

Kitin sebagai Penopang untuk Amobilisasi Lipase pada Proses Trans-esterifikasi Trigliserida

Siswa Setyahadi^{1*}, Achmadin Luthfi Machsum¹, dan Renny S Mokodongan¹

1. Teknologi Produksi Biokatalis, Pusat Teknologi Bioindustri,
Kedeputian Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi,
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Jl. MH. Thamrin 8, Jakarta-10340

Abstract

When enzymes used in biotechnological processes, they are often immobilized onto insoluble support materials. The advantage of immobilization is not only the fact that enzyme is reusable but it is also capable of stabilizing enzymes.

Due to the existence of the interfacial activation lipases (EC 3.1.1.3) represent versatile group of enzymes with various biocatalytic activities which include triacylglycerols hydrolysis, esterification, trans-esterification, alcoholysis and acidolysis to yield a wide range of useful biological and chemical derivatives. Commercially available lipase has been examined using the trans-esterification reaction of triglycerides onto support chitosan with continuous process.

A 97.2% conversion was obtained for the immobilized lipase at 40°C after continuous running for 24 hours and stable up to 3 days.

Keywords: lipase, immobilisasi, transesterifikasi, kitin

Pendahuluan

Penggunaan enzim sebagai biokatalis telah memegang peranan yang sangat penting pada industri kimia dan farmasi (Lee dkk., 2009). Salah satu biokatalis yang potensial digunakan pada berbagai industri detergen, pangan, tekstil, pulp, kertas dan farmasi adalah lipase (Jaeger dkk., 1998). Beberapa tahun terakhir ini, lipase banyak digunakan sebagai biokatalis untuk reaksi hidrolisis atau sintesis minyak dan lemak. Alasan utamanya adalah proses yang digunakan lebih efisien dengan selektivitas yang tinggi, kualitas yang dihasilkan lebih baik, serta ramah terhadap lingkungan (Dossat, 1999).

Dalam beberapa dekade terakhir telah banyak studi yang membahas berbagai metode amobilisasi, masing-masing memiliki derajat kompleksitas dan efisiensi yang berbeda (Bornscheuer., 2003; Malcata dkk., 1990; Zhao dkk., 2006). Walaupun demikian, desain protokol amobilisasi yang dapat meningkatkan karakteristik enzim masih menjadi tujuan yang menarik (Mateo dkk., 2007). Penggunaan lipase sebagai biokatalis mempunyai beberapa kelemahan, diantaranya adalah hanya dapat dipakai untuk satu kali reaksi. Salah satu cara untuk mengatasi kelemahan ini adalah dengan dilakukannya menerapkan teknik amobilisasi pada enzim yang akan digunakan. Amobilisasi enzim bertujuan untuk meningkatkan stabilitas dan produktivitas enzim tersebut sehingga lipase dapat digunakan kembali (Cao, 2005).

Pada penelitian sebelumnya telah dikembangkan metode sederhana amobilisasi enzim pada membran

asimetrik menggunakan teknik adsorpsi pada *sponge layer* dan dilanjutkan dengan filtrasi bertekanan melewati *thin layer* (Machsun dkk., 2010). Membran memiliki struktur asimetrik dengan *thin layer* pada bagian atas dan *sponge layer* sebagai *support* pada bagian bawah. Suatu membran dapat dianggap sebagai makrosistem spesifik yang dihasilkan dari banyak mikrosistem (Rios dkk., 2004).

