

**AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* DALAM
ALUMINOSILIKAT MESOPORI UNTUK ESTERIFIKASI**

TUGAS AKHIR

**Oleh:
MAHARDHIKA
0310920037-92**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007**



**AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* DALAM
ALUMINOSILIKAT MESOPORI UNTUK ESTERIFIKASI**

TUGAS AKHIR

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

**Oleh:
MAHARDHIKA
0310920037-92**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* DALAM ALUMINOSILIKAT MESOPORI UNTUK ESTERIFIKASI

Oleh:
MAHARDHIKA
0310920037-92

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal.....
dan dinyatakan memenuhi untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang Kimia

Dosen Pembimbing I

Dra. Anna R, MApp,Sc
NIP 132 000 070

Dosen Pembimbing II

Drs. Sutrisno, MSi.
NIP 131 879 407

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA
Universitas Brawijaya

M. Farid Rahman, SSi.MSi
NIP 132 158 726



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mahardhika
NIM : 0310920037-92
Jurusan : Kimia
Penulis Tugas Akhir berjudul :

“Amobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor miehei* dalam Aluminosilikat Mesopori untuk Esterifikasi”

Dengan ini menyatakan:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.



Malang, Juni 2007
Yang menyatakan,

(Mahardhika)
0310920037

AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* DALAM ALUMINOSILIKAT MESOPORI UNTUK ESTERIFIKASI

ABSTRAK

Amobilisasi lipase pada aluminosilikat mesopori digunakan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi antara laktosa dan asam palmitat dalam pelarut organik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas serta aktivitas spesifik lipase bebas maupun lipase amobil. Lipase yang digunakan, diisolasi dari *Mucor miehei* dan dimurnikan melalui metode presipitasi dengan penambahan garam yang bersifat mudah larut dalam air, yaitu ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-75%, 75-90%). Identifikasi lipase yang teramobil pada aluminosilikat, dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer inframerah. Aktivitas enzim ditentukan secara volumetri dengan menghitung jumlah asam lemak sisa hasil esterifikasi yang dilakukan sebelum dan sesudah waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi 40-60% merupakan fraksi yang mengandung jumlah lipase terbanyak dengan aktivitas spesifik 3,275 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit sedangkan aktivitas spesifik enzim amobil 16,019 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit.



IMMOBILIZATION OF LIPASE *Mucor miehei* IN MESOPOROUS ALUMINOSILICATE FOR ESTERIFICATION

ABSTRACT

Immobilized lipase in mesoporous aluminosilicate was used to catalyze the esterification of lactose and palmitic acid in organic media. This research was performed in order to determine the activity and the specific activity of both immobilized lipase and free lipase. Lipase was isolated from *Mucor miehei* and was purified through precipitation by adding ammonium sulphate in saturation level (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-75%, 75-90%). Infrared spectrophotometer was used to identify lipase in aluminosilicate. Enzyme activity was determined volumetrically by calculating the residual of fatty acid from esterification before and after incubation time. The result showed that in the third fraction (40-60%) contained the highest lipase concentration, resulting in 3,275 $\mu\text{g}/\text{mg}$ minute of specific activity while the immobilized lipase in aluminosilicate showed 16,019 $\mu\text{g}/\text{mg}$ minute of specific activity.



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 “Amobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor miehei* pada Aluminosilikat Mesopori untuk Esterifikasi.”

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa terselesaikannya tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan, bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya terutama kepada:

1. Dra. Anna Roosdiana M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing I dan Drs.Sutrisno, MSi., selaku Dosen Pembimbing II yang telah membimbing, memberikan nasihat, arahan dan perhatian selama penyusunan tugas akhir
2. Masruri SSi., MSi., selaku Dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan arahan kepada penulis selama masa kuliah
3. Dr. Hermin Sulistyarti, M.Farid Rahman SSi., MSi., Ir. Bambang Ismuyanto, MS., Dra. Tutik Setianingsih, Msi., selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan tugas akhir ini
4. Ketua Jurusan Kimia, dan segenap Dosen serta Staff Jurusan Kimia yang telah membantu terfasilitasinya tugas akhir
5. Ibu dan Ayah, terimalah sujudku, terima kasih untuk doa dan kesabaran yang tak pernah surut
6. Kakak dan adikku tersayang, untuk semangat juga cinta yang telah diberikan
7. Teman-teman Kimia terkhusus angkatan 2003, untuk dukungan dan persahabatannya .

Dengan segala keterbatasan yang ada, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan tugas akhir ini.

Malang, Juni 2007

penulis

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

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 (Suharto, 1995), sehingga cara memproduksi enzim yang sering dilakukan yaitu dengan mengisolasinya dari mikroba.

Lipase merupakan enzim yang dapat diisolasi dari berbagai mikroba, salah satunya yaitu kapang *Mucor miehei* (Winarno, 1995). Lipase hasil isolasi masih bercampur dengan protein non enzim (Othmer, 1987), maka dilakukan pemurnian untuk memperoleh lipase murni. Metode pemurnian yang sering dilakukan yaitu melalui metode pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat pada suhu rendah. Amonium sulfat merupakan garam dengan kelarutan tinggi (Anonymous^c, 2006), sehingga dapat dengan mudah menarik molekul air yang mensolvasi protein.

Lipase menunjukkan aktivitas esterifikasi, transesterifikasi dan hidrolisis (Vosmann, *et al.*, 2006). Salah satu peran lipase dalam esterifikasi yaitu pada pembuatan ester gula. Ester gula merupakan ester dari gula dan asam lemak yang dikenal dengan sebutan biosurfaktan. Ester gula dari sukrosa dan beberapa monosakarida dengan asam lemak telah banyak dihasilkan (Schmid, 2001). Pada penelitian digunakan laktosa dan asam palmitat. Menurut Lichtenthaler (2004) kedua bahan memiliki kelimpahan tinggi di alam, memberikan banyak manfaat dan non toksik.

Pada umumnya enzim bebas tidak stabil dan berkurang aktivitasnya pada penyimpanan lama. Salah satu cara untuk memecahkan masalah ini adalah dengan amobilisasi (Fessner, 2000).

Enzim amobil merupakan enzim yang berada dalam ruang yang dibatasi secara sempurna oleh pembatas (Suharto, 1995). Metode amobilisasi yang dapat dilakukan antara lain dengan metode penjebaran, ikatan silang dan pengikatan pada karier. Metode pengikatan pada karier merupakan metode pengikatan enzim pada karier yang tidak larut dalam air dan merupakan metode paling

sederhana. Menurut Wiseman (1985) amobilisasi enzim melalui metode ikatan pada karier dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, semakin tinggi konsentrasi enzim maka akan semakin banyak jumlah enzim yang teradsorpsi pada karier.

Dalam metode pengikatan pada karier, karier yang digunakan bisa dari bahan organik atau anorganik. Salah satu bahan anorganik yang dapat digunakan yaitu aluminosilikat mesopori. Aluminosilikat mesopori sebagai karier memiliki beberapa kelebihan yaitu memiliki ukuran pori 50 Å (Roosdiana, dkk, 2006) dan lipase berdiameter 40 Å (Fessner, 2000), sehingga lipase dapat masuk ke dalam pori aluminosilikat, resisten terhadap serangan mikroba dan pelarut organik (Fessner, 2000). Penggunaan aluminosilikat memungkinkan enzim teramobil secara adsorpsi fisik dan secara ikatan ionik karena aluminosilikat bersifat sebagai penukar kation. Adanya dua cara pengikatan enzim pada karier, maka kemungkinan terjadinya desorpsi kecil dan aktivitas enzim dalam mengkatalisis esterifikasi dapat meningkat.

Penggunaan enzim amobil pada reaksi esterifikasi menghasilkan produk ester yang bersifat biodegradabel dan mengurangi biaya penggunaan enzim karena enzim amobil dapat dipergunakan kembali (Sekeroglu, *et al*, 2004).

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian amobilisasi enzim lipase dari *Mucor miehei* dalam aluminosilikat mesopori untuk esterifikasi laktosa dengan asam palmitat.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan antara lain:

1. Bagaimana pengaruh pemurnian terhadap aktivitas spesifik enzim?
2. Bagaimana pengaruh jumlah enzim yang teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik enzim amobil?
3. Bagaimana pengaruh amobilisasi terhadap aktivitas spesifik enzim?

1.3. Batasan Masalah

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

1. Pemurnian dilakukan secara bertingkat dengan fraksi 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-75% dan 75-90%
2. Penggunaan variasi konsentrasi larutan enzim yaitu dengan mengambil (1, 2, 3, 4, 5) mL larutan enzim kemudian diencerkan hingga volume 5 mL dengan buffer sitrat fosfat pH 5.
3. Aluminosilikat mesopori sebagai karier adalah hasil sintesis yang telah dilakukan oleh peliti lain di Laboratorium Anorganik Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
4. Pembentukan ester ditentukan dari jumlah asam lemak sisa hasil esterifikasi.

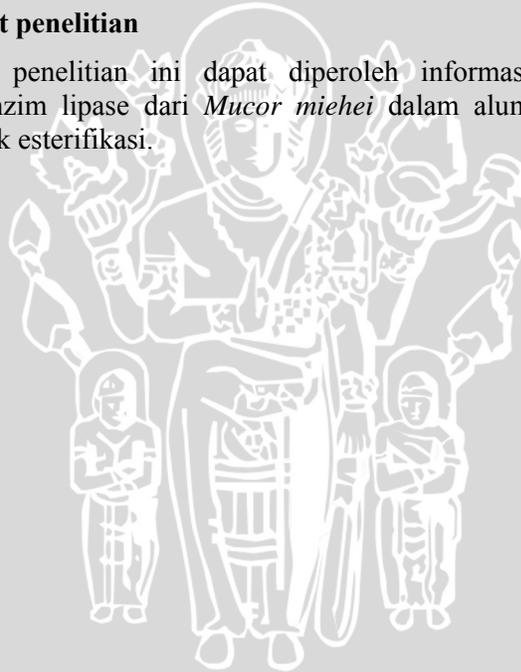
1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh pemurnian terhadap aktivitas spesifik enzim
2. Mengetahui pengaruh jumlah enzim yang teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik enzim amobil
3. Mengetahui pengaruh amobilisasi terhadap aktivitas spesifik lipase.

1.5. Manfaat penelitian

Melalui penelitian ini dapat diperoleh informasi tentang amobilisasi enzim lipase dari *Mucor miehei* dalam aluminosilikat mesopori untuk esterifikasi.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim adalah katalisator dalam suatu sistem biologi yang dapat mengkatalisis reaksi secara spesifik (Winarno, 1995). Spesifitas enzim merupakan kekhususan aktivitas enzim dalam perannya sebagai katalis hanya terhadap satu reaksi atau beberapa reaksi (Page, 1989). Enzim memiliki daya katalitik yang luar biasa, yang biasanya jauh lebih besar dari katalisator sintetik (Lehninger, 1992). Daya katalitik enzim dapat dibuktikan dengan kecepatannya dalam mengkatalisis suatu reaksi yang bisa mencapai 10^{20} kali lebih cepat dibandingkan reaksi tanpa enzim.

Enzim mempunyai gugusan yang dapat terionisasi. Perubahan pH akan dapat memberi efek kepada bagian katalitik dan konformasi enzim. Secara umum enzim hanya aktif pada selang pH yang terbatas dan sebagian besar dari keadaan itu ditemukan suatu pH optimum tertentu (Wong, 1995). Menurut Lehninger (1992), enzim memiliki pH optimum yang khas yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal.

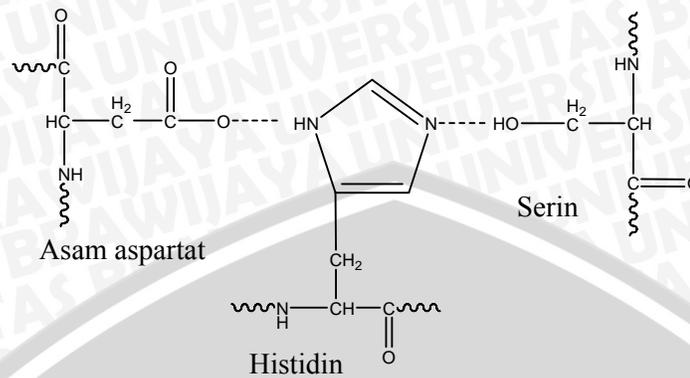
2.2. Lipase

Lipase termasuk dalam kelas hidrolase (Winarno, 1995). Lipase (*triacylglycerol ester hydrolase* IEC 3.1.1.3) dapat mengkatalisis berbagai macam reaksi seperti esterifikasi, transesterifikasi dan hidrolisis (Faber, 1995).

Lipase dapat diisolasi dari pankreas, susu, hewan, mikroba dan tumbuh-tumbuhan (Winarno, 1995). Lipase sebagai katalis untuk reaksi esterifikasi dapat diperoleh dari mikroba atau tanaman (Suhendra, 2004).

Keaktifan optimum lipase sangat tergantung pada pH, suhu dan juga senyawa pengemulsi yang digunakan serta ada dan tidaknya garam dalam substrat. Suhu optimal lipase pada umumnya berkisar antara 30° dan 50°C (Winarno, 1995). Pada rentang suhu tersebut aktivitas lipase optimal dalam mengkatalisis substratnya, sedangkan pH optimum lipase berkisar antara 4,5-8,0 (Mathews and Van holde, 1990). Enzim lipase mengandung 3 asam amino utama yang sangat berperan dalam reaksi katalitiknya yaitu histidin, serin dan asam aspartat. Satu atom N pada cincin histidin berikatan hidrogen dengan

atom H dari Serin, sedang N yang lain berikatan dengan atom O gugus karboksilat dari asam aspartat. Struktur sisi aktif lipase adalah pada Gambar 2.1 (Wong, 1995):



Gambar 2.1 Struktur sisi aktif lipase

2.3. *Mucor miehei*

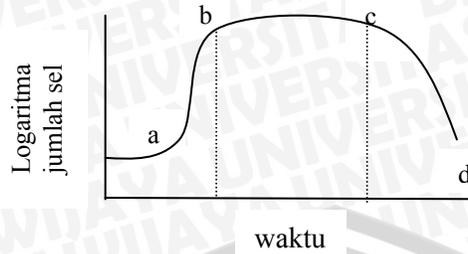
Lipase dapat diproduksi oleh berbagai mikroba, salah satunya yaitu kapang *Mucor miehei* (Winarno, 1995). Adapun klasifikasi dari *Mucor miehei* adalah sebagai berikut (Charlie and Wilkinson, 1994):

Kingdom	: Thallophyta
Divisi	: Fungi
Sub divisi	: Eumycetes
Kelas	: Phycomycetes
Sub kelas	: Zygomycetes
Ordo	: Mucorales
Famili	: Mucoraceae
Genus	: Mucor
Spesies	: Miehei

Mucor miehei merupakan fungi yang berfilamen, penampakan fisiknya berwarna abu-abu, tidak memiliki rhizoid, bersifat non patogenik dan non toksik pada manusia dan hewan (Jay, 1991).

Kapang memiliki fasa pertumbuhan yang dapat digunakan untuk menentukan waktu panen yang tepat pada media pertumbuhan supaya dapat menghasilkan enzim dalam jumlah yang maksimal dan memiliki aktivitas cukup tinggi (Tortora, *et al*, 2001).

Fase pertumbuhan dari suatu kapang dapat dilihat pada kurva berikut (Tortora, *et al*, 2001):



Gambar 2.2 Kurva logaritma jumlah sel jamur pada kultur

Fase pengenalan stasioner

Selama fase ini, jumlah bakteri akan tetap. Pada Gambar 2.2, terlihat di garis lurus sejajar sumbu x dan ditunjukkan oleh 1-a.

Fase logaritma pertumbuhan

Selama fase ini kecepatan perkembangan sel sangat tinggi. Hal ini digambarkan pada garis lurus a-b. Fase ini adalah periode pembiakan cepat dan merupakan periode dimana sel-sel berada dalam keadaan aktif. Selama fase inilah waktu generasi tetap tidak berubah bagi setiap jenis.

Fase stasioner

Selama fase ini tidak terjadi penambahan jumlah sel. Gambar 2.2 terlihat di garis lurus b-c yang sejajar sumbu x. Selama kondisi ini lingkungan telah berubah, dimana jumlah nutrisi hampir habis dan terjadi penumpukan hasil metabolik yang bersifat toksik sehingga tidak ada kenaikan jumlah mikroba.

Fase kematian

Pada fase ini jumlah sel berkurang secara perlahan pada awalnya, akan tetapi untuk selanjutnya akan berkurang dengan cepat. Pada Gambar 2.2, fase ini ditunjukkan dengan garis c-d.

2.4. Isolasi Enzim

Proses isolasi enzim ditentukan oleh sumber enzimnya, apakah dari tanaman atau hewan (Utomo, 1997). Enzim yang diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi (Judoamidjojo, dkk., 1989).

Pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi merupakan operasi isolasi enzim. Ini termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penyingkiran hancuran sel serta pengumpulan endapan (Judoamidjojo, dkk., 1989).

2.5. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari komponen pengotor lain. Hal ini diperlukan untuk menghilangkan senyawa lain yang mengganggu sisi aktif enzim (Othmer, 1987). Menurut Smith (1990) proses pemurnian enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan, filtrasi membran, kromatografi serapan, afinitas dan filtrasi gel.

Pemurnian dengan metode pengendapan dilakukan dengan penambahan amonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat ke dalam larutan protein akan memberikan pengaruh terhadap kelarutan enzim (Voet and Voet, 1990).

Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari sampel menuju dalam larutan buffer. Difusi garam dari satu sisi membran ke sisi lain terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga menyebabkan garam terpisah dari protein. Membran dialisis untuk protein mempunyai ukuran bervariasi dan yang biasa digunakan adalah ukuran 10 – 100 μm (Ryden, 1998).

2.6. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah suatu keadaan dimana enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak sehingga dapat dikendalikan atau diatur kapan enzim harus kontak dengan substrat (Fennema, 1996).

Dalam amobilisasi, enzim dapat terikat baik secara fisik maupun kimia. Secara fisik, enzim dapat diserap pada suatu matriks yang tidak dapat larut, ditangkap dalam gel atau dikapsulkan dalam mikrokapsul. Secara kimiawi, enzim bisa menjalani pengikatan kovalen dengan bahan penyangga padat atau pengikatan silang (cross-linked) (Smith, 1995).

Metode-metode amobilisasi enzim adalah (Belitz and Grosch, 1987):

1. Metode *carier* (pengikatan enzim)

Pada metode ini, enzim terikat pada suatu matriks. Enzim dapat terikat secara kovalen, dalam hal ini berarti enzim terikat secara kimia. Pada beberapa kasus, enzim dapat pula terikat secara fisik.

2. Metode penjebakan enzim

Enzim dijebak dalam kisi suatu polimer (metode kisi) atau didalam membran semipermeabel (metode mikrokapsul).

3. Metode ikatan silang

Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan silang antara molekul-molekul enzim. Metode ini tidak menggunakan suatu matriks. Gugus fungsional dalam molekul enzim yang bisa digunakan untuk pembentukan ikatan antar molekul seperti gugus amino dari lisin, gugus fenolik dari tirosin dan gugus imidazol dari histidin.

Metode *carier* merupakan metode yang pertama kali dipakai untuk amobilisasi enzim. Metode ini berdasarkan pada pengikatan enzim secara langsung pada karier dan terdapat tiga macam cara pengikatan yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik dan ikatan kovalen. Metode adsorpsi fisik berdasarkan pada pengikatan gaya Van der Waals enzim pada permukaan karier. Metode ikatan ionik berdasarkan pada pengikatan ionik protein enzim ke dalam karier tidak larut air yang berisi residu penukar ion. Sedangkan metode ikatan kovalen berdasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan karier tidak larut air (Wiseman, 1985).

Dalam metode pengikatan enzim, hal yang perlu diperhatikan adalah ukuran partikel dan luas permukaan karier. Semakin besar luas permukaan karier, maka jumlah enzim yang terikat per unit karier juga semakin besar. Faktor utama yang mempengaruhi jumlah enzim yang dapat diikat oleh karier adalah konsentrasi enzim yang dikenakan pada permukaan karier selama proses amobilisasi.

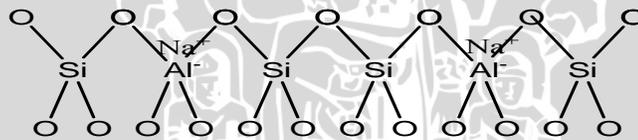
Aktivitas enzim naik dengan meningkatnya konsentrasi enzim sampai pada batas tertentu (Wiseman, 1995).

Konformasi tiga dimensi dari enzim mempunyai efek yang penting pada aktivitas katalitiknya. Konformasi enzim tidak boleh rusak karena bila hal itu terjadi, aktivitas katalitik akan turun dan sifat-sifat enzimatisnya berubah (anonymous^b, 2006). Hal ini menyebabkan aktivitas katalitik enzim dalam keadaan amobil akan turun.

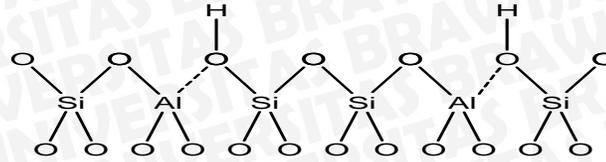
2.7. Aluminosilikat Mesopori

Aluminosilikat merupakan polimer anorganik yang tersusun atas jaringan tetrahedral SiO_4 dan AlO_4 yang akan bergabung membentuk unit-unit pembangun sekunder yang selanjutnya unit pembangun sekunder membentuk polihedral-polihedral yang besar (Prayitno, 1989).

Struktur kerangka senyawa aluminosilikat terdiri dari 2 bagian yaitu bagian netral dan bagian yang bermuatan. Bagian netral tersusun atas atom-atom silikon dan oksigen (Davids and Lobo, 1992). Pada bagian bermuatan terjadi penggantian ion pusat silikon bervalensi empat dengan kation aluminium yang bervalensi tiga. Muatan negatif pada O-Al-O di dalam polimer aluminosilikat menyebabkan polimer tersebut dapat mengikat kation-kation seperti Na^+ , K^+ , dan lain-lain (Smart and Moore, 1992). Kation-kation tersebut dapat ditukar dengan kation lain yang lebih kuat sehingga aluminosilikat berfungsi sebagai penukar kation. Bila polimer tersebut mengikat H^+ , maka proton tersebut cenderung terikat pada jembatan oksigen penghubung Al dan Si dan aktif sebagai katalis asam. Gambaran dari polimer aluminosilikat yang mengikat kation logam dan H^+ disajikan dalam Gambar 2.3:



Gambar 2.3 Polimer aluminosilikat mengikat Na^+



Gambar 2.4 Polimer aluminosilikat bentuk asam Bronsted

Aluminosilikat mesopori merupakan bahan aluminosilikat yang berdiameter pori antara 20 sampai 500 Å (Sangceta, *et al*, 2005). Aluminosilikat mesopori disintesis karena bahan aluminosilikat alami (zeolit) dengan ukuran pori kurang dari 15 Å tidak dapat diterapkan untuk molekul berukuran besar. Sintesis aluminosilikat mesopori dilakukan secara hidrotermal menggunakan botol polipropilen dengan melibatkan setiltrimetilamonium bromida (CTAB) sebagai cetakan pori (Kawi and Lai, 1998), mesitilen yang berperan mengisi ruang di pusat misel (Beck, *et al*, 1992), tetrametilamonium (TMAOH) untuk menstabilkan polimer yang terbentuk (Barrer, 1982) dari silikat dan senyawaan Al yang mengandung Al berkoordinasi empat, antara lain aluminium sulfat, natrium aluminat, dan aluminium ortofosfat (Luan, *et al*, 1995). Pemanasan pada suhu tinggi dilakukan untuk menghilangkan CTAB, mesitilen dan TMAOH sehingga dihasilkan aluminosilikat mesopori (Zhao, *et al*, 1996).

Bentuk asam Bronsted seperti pada Gambar 2.4 biasanya diperoleh dari hasil pemanasan aluminosilikat yang mengikat amonium atau alkil amonium seperti NHR_3^+ , NH_2R_2^+ , NH_3R^+ , NR_4^+ (Gilson, 1991).

2.8. Ester Gula dari Laktosa dan Asam Palmitat

2.8.1. Ester Gula

Ester gula merupakan ester dari gula dengan asam lemak yang terbentuk berdasarkan reaksi esterifikasi, yaitu reaksi antara asam karboksilat dengan alkohol. Reaksi esterifikasi secara umum seperti pada Gambar 2.5 (Fessenden dan Fessenden, 1986):



Gambar 2.5 Reaksi Esterifikasi

Ester gula dikenal dengan sebutan biosurfaktan. Biosurfaktan dapat dibuat melalui esterifikasi enzimatis (Schmid, *et al*, 2001), yaitu suatu reaksi esterifikasi dengan enzim sebagai katalisator. Menurut Montgomery (1993) guna menganalisis mekanisme katalitik, diasumsi terjadinya rangkaian reaksi sebagai berikut:

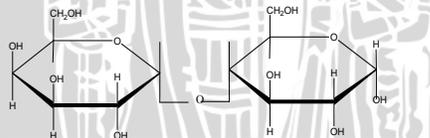


dengan E mewakili enzim, S substrat, ES kompleks antara enzim dan substrat, dan P adalah produk.

Pembentukan biosurfaktan secara enzimatis mempunyai keunggulan, yaitu biosurfaktan memiliki sifat yang mudah biodegradasi, tidak beracun, tidak berasa, tidak berbau dan tidak menimbulkan iritasi (Schmid, *et al*, 2001). Penggunaan enzim amobil sebagai katalis dalam pembentukan biosurfaktan memberikan satu kelebihan lagi yaitu mengurangi biaya pengadaan enzim karena enzim amobil dapat dipergunakan lagi (Sekeroglu, *et al*, 2004). Rahman dan Herawan (2000) telah berhasil membuktikan bahwa pembentukan ester gula secara enzimatis dengan menggunakan lipase yang diamobilkan menghasilkan produk ester gula yang biodegradabel dan non toksik. Keberhasilan tersebut dibuktikan dengan identifikasi ester yang terbentuk dengan metode spektroskopi IR dan keberadaannya sebagai surfaktan dibuktikan dengan kemampuannya dalam mengurangi tegangan permukaan air, nilai HLB (Hydrophile-lipophile balance) 16 yang menyatakan bahwa produk dapat digunakan sebagai *emulsifier*, deterjen, dan kosmetik.

2.8.2. Laktosa

Susu adalah sumber utama dari laktosa (Fox and Grufferty, 1989). Laktosa merupakan disakarida alamiah yang dijumpai hanya pada binatang menyusui, air susu sapi dan manusia. Laktosa sebagai disakarida tersusun atas glukosa dan galaktosa dan tergolong dalam gula pereduksi. Struktur laktosa adalah sebagai berikut (Fessenden dan Fessenden, 1986):



Gambar 2.6 Laktosa

Dalam metabolisme tubuh manusia yang normal, laktosa dihidrolisis secara enzimatik menjadi D-Galaktosa dan D-Glukosa (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Laktosa memiliki solubilitas yang rendah (18g/100mL air pada suhu 20°C). Laktosa cenderung membentuk larutan jenuh sehingga sulit untuk dikristalkan (Fox and Grufferty, 1989).

2.8.3. Asam Palmitat

Asam palmitat disebut juga asam heksadekanoat yang merupakan asam lemak jenuh dengan rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ (Hawleys, 1987). Adapun rumus strukturnya (Anonymous, 2006):



Gambar 2.7 Asam Palmitat

Asam palmitat merupakan salah satu asam lemak yang paling mudah diperoleh. Tumbuh-tumbuhan dari famili Palmaceae seperti kelapa dan kelapa sawit merupakan sumber utama dari lemak ini. Produk hewani juga banyak mengandung asam lemak ini, yaitu dari mentega, keju, susu dan daging.

Pada suhu ruang, asam palmitat berwujud padatan berwarna putih. Titik leburnya 63,1°C; densitas 0,8414; titik didih 353,5°C. bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol panas dan eter (Hawleys, 1987).

Dalam industri, asam palmitat banyak dimanfaatkan dalam bidang kosmetika dan pewarnaan. Dari segi gizi, asam palmitat merupakan sumber kalori penting (Anonymous^a, 2006).

2.9. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim

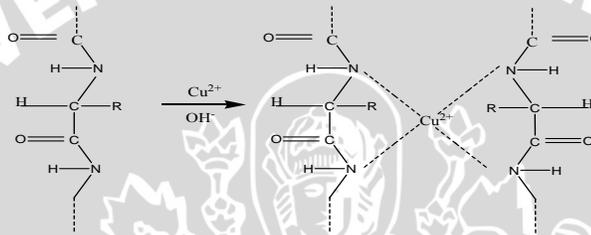
Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 μg substrat per menit pada keadaan pengukuran optimal (Lehninger, 1992). Aktivitas lipase dalam mengkatalisis pembentukan ester gula dapat ditentukan secara titrasi

asam basa (Sekeroglu, *et al*, 2004), yaitu berdasarkan jumlah asam lemak sisa hasil esterifikasi.

Menurut Lehninger (1992), aktivitas spesifik merupakan ukuran kemurnian enzim yang didefinisikan sebagai aktivitas enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik enzim akan meningkat selama proses pemurnian dan akan mencapai nilai maksimum dan konstan apabila enzim tersebut dalam keadaan murni.

Pada pemurnian bertingkat, kadar protein pada tiap fraksi berbeda-beda, sehingga apabila aktivitas enzim pada masing-masing fraksi dibagi dengan kadar proteinnya maka akan diketahui aktivitas spesifik dari enzim (Palmer, 1991).

Kadar protein ditentukan dengan metode biuret yang didasarkan pada pembentukan kompleks berwarna ungu. Kompleks ini terbentuk apabila suatu protein yang mempunyai empat atom nitrogen dari asam amino berikatan dengan Cu^{2+} dari CuSO_4 . Dengan mengetahui kadar proteinnya maka dapat ditentukan aktivitas spesifik enzim. Menurut Wiseman (1985) reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Gambar 2.8 pembentukan kompleks ungu Protein-Biuret

2.10. Spektroskopi 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 maka akan terjadi penyerapan terhadap radiasi inframerah yang energinya bersesuaian dengan energi vibrasi molekuler. Akibat penyerapan ini, amplitudo vibrasi mengalami peningkatan, sementara intensitas radiasi inframerah mengalami

penurunan. Hal ini yang mendasari timbulnya spektra inframerah dari suatu molekul yang mengakibatkan molekul mengalami perubahan tingkat energi vibrasi dan tingkat energi rotasi (biasanya dari tingkat energi dasar) (Day dan Underwood, 1990).

Spektra inframerah aluminosilikat terdapat pada daerah 4000-400 cm^{-1} (Hay and Raval, 1997). Polimer aluminosilikat yang terdiri dari silika dan alumina memberikan spektra yang khas pada daerah inframerah 1250-300 cm^{-1} . Pita pada daerah 1150 cm^{-1} merupakan spektra dari vibrasi Si-O-Al sedangkan vibrasi Si-O-Si terletak pada 1033 cm^{-1} dan rentangan yang menunjukkan ikatan Al-O terjadi pada pita 900-650 cm^{-1} . Adapun pita pada daerah bilangan gelombang 3500-3800 cm^{-1} adalah vibrasi dari gugus OH (Gritco, *et al*, 2005).

2.11. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dari penelitian adalah:

1. Pemurnian akan mempengaruhi aktivitas spesifik enzim.
2. Jumlah enzim yang teradsorpsi pada karier mempengaruhi aktivitas spesifiknya.
3. Amobilisasi mempengaruhi aktivitas spesifik enzim.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai November 2006.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan sebagai sumber enzim adalah kultur murni kapang *Mucor miehei*.

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: dekstrosa, NaCl, KH_2PO_4 , ZnSO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KNa-tartrat, Na_2HPO_4 , asam sitrat, laktosa, asam palmitat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$), aluminosilikat mesopori, asam sitrat, ammonium sulfat ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BaCl_2 , HCl pekat, KOH 0,2 M, fenoltalein, t-butanol. Semua bahan tersebut mempunyai derajat kemurnian pro analis (p.a) kecuali BSA (Bovin Serum Albumin), ekstrak yeast, agar, pepton, kertas saring, kentang, akuades.

3.2.3. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, pengaduk magnetik, autoklave elektrik (All American Model 20x), jarum ose, inkubator (merek Heracus tipe B 50-42 and Memmert), sentrifuse (Fisher Scientific Centrifuge), shaker (merek Edmund Buhler SM25), pH meter (merek Gerate and Schoot tipe CG-820), lemari pendingin, oven pemanas, sentrifuse dingin (merek Denley BR 401), neraca analitik Mettler (merek Toledo AL 204), spektronick 20 Bausch & Lomb.

3.3. Tahapan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan yang berupa pemurnian enzim menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-75%, 75-90%) dan amobilisasi enzim lipase yang terdiri dari lima perlakuan yaitu

variasi konsentrasi larutan enzim (1, 2, 3, 4, 5) mL yang diencerkan dengan buffer sitrat fosfat pH 5 hingga volume 5mL.

Tiap perlakuan diulang 3 kali dan rancangan percobaan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan parameter yang diamati adalah aktivitas enzim bebas dan amobil serta kadar protein enzim sisa dan amobil.

Tahapan kerja yang dilaksanakan meliputi:

1. Penyiapan media
2. Peremajaan biakan
3. Pembuatan Media Cair untuk Produksi Lipase
4. Pembuatan inokulum
5. Pembuatan kurva pertumbuhan
6. Produksi enzim
7. Isolasi ekstrak kasar lipase
8. Penentuan kadar protein
9. Penentuan aktivitas
10. Pemurnian ekstrak kasar lipase
11. Penentuan kadar protein hasil pemurnian
12. Penentuan aktivitas enzim hasil pemurnian
13. Amobilisasi enzim
14. Penentuan kadar protein enzim amobil
15. Penentuan aktivitas enzim amobil

3.4. Cara kerja

3.4.1. Penyiapan Media

Media yang digunakan adalah agar dekstrosa kentang (PDA) dengan komposisi kentang 50 gram, dekstrosa 5 gram, agar 3 gram dan akuades 200 mL.

Kentang yang sudah dipotong kecil-kecil direbus dalam akuades selama 1 jam kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat ditambah dekstrosa dengan dipanaskan, didinginkan lalu ditambah 10 mL asam sitrat untuk mendapatkan pH 5 dan penambahan buffer sitrat fosfat pH 5 untuk mempertahankan pH. Kemudian ditambah agar dan dipanaskan sampai mendidih. Larutan di atas dipipet 5 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, disterilkan dalam autoclave pada 121°C, 15 psi selama 15 menit, selanjutnya dibiarkan memadat sambil dimiringkan.

3.4.2. Peremajaan Biakan

Biakan *Mucor miehei* digoreskan pada media padat dengan ujung jarum ose aseptik yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum ose, ditutup kembali dengan kapas steril, diinkubasi pada 50°C selama 4 hari.

3.4.3. Pembuatan Media Cair

Media pertumbuhan *Mucor miehei* untuk menghasilkan lipase terdiri atas: pepton 0,75 g, ekstrak yeast 2,5 g, NaCl 2,5 g, KH₂PO₄ 6,7 g, KH₂PO₄ 8,4 g, MgSO₄·7H₂O 0,25 g, lalu dilarutkan dalam 350 mL akuades dan ditambah larutan aktivator 1,00 mL. Kondisi pH diatur hingga 5 dengan penambahan asam sitrat. Ditambah akuades hingga volume 400 mL, lalu tiap 200 mL larutan dituang ke dalam erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan 18,75 g asam palmitat ke dalam masing-masing erlenmeyer. Semua erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 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 autoklaf pada suhu 121°C, 15 psi selama 15 menit. Setelah itu larutan didinginkan pada suhu ruang kemudian masing-masing larutan dipindah ke dalam larutan pertama.

3.4.4. Pembuatan inokulum

Kapang yang telah tumbuh dalam media padat miring yang berumur 3 hari ditambahkan akuades steril sebanyak 10 mL pada tiap tabung reaksi kemudian dikocok lalu dipindah ke dalam 100 mL media cair kemudian diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar sampai setengah fase log yaitu 24 jam (Anugrawati, 2007). Suspensi spora ini berfungsi sebagai inokulum.

3.4.5. Produksi dan Isolasi Enzim

Larutan inokulum sebanyak 25 mL diinokulasi ke dalam 250 mL media pertumbuhan, diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar sampai fase awal stasioner yaitu 56 jam (Anugrawati, 2007). Setelah itu ditambahkan buffer sitrat fosfat pH 5 sebanyak 25 mL lalu disentrifugasi dengan kecepatan

3000 rpm suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dari endapannya dan disimpan dalam lemari pendingin. Supernatan tersebut merupakan ekstrak kasar lipase.

3.4.6. Penentuan Kadar Protein

3.4.6.1. Pembuatan Kurva Baku BSA

Ditimbang sebanyak 1 g BSA, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok BSA 10000 ppm. Dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)mL lalu dimasukkan labu ukur 10 mL yang berbeda. Ditambahkan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan BSA (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000)ppm. Tiap konsentrasi larutan BSA diambil 2 mL, dimasukkan pada tabung reaksi berbeda lalu ditambah 8 mL reagen biuret dan 2 mL buffer sitrat fosfat pH 5 lalu dikocok dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Sebelum mengukur absorbansi larutan standar, ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya pada konsentrasi 833,3 ppm. Larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linear sehingga dihasilkan kurva baku BSA.

3.4.6.2. Penentuan Kadar Protein Lipase

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim ditambah 8 mL reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 50°C. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum BSA sehingga kadar protein diketahui. Untuk larutan enzim yang tidak memberikan serapan saat dilakukan pengukuran maka ditambah 2 mL larutan BSA 5000 ppm dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar BSA.

3.4.7. Uji Aktivitas Lipase

Laktosa dan asam palmitat dengan perbandingan mol 1:10 (0,036 g: 0,2564 g) dicampur dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya larutan t-butanol sebanyak 5 mL dan

larutan ekstrak kasar lipase 2 mL. Campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C. Setelah itu ditambahkan indikator fenoltalein 3 tetes lalu di titrasi dengan larutan KOH 0,1653 M hingga terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Sebagai blanko, titrasi campuran dilakukan sebelum inkubasi.

3.4.8. Pemurnian Ekstrak Kasar Lipase

Ekstrak kasar lipase dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-75%, 75-90%. Untuk fraksi 0-20%, sebanyak 8,475 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dicampurkan dalam 75 mL larutan ekstrak kasar lipase lalu diaduk hingga $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut semua. Selanjutnya disentrifuge pada 3000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan ditambahkan 9,075 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lalu disentrifugasi menghasilkan fraksi 20-40%. Supernatan fraksi 20-40% ditambah 9,75 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ untuk fraksi 40-60%. Fraksi 60-75% dilakukan dengan penambahan 7,725 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada supernatan fraksi sebelumnya. Supernatan fraksi 60-75% ditambah 8,25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ menghasilkan fraksi 75-90%. Semua endapan yang terbentuk pada tiap fraksi dilakukan dialisis yaitu dengan menambahkan 10 mL buffer sitrat fosfat pH 5 dan dimasukkan dalam kantong selofan. Kemudian direndam dalam 100 mL buffer sitrat fosfat 0,07 M pH 5 dalam beaker gelas 250 mL sambil diaduk menggunakan stirer pada suhu rendah. Dialisis dilakukan selama 24 jam. Kemudian larutan buffer perendam diganti dengan buffer perendam yang baru sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan cara 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 mL larutan HCl 0,1 M dan ditambah beberapa tetes larutan BaCl_2 0,1 M. Apabila tidak ada endapan, dialisis dihentikan. Larutan enzim yang diperoleh untuk selanjutnya dilakukan uji kadar protein dan aktivitasnya.

3.4.9. Amobilisasi enzim

Disiapkan enzim hasil pemurnian dengan cara memipet (1, 2, 3, 4 dan 5) mL larutan enzim murni, kemudian diencerkan dengan buffer sitrat fosfat pH 5 hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 0,1 gram aluminosilikat. Campuran diinkubasi dalam inkubator goyang pada

suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm selama 2 jam agar enzim teradsorpsi dengan sempurna. Selanjutnya aluminosilikat disaring dan aluminosilikat di kertas diuji aktivitasnya sedangkan untuk filtrat diuji kadar proteinnya.

3.4.10. Uji Kadar Protein Sisa

Untuk menentukan kadar protein tidak terjebak maka sebanyak 2 mL filtrat dari enzim amobil setelah penyaringan ditambah 2 mL larutan BSA 5000 ppm dan 8 mL reagen biuret kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 50°C. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum BSA. Kadar protein lipase diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar BSA.

3.4.11. Uji Aktivitas Lipase Amobil

Laktosa dan asam palmitat dengan perbandingan mol 1:10 (0,036 g: 0,2564 g) dicampur dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya t-butanol sebanyak 5 mL dan enzim lipase amobil 0,1 g. Campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C. Setelah itu ditambahkan indikator fenoltalein 3 tetes lalu di titrasi dengan larutan KOH 0,1653 M hingga terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Sebagai blanko, titrasi campuran dilakukan sebelum inkubasi.

3.5. Analisa Data

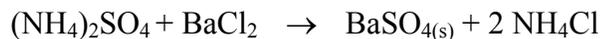
Data tentang penentuan aktivitas spesifik enzim lipase amobil di analisis dengan uji F menggunakan Pola Rancangan Lacak (RAL) dan perlakuan diulang 3 kali. Bila F hitung lebih besar dari F tabel (α , db) maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pemurnian Ekstrak Kasar Lipase

Tujuan pemurnian enzim adalah memisahkan enzim dari komponen pengotor yang mengganggu sisi aktif enzim. Metode yang dipakai yaitu pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi. Metode ini dilakukan dengan cara menambahkan amonium sulfat dengan berbagai variasi konsentrasi ke dalam larutan ekstrak kasar enzim disertai dengan pengadukan pada suhu rendah (4°C) agar enzim yang bersifat termolabil tidak rusak.

Pengendapan bertingkat dilakukan dengan tingkat kejenuhan amonium sulfat 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-75% dan 75-90%. Fraksinasi amonium sulfat merupakan salah satu cara pemurnian enzim melalui proses pengendapan. Penambahan garam amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein, karena terjadinya kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out*. Dialisis dilakukan untuk mengeluarkan garam yang ikut terendapkan pada protein dan dihentikan bila semua garam telah keluar dari protein, yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih BaSO₄ pada saat penambahan BaCl₂ ke dalam larutan buffer perendam. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:

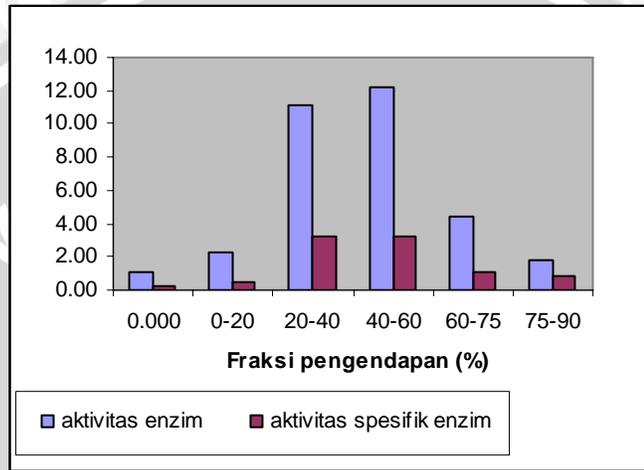


Untuk mengetahui tingkat kemurnian pada setiap tahap fraksinasi amonium sulfat maka dilakukan uji aktivitas lipase per miligram protein. Nilai aktivitas enzim per miligram protein disebut sebagai aktivitas spesifik enzim, jadi kemurnian enzim ditunjukkan dengan aktivitas spesifiknya bukan dari jumlahnya. Hal ini karena lipase sebagai enzim merupakan substansi yang dinamis, sehingga akan sulit untuk menentukan kemurnian enzim berdasarkan jumlahnya

Dari hasil pemurnian berfraksi diperoleh data pada Tabel 4.1 dengan perhitungan terdapat pada lampiran L.7.2 dan hubungan antara fraksi pengendapan dengan aktivitas serta aktivitas spesifik enzim pada Gambar 4.1.

Tabel 4.1 Aktivitas, kadar protein dan aktivitas spesifik lipase bebas

Fraksi (%)	Aktivitas (µg/mL menit)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (µg/mg menit)
0	1,030	5,11	0,202
0-20	2,257	4,40	0,513
20-40	11,088	3,453	3,211
40-60	12,251	3,73	3,275
60-75	4,464	4,36	1,024
75-90	1,766	1,97	0,893



Gambar 4.1 Diagram hubungan antara fraksi pengendapan dengan aktivitas serta aktivitas spesifik enzim

Tabel 4.1 dan Gambar 4.1 menunjukkan bahwa fraksinasi amonium sulfat meningkatkan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim. Hal ini terlihat bahwa pada fraksi 0% (sebelum pemurnian) memiliki nilai aktivitas serta aktivitas spesifik terendah. Nilai aktivitas dan aktivitas spesifik meningkat setelah fraksi 0% dan pada fraksi 40-60% dicapai nilai maksimum lalu mengalami penurunan pada fraksi berikutnya. Menurut Palmer (1991) aktivitas dan aktivitas spesifik enzim akan terus meningkat selama proses fraksinasi dan akan mencapai nilai maksimum apabila enzim tersebut dalam keadaan murni.

Pemurnian meningkatkan aktivitas spesifik enzim karena sisi aktif enzim dapat dengan mudah kontak dengan substrat, tak terhalang oleh pengotor atau protein bukan enzim sehingga reaksi enzimatik dapat berlangsung lebih optimal, yaitu bekerja lebih baik dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi. Larutan ekstrak kasar enzim banyak mengandung protein bukan lipase, sehingga jumlah protein dalam ekstrak kasar besar. Melalui pemurnian enzim, komponen selain lipase dalam larutan ekstrak kasar enzim dapat dipisahkan sehingga kadar protein setelah pemurnian menjadi lebih kecil. Akan tetapi dari hasil penelitian didapatkan bahwa fraksi ke empat (fraksi 60-75%) kadar protein meningkat sedangkan aktivitasnya menurun. Hal ini karena protein bukan enzim dengan berat molekul lebih rendah dari lipase terendapkan pada fraksi tersebut. Proses pemurnian melalui pengendapan bertingkat, akan mengendapkan lebih dahulu protein dengan berat molekul lebih besar karena pengaruh gaya gravitasi.

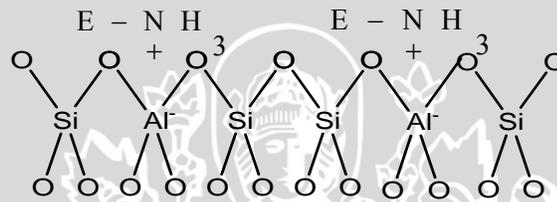
Fraksi dengan aktivitas spesifik paling besar memiliki tingkat kemurnian paling tinggi. Dari hasil pemurnian diketahui bahwa fraksi 0-20% aktivitas spesifiknya paling rendah (0,513 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit) bila dibanding fraksi yang lain. Hal ini karena pada fraksi tersebut konsentrasi lipase paling rendah sehingga jumlah lipase per miligram protein juga kecil dan reaksi enzimatik yang terjadi kurang optimal. Fraksi 40-60% memiliki aktivitas spesifik paling besar (3,275 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit), hal ini berarti bahwa pada fraksi ini banyak terendapkan lipase sehingga kemurnian enzim paling tinggi terdapat pada fraksi ini. Fraksi pengendapan 60-75%, 75-90% secara berturut-turut mengalami penurunan aktivitas spesifik. Penurunan aktivitas spesifik tersebut, karena enzim lipase telah banyak terendapkan pada fraksi sebelumnya dan berarti bahwa pada fraksi tersebut banyak protein bukan enzim yang terendapkan.

4.2. Amobilisasi Lipase pada Aluminosilikat

Amobilisasi enzim merupakan enzim yang secara fisik ditempatkan dalam suatu ruang tertentu dengan tetap memiliki aktivitas dan dapat digunakan secara berulang dan terus-menerus (Smith, 1988). Dalam penelitian, amobilisasi lipase dilakukan dengan metode pengikatan pada karier, yaitu pengikatan enzim pada karier yang tidak larut air (aluminosilikat mesopori) melalui pengikatan secara fisik dan ionik.

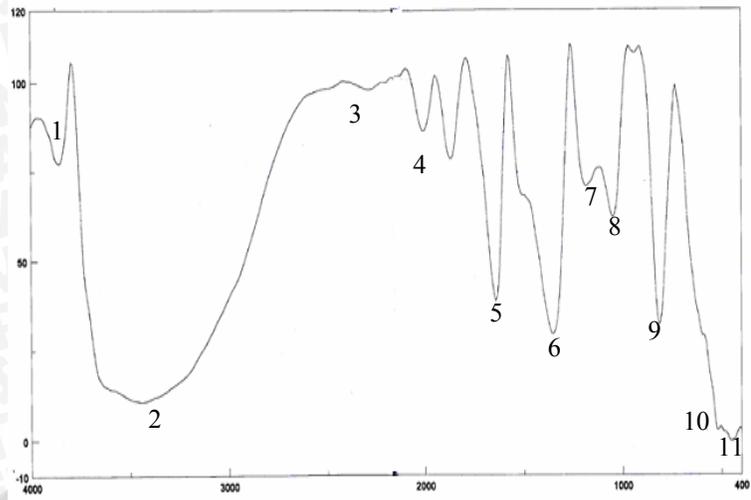
Pengikatan enzim secara fisik yaitu bahwa aluminosilikat menahan enzim secara fisik dalam pori-porinya. Salah satu faktor yang mempengaruhi adsorpsi adalah luas permukaan yang tersedia untuk proses adsorpsi. Luas permukaan diartikan sebagai luas permukaan total yang tersedia untuk proses adsorpsi. Aluminosilikat mesopori memiliki ukuran pori 50 Å (Roosdiana, dkk, 2006) dan lipase berdiameter 40 Å (Fessner, 2000), sehingga lipase dapat masuk ke dalam pori aluminosilikat.

Pengikatan secara ionik didasarkan pada ikatan ionik antara lipase yang bermuatan positif dengan aluminosilikat yang mengandung residu penukar ion. Muatan negatif pada O-Al-O di dalam polimer aluminosilikat menyebabkan polimer tersebut bersifat sebagai penukar kation. Sedangkan lipase memiliki pH isoelektrik 6,5 (Shimada, *et al*, 1993), sehingga pada pH 5 lipase akan bermuatan positif. Aluminosilikat bentuk asam Bronsted dikarenakan polimer tersebut mengikat H^+ , yang terikat pada situs negatif aluminosilikat dan akan digantikan oleh $E-NH_3^+$ milik enzim. Ukuran $E-NH_3^+$ yang lebih besar dari kation H^+ menyebabkan $E-NH_3^+$ mampu mendorong H^+ keluar.

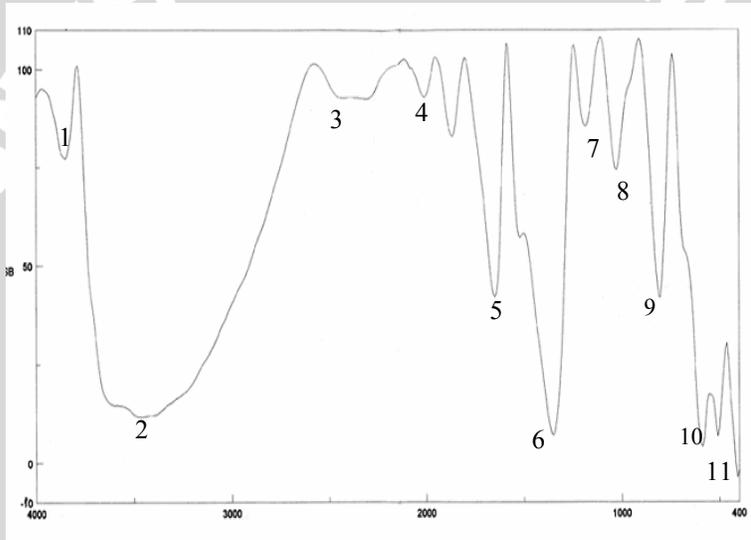


Gambar 4.2 Interaksi antara enzim dengan aluminosilikat

Spektroskopi inframerah merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengkaji polimer anorganik silika maupun aluminosilikat dengan mudah dan cepat. Hal ini karena vibrasi pada ikatan T-O (T = Si, Al) di dalam polimer tersebut memberikan spektra yang khas pada daerah inframerah tengah, yaitu pada 1250-300 cm^{-1} . Sehingga untuk mengetahui keberhasilan proses amobilisasi lipase dalam aluminosilikat, maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer inframerah. Identifikasi lipase amobil dalam aluminosilikat ditunjukkan oleh spektra pada Gambar 4.4 dengan membandingkan terhadap spektra aluminosilikat pada Gambar 4.3. Adapun interprestasinya terdapat pada Tabel 4.2.



Gambar 4.3 Spektra Aluminosilikat Mesopori



Gambar 4.4 Spektra Aluminosilikat dan Lipase Amobil

Tabel 4.2 Nilai Bilangan Gelombang Aluminosilikat

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Interpretasi	Data dari referensi (cm ⁻¹)
	Alumino Silikat (a)	Lipase amobil (b)		
1	3759,275	3743,75	OH silanol	3750-3650 (Hay dan Hema, 1998)
2	3440,39	3463,53	OH ikatan H pada air	3500-3400 (Hay dan Hema, 1998)
3	2300	2400	Overtone TO	
4	1866,76	1865	Serapan kombinasi	2000-1667 (Sastroamidjojo, 1992)
5	1643,05	1650,77	C=C aromatik	1650-1450 (Sastroamidjojo, 1992)
6	1357,64	1349,63	CH ₃ bending Rentangan COO (b)	1350-1360 Dekat 1400 (Silverstein, 2005)
7	1179	1167,94	TO asim eksternal	± 1200 (Hay dan Hema, 1998)
8	1049,09	1025,94	TO asim internal	1150-1050 (Hay dan Hema, 1998)
9	817,67	809,96	TO sim eksternal	1150-1033 (Hay dan Hema, 1998)
10	593	586,25	Tekuk T-O	950-650 (Gritco, <i>dkk.</i> , 2005)
11	450	420	Pori	500-420 (Kurniawati, 2004)

Dari data pada Tabel 4.2 diketahui bahwa pita 7, 8, 9, 10, 11 merupakan pita yang menjadi ciri khas senyawa aluminosilikat. Pita tersebut merupakan serapan TO_4 dari silika dan alumina dalam polimer aluminosilikat.

Aluminosilikat mempunyai gugus-gugus OH yang berasal dari gugus silanol terkait pita 1. Gugus-gugus OH tersebut menyebabkan aluminosilikat bersifat cukup polar sehingga mudah menyerap air kembali. Hal ini menyebabkan aluminosilikat hasil sintesis masih mengandung molekul air ditinjau dari keberadaan pita 2, meskipun menurut Zhaou (1996) dilakukan pemanasan yang cukup tinggi saat kalsinasi pada proses sintesis aluminosilikat.

Pita 4, 5 dan 6 menunjukkan bahwa aluminosilikat mengandung senyawa aromatik. Hal ini dimungkinkan berasal dari sisa mesitilen yang belum terdekomposisi secara sempurna saat kalsinasi. Pita 4 merupakan serapan kombinasi yang menunjukkan trisubstitusi pada gugus aromatik.

Adanya enzim teramobil dalam aluminosilikat dapat dibuktikan bahwa pita 6 pada spektra (aluminosilikat + enzim) intensitasnya meningkat, yang diakibatkan tumpang tindih dengan rentangan COO^- milik enzim. Pita 7 pada spektra (aluminosilikat+enzim) juga lebih tajam dibanding dengan pita 7 pada spektra aluminosilikat. Hal ini disebabkan enzim yang terikat pada situs negatif polimer, sehingga intensitas TO eksternal menjadi lebih kuat. Pita 11 yang menunjukkan pori aluminosilikat menjadi lebih besar intensitasnya dengan adanya enzim teradsorpsi. Rentangan NH yang menunjukkan enzim tidak tampak pada spektra. Hal ini dimungkinkan sedikitnya enzim yang teradsorpsi dalam aluminosilikat.

Keberadaan enzim dalam aluminosilikat dapat pula diketahui dari pergeseran pita-pita karakteristik polimer aluminosilikat ke arah bilangan gelombang yang lebih kecil. Adanya interaksi intermolekuler antara enzim dengan aluminosilikat menyebabkan kekuatan ikatan polimer menurun, yang berakibat menurunkan konstanta gaya sehingga frekuensi menurun (frekuensi sebanding dengan bilangan gelombang).

4.3. Aktivitas Esterifikasi Lipase Amobil

Penggunaan enzim amobil pada reaksi esterifikasi menghasilkan produk ester yang ramah lingkungan karena dalam

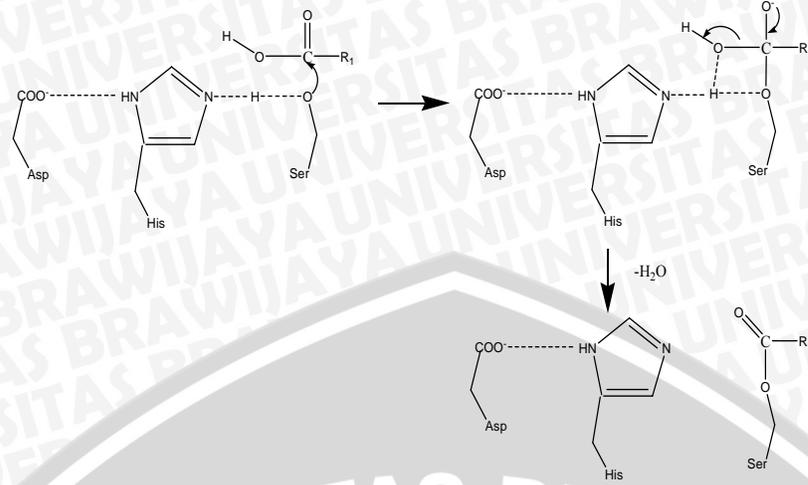
proses enzimatis tidak menggunakan bahan-bahan yang bersifat toksik dan mengurangi biaya penggunaan enzim karena enzim amobil dapat dipergunakan lagi (Sekeroglu, *et al*, 2004). Dalam penelitian, lipase amobil berperan mengkatalisis asam palmitat dan laktosa.

Pengukuran aktivitas enzim dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi secara kuantitatif yaitu berdasarkan jumlah asam lemak yang diukur sebelum dan sesudah waktu inkubasi secara titrasi asam basa (Sekeroglu, *et al*, 2004). Enzim amobil dimasukkan dalam campuran laktosa dan asam palmitat lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam karena menurut Widyastuti (2005) suhu optimum lipase dari *Mucor miehei* dalam reaksi esterifikasi adalah 50° C dan waktu inkubasi optimum 24 jam. Lipase untuk esterifikasi akan mengalami deaktivasi jika suhu inkubasi lebih dari 60°C (Sekeroglu, *et al*, 2004).

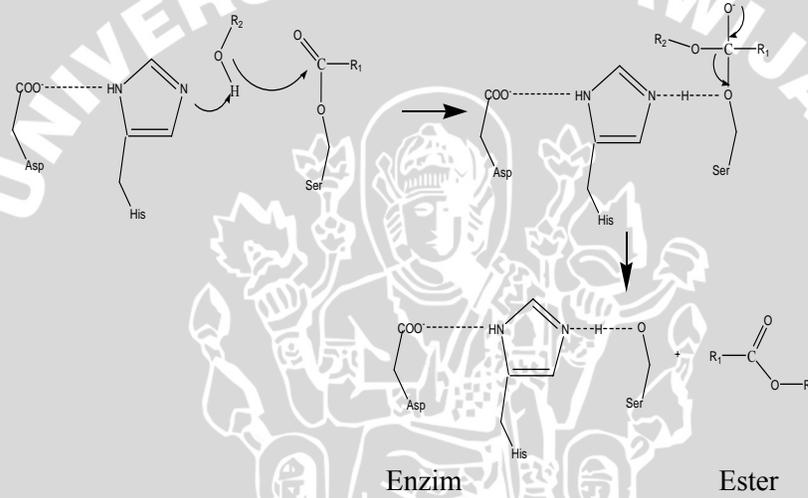
Enzim mempunyai gugus-gugus asam amino yang dapat mengalami ionisasi dan berperan dalam reaksi katalitiknya. Lipase memiliki tiga asam amino yang merupakan sisi aktif lipase dan berperan dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi. Tiga asam amino tersebut yaitu asam aspartat, histidin dan serin (Asp-His-Ser) yang yang letaknya berdekatan. Gugus-gugus asam amino ini dipengaruhi oleh pH sehingga konsentrasi ion H⁺ yang ada disekitar asam amino tersebut mempengaruhi keadaan ionisasinya. Pada pH yang sesuai, gugus R mengion dan berperan dalam reaksi katalitik. Menurut Widyastuti (2005) proses esterifikasi oleh lipase dari *Mucor miehei* dilakukan pada pH 5.

Mekanisme esterifikasi enzimatis oleh lipase terdiri dari dua tahap yaitu asilasi dan deasilasi. Pertama – tama, substrat memasuki rongga katalitik lipase, lalu terjadi tahap asilasi dilanjutkan dengan tahap deasilasi. Pada tahap asilasi, histidin mendeptonasi sebagian rantai samping hidroksi dari serin. Gugus hidroksi serin ini dapat menyerang gugus karbonil asam palmitat sehingga terbentuk senyawa antara tetrahedral pertama. Lepasnya H₂O menghasilkan kembali karbon karbonil dengan atom karbon yang trigonal. Pada tahap deasilasi, terjadi serangan gugus RO dari laktosa sehingga terbentuk senyawa tetrahedral kedua lalu produk ester terbentuk dan enzim didapatkan kembali. Mekanisme reaksi esterifikasi adalah seperti pada Gambar 4.5:

Tahap asilasi



Tahap deasilasi



Keterangan:
 R₁ = Asam palmitat (C₁₆H₃₂)
 R₂ = Laktosa (C₁₂H₁₉O₁₀)

Gambar 4.5 Mekanisme esterifikasi enzimatik

Pembentukan ester secara enzimatis sesuai mekanisme katalitik yaitu:



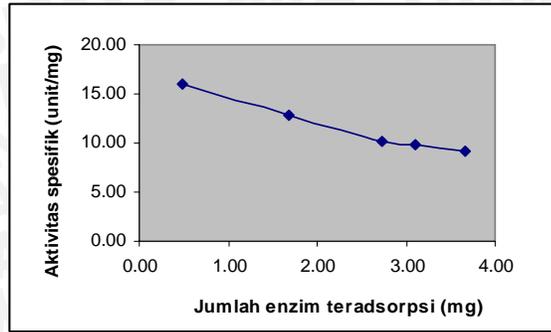
sehingga reaksi esterifikasi yang terjadi tidak bersifat reversibel seperti pada reaksi esterifikasi pada umumnya. Hal ini menyebabkan tidak terjadi reaksi hidrolisis oleh lipase. Lipase amobil mengkatalisis reaksi antara laktosa dan asam palmitat sehingga dihasilkan produk ester yaitu laktosil palmitat. Akan tetapi dalam penelitian ini tidak dilakukan identifikasi serta karakterisasi produk ester. Laktosil palmitat secara teori terbentuk, dengan menganalogkan pada penelitian Rahman dan Herawan (2000) bahwa ester dari gula dan asam lