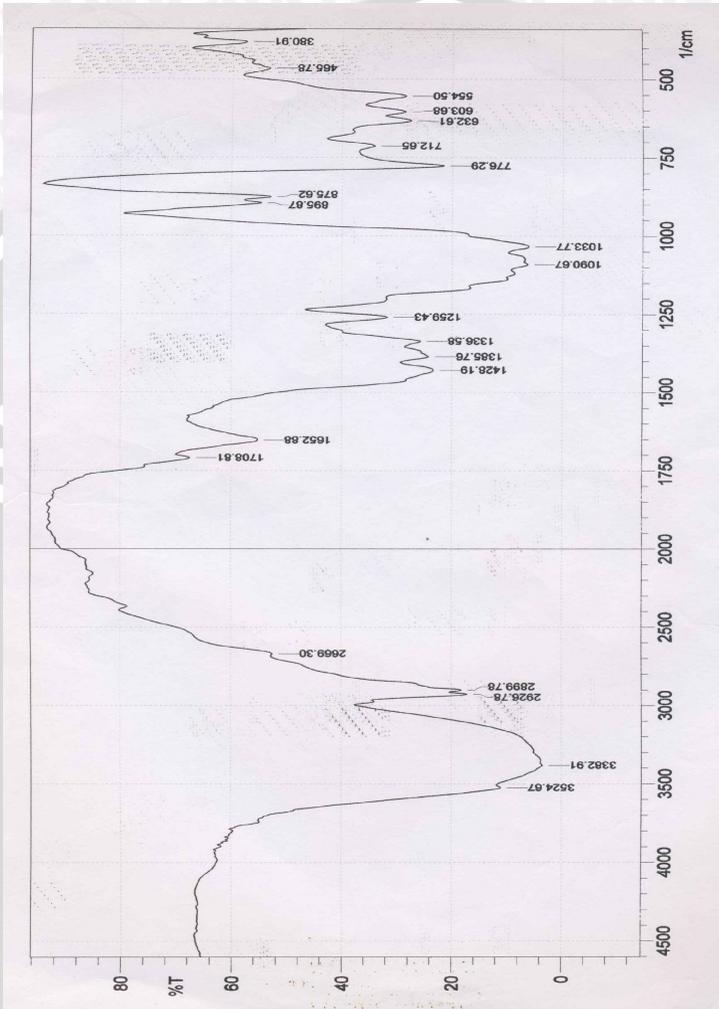


Gambar L.14.2 Spektra Inframerah Laktosa

Asam Oleat



Gambar L.14.3 Spektra Inframerah Asam oleat



Gambar L.14.4 Spektra Inframerah Senyawa hasil esterifikasi