Amobilisasi lipase secara luas digunakan untuk aplikasi industri terutama untuk sintesis biodiesel. Banyak studi tentang metode amobilisasi lipase yang telah dilakukan, diantaranya yaitu adsorpsi dalam *support* padat dan *entrapment* dalam matriks polimer *support* (Noureddini, 2004). Tetapi metode adsorpsi dan *entrapment* memiliki beberapa kekurangan, diantaranya yaitu enzim mudah dipengaruhi oleh kondisi lingkungan karena interaksi antara enzim dengan *support* sangat lemah sehingga enzim mudah lepas (Cao, 2005). Pada metode *entrapment*, preparasi yang dilakukan agar enzim menempel pada matriks polimer sangat sulit dan aktifitas enzimnya cenderung rendah. Sehingga alternatif yang digunakan untuk amobilisasi enzim yaitu dengan menggunakan metode kovalen. Metode ikatan kovalen ini memiliki beberapa keuntungan yaitu ikatan antara enzim dan *support* stabil sehingga enzim tidak mudah lepas ke dalam larutan dan substrat dapat dengan mudah berinteraksi karena enzim berada pada permukaan *support* (Brena dkk., 2006).

Mokodongan melaporkan bahwa telah berhasil melakukan amobilisasi lipase pada *support* kitin dengan menggunakan metode ikatan kovalen

*Alamat korespondensi: 021-3169510, 021-3169513, dan email: siswa59@yahoo.com

teraminasi dalam sintesis biodiesel. Hal tersebut dibuktikan oleh nilai *enzyme loading* yang tinggi. Proses sintesis ini berlangsung secara *batch*. Reaktor *batch* mempunyai beberapa kerugian, yaitu produktivitas rendah, dan biaya operasi yang lebih tinggi dengan berbagai macam kualitas produk (Illanes, 2008).

Oleh karena itu dibutuhkan alternatif proses yaitu menggunakan reaktor kontinyu. Keuntungan proses kontinyu adalah kemudahan dalam mengontrol terjadinya reaksi seperti suhu, kecepatan alir dalam reaktor dan kecepatan alir produk hasil reaksi dalam kolom *fixed bed* terhadap metil ester yang dihasilkan, serta produktivitas dan kualitas produk yang tinggi. Reaktor *fixed bed* akan memberikan aliran dari bawah kolom yang telah berisi *support* sehingga reaktan akan mempunyai waktu tinggal yang lebih lama sesuai dengan kecepatan aliran yang diberikan dan menghasilkan konversi metil ester yang lebih tinggi (Chen dkk., 2010).

Reaksi yang berlangsung didalam reaktor *fixed bed* berkatalis adalah transesterifikasi yang merupakan reaksi antara minyak nabati (trigliserida) dan alkohol dengan menggunakan katalis, sehingga menghasilkan metil ester dan gliserol (Fukuda, 2001). Pada reaksi transesterifikasi suatu alkohol rantai pendek terutama metanol, memiliki kelarutan yang sangat rendah di dalam minyak. Akibatnya, pada sistem akan terbentuk fasa liquid baru yang akan menyebabkan inaktivasi enzim dan menurunkan metil ester yang dihasilkan (Shimada dkk., 1999). Jika penambahan mol metanol ke dalam minyak lebih dari sepersembilan maka hasil campurannya menjadi emulsi. Ditemukan *droplet* alkohol di dalam sistem, dan enzim secara signifikan mengalami deaktivasi (Chen dkk., 2003). Selain itu, adanya gliserol sebagai produk samping selama proses transesterifikasi akan membungkus katalis amobil, yang menyebabkan menurunnya aktifitas enzim (Dossat dkk., 1999).

Penelitian ini bertujuan untuk proses transesterifikasi trigliserin menjadi metil oleat dengan menggunakan lipase teramobil dengan matrik kitin yang berlangsung secara kontinyu.

Metodologi

1. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Spektrofotometer *Ultra Violet-visible* (U-2001, Hitachi, Jepang), Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950, Reaktor *Fixed Bed*, *Magnetic Strirrer* (MR-3002, Heidolph, Jerman), *High Performance Liquid Chromatography*.

Bahan yang digunakan terdiri dari lipase komersial (Amano Enzyme Inc., Jepang). Minyak zaitun, kitin dengan ukuran 1338 μ m, glutaraldehid 50%, heksametilendiamina (Sigma Aldrich, Jerman) 70%, CuSO_{4(s)}, NaH₂PO_{4(s)}, Na₂HPO_{4.2H₂O(s)}, Bovin

Serum Albumin, reagen Follin-Ciocalteu (KgaA, Jerman), Metanol, n-Heksana, Na₂CO_{3(s)}, NaOH_(s), NaKC₄H₄O_{6(s)}, KCl_(s), KH₂PO_{4(s)}, larutan standar untuk analisa HPLC yaitu triolein dan piridin sebagai pelarut

2. Metode penelitian

a. Amobilisasi Lipase pada Kitin.

Immobilisasi menggunakan metode ikatan kovalen dengan kitin teraminasi heksametilendiamina (HEMDA). Larutan lipase yang digunakan mempunyai konsentrasi 0,075 g/mL. Sebanyak 0,900 gram lipase ditambahkan 15 mL larutan buffer fosfat pH 7 0,05 M kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* (Mediariska, 2008). Aktivasi kitin oleh larutan heksametilendiamina dan glutaraldehid menggunakan metode yang telah dimodifikasi modifikasi dari Gomes dkk., (2003).

b. Transesterifikasi

Feed reservoir yang terdiri dari minyak zaitun, metanol dan t-butanol dicampur menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm. Kemudian *feed reservoir* ini dipompa dengan menggunakan pompa peristaltik sehingga masuk ke dalam kolom reaktor *fixed bed* (panjang 16,5cm x lebar 1,3cm) yang telah berisi lipase amobil. Produk yang dihasilkan berupa metil ester dan gliserol. Setiap 1 mL sampel yang keluar dihitung waktu alirnya.

c. Konversi trigliserida

Penentuan kadar trigliserida dalam campuran produk ditentukan menggunakan HPLC dengan detektor UV pada panjang gelombang 205 nm. Fasa gerakanya terdiri dari heksana, isopropanol dan metanol. *Reservoir A* mengandung metanol dan *reservoir B* mengandung campuran isopropanol dan heksana (5 : 4, v/v). Proses elusi dilakukan secara gradien dari 100% A hingga 50% A + 50% B selama 30 menit. Laju rata-rata fasa gerak 1 mL/menit dan volume sampel yang diinjeksi adalah 10 μ L.

Kandungan trigliserida dalam produk dapat diketahui dengan membandingkan tinggi *peak* kromatogram sampel dan larutan standar triolein. Setelah mengetahui konsentrasi trigliserida sebelum dan sesudah reaksi maka persen konversi dapat dihitung.

d. Protein

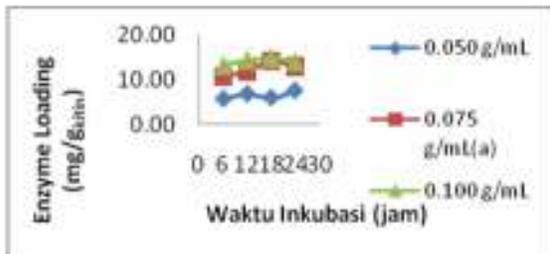
Penetapan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (Lowry, 1951).

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Konsentrasi Lipase dan Waktu Inkubasi Terhadap Enzyme Loading

Konsentrasi lipase merupakan variabel yang digunakan untuk menentukan banyaknya massa lipase optimal yang dapat berikatan dengan kitin teraminasi. Parameter yang digunakan pada penelitian ini yaitu nilai *enzyme loading*. Nilai *enzyme loading* diperoleh dari selisih massa lipase sebelum dan sesudah immobilisasi, sehingga

didapatkan massa lipase yang berikatan pada kitin. Variasi konsentrasi lipase mula-mula yang digunakan adalah 0,050 g/mL, 0,075 g/mL dan 0,100 g/mL. Menurut Machsun dkk., (2009) waktu inkubasi dapat mempengaruhi nilai *enzyme loading*. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin tinggi nilai *enzyme loading*. Variasi waktu inkubasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah 6, 12, 18 dan 24 jam.

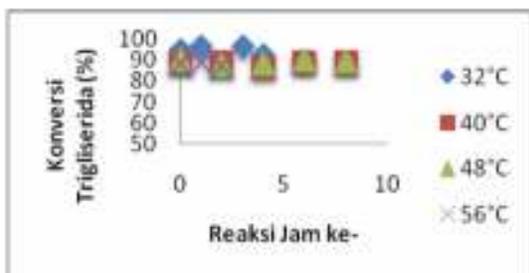


Gambar 1. Grafik Pengaruh Konsentrasi Lipase dan Waktu Inkubasi terhadap *Enzyme Loading*

Berdasarkan Gambar 1, konsentrasi lipase 0,075 g/mL dan 0,100 g/mL dengan waktu inkubasi 18 jam masing-masing menghasilkan *enzyme loading* sebesar 14,23 mg/gkitin dan 14,84 mg/gkitin. Walaupun konsentrasi lipase 0,075 g/mL dan 0,100 g/mL menghasilkan *enzim loading* yang hampir sama, tetapi jika dilihat dari efisiensi bahan maka konsentrasi lipase 0,075 g/mL dengan waktu inkubasi 18 jam lebih tepat digunakan untuk penelitian ini. Karena hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi lipase 0,075 g/mL, kemampuan kitin untuk mengikat lipase sudah optimum.

Pengaruh suhu dan waktu tinggal terhadap konversi reaksi

Pengaruh perubahan suhu divariasikan 32 sampai 56°C dengan rentang 8°C. Reaksi ini menggunakan perbandingan mol minyak : metanol 1:3, laju alir 2,5 mL/jam dan waktu tinggal 4,5 jam.

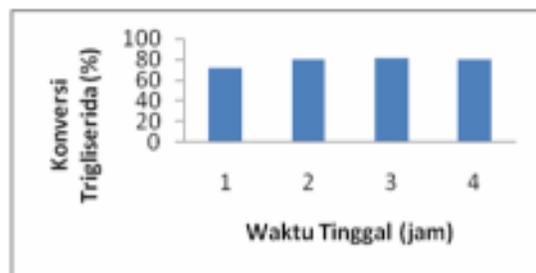


Grafik 2. Grafik Pengaruh Perubahan Suhu terhadap konversi Triglisierida

Pada gambar 2 menunjukkan bahwa suhu optimal reaksi diperoleh pada 32°C. Hal ini terlihat dari konversi triglisierida yang diperoleh yaitu sebesar 93,92%. Secara umum, reaksi transesterifikasi dengan katalis basa terjadi pada titik didih alkohol, namun transesterifikasi dengan menggunakan lipase

amobil sebagai katalis dapat menggunakan suhu yang lebih rendah. Hal ini bertujuan untuk mencegah hilangnya aktifitas lipase (Shimada dkk., 2001). Selain itu, suhu reaksi yang rendah sangat diinginkan dalam proses produksi biodiesel karena berkaitan dengan rendahnya penggunaan energi (Jeong dkk., 2004).

Pengamatan perubahan waktu tinggal divariasikan dari 1 sampai 4 jam pada suhu 40°C dengan perbandingan mol minyak dan metanol 1:3. Hubungan antara waktu tinggal terhadap persen konversi triglisierida ditunjukkan pada gambar di bawah ini.

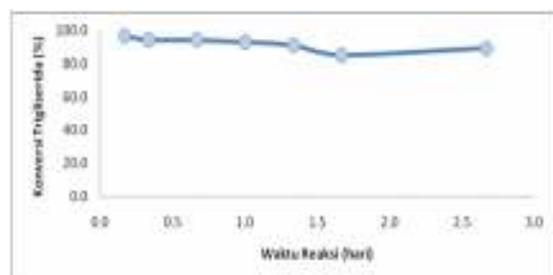


Grafik 3. Grafik Pengaruh Perubahan Waktu Tinggal terhadap Persen Konversi Triglisierida

Pada gambar 3 terlihat bahwa dengan meningkatnya waktu tinggal maka kontak substrat dengan lipase amobil menjadi lebih lama. Hal ini mengakibatkan meningkatnya konversi triglisierida. Royon dkk., (2006) menghasilkan konversi triglisierida sebesar 74% dengan laju alir 12 mL/jam. Pada penelitian ini dengan menggunakan waktu tinggal 2 jam (laju alir 6,15 mL/jam) dapat menghasilkan konversi sebesar 79,96%.

Kestabilan Lipase Amobil

Lipase amobil memiliki keuntungan yaitu kemampuannya yang dapat digunakan secara kontinu dalam jangka waktu yang panjang. Sehingga stabilitas enzim merupakan tahap yang paling penting dalam menentukan efektifitas suatu enzim amobil. Pada penelitian ini stabilitas operasional lipase amobil dalam proses kontinu dilakukan selama dua puluh empat jam dan dilanjutkan selama tiga hari.



Gambar 4. Grafik Stabilitas Lipase Amobil terhadap Persen Konversi Triglisierida

Pada gambar 4, terlihat bahwa konversi triglisierida pada penggunaan lipase amobil selama dua puluh empat jam dan tiga hari tidak mengalami penurunan yang signifikan. Hal ini disebabkan lipase amobil tidak kehilangan aktifitasnya meskipun penggunaan secara kontinu.

Shimada dkk., (2001) memperoleh konversi triglisierida yang tinggi (90%) selama 100 hari dengan menggunakan tiga kolom reaktor *fixed bed* secara kontinu, namun proses ini membutuhkan lipase amobil yang cukup banyak yaitu sekitar 10 gram. Royon dkk., (2006) mempelajari stabilitas lipase amobil secara kontinu pada suhu 50°C selama 500 jam menghasilkan konversi sebesar 95%. Pada penelitian ini dengan suhu 32°C dapat menghasilkan konversi yang maksimum yaitu sebesar 97,16% dan tidak mengalami penurunan yang signifikan selama tiga hari pemakaian lipase amobil.

Kesimpulan

Pada penelitian ini dilakukan pengembangan dengan menggunakan reaktor *fixed bed*. Lipase amobil dimasukkan ke dalam reaktor dan substrat dialirkan melewatinya. Nilai *enzyme loading* tertinggi ditunjukkan pada konsentrasi lipase mula-mula yaitu 0,075 g/mL dan waktu inkubasi 18 jam.

Penggunaan lipase amobil ini diaplikasikan untuk reaksi transesterifikasi secara kontinu antara metanol dengan triglisierida dari minyak zaitun. Konversi triglisierida yang tinggi dihasilkan oleh reaksi dengan perbandingan minyak : metanol 1:6, suhu 32°C dan waktu tinggal 2 jam. Kestabilan lipase amobil dilakukan kontinu selama dua puluh empat jam dan dilanjutkan tiga hari. Selama dua puluh empat jam reaksi, konversi triglisierida maksimum dicapai pada jam keempat yaitu sebesar 97,16% dan tidak terjadi perubahan aktifitas yang signifikan setelah pemakaian tiga hari.

Ucapan Terimakasih

Penulis berterimakasih kepada Dessty Priherna Wati dan Dr. Muktiningsih dari Universitas Negeri Jakarta atas bantuan tenaga dan pikiran dalam pekerjaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Bornscheuer, U.T. 2003. "Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts" *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3336 – 3337
2. Brena, B. M. dan Batista-Viera F. 2006. "Immobilization of Enzymes". *Immobilization of Enzymes and Cells*. Spanyol: Humana Press.
3. Cao, L. 2005. *Carrier-Bound Immobilization Enzymes*. Weinherm, Jerman: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.
4. Chen, H. C., Ju, H. Y., Wu, T. T., Liu, Yung. C., Lee, Chih. C., Chang, Cheng., Chung, Yi. Lin. dan Shieh, Chwen. Jen. 2010. "Research Article, Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2011.
5. Chen, J. W. dan Wu W. T. 2003. "Regeneration of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Transesterification". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 95, No. 5, 466-469.
6. Dossat, V., Combes, D. dan Marty, A. 1999. "Continuous Enzymatic Transesterification of High Oleic Sunflower Oil in a Packed Bed Reactor: Influence of the Glycerol Production". *Enzyme Microb. Technol.* No. 25, 194-200.
7. Fukuda, H., Kondo, A. dan Noda, H. 2001. "Review, Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 92, No. 5, 405-416.
8. Gomes, F. M., Pereira, E. B. dan de Castro, H. F. 2003. "Immobilization of Lipase on Chitin and Its Use in Nonconventional Biocatalysis". *Biomacromolecules*, Vol 5, 17-23.
9. Illanes, A. 2008. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Application*. Chili: Springer and Business Media, hal. 205.
10. Jaeger, K.E. and M.T. Reetz, 1998. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology", *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396-403
11. Jeong, G. T. dan Park, D. H. 2008. "Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil for Biodiesel Production with *tert*-Butanol". *Appl Biochem Biotechnol*, No. 148, 131-139.
12. Lee, C.-H. T.S. Lin and C.Y. Mou, 2009. "Mesoporous materials for encapsulating enzymes" *Nano Today*. 4(2), 165-179
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. dan Randall, R. J. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* 265-275.
14. Nouredini, H., Gao, H. dan Philkana R. S. 2004. "Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil". *Bioresource Technology*, No. 96, 769-777.
15. Machsun A.L., M. Gozan, M. Nasikin, S. Setyahadi, and Y.J. Yoo, 2010, "Membrane Microreactor in Biocatalytic Transesterification of Triolein for Biodiesel Production" *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* Vol 15, No.6, 911-916

16. Malcata, F.X., H.R. Reyes, H.S. Garcia, C.G. Hill and C.H. Amundson. 1990. "Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils - A Review" *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (12), 890 – 910
17. Mateo, C., J.M. Palomo, G.F. Lorente, J.M. Guisan and R.F. Lafuente. 2007. "Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques" *Enzym. Microb. Technol.* 40, 1451 – 1463
18. Mediariska, V. 2008. Immobilisasi Enzim Lipase pada Membran dengan Metode Adsorpsi-Filtrasi dan Ikatan Kovalen. Tangerang: Bidang Peminatan Bioteknologi, Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Institut Teknologi Indonesia.
19. Mokodongan, Renny S. 2009. Immobilisasi Lipase pada Kitin dan Penggunaannya dalam Produksi Bahan Bakar Biodiesel dari Minyak Sawit. Jakarta: Program Studi Kimia, Jurusan Kimia, Universitas Negeri Jakarta.
20. Rios, G.M., M.P. Belleville, D. Paolucci and J. Sanchez. 2004. "Progress in enzymatic membrane reactors – A Review" *J. Memb. Sci.* 242, 189–196
21. Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. dan Locatelli, S. 2006. "Enzymatic Production of Biodiesel from Cotton Seed Oil Using t-Butanol as a Solvent". *Bioresource Technology*, No. 98, 648-653.
22. Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. dan Tominaga, Y. 1999. "Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase". *Journal of American Chemical Society*, No. 76, 789-793.
23. Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga. 2001. "Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor" *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 703-707.
24. Zhao, X.S., X.Y. Bao, W. Guo and F.Y. Lee. 2006. " Immobilizing catalysts on porous materials" *Materials Today* 9 (3), 32 – 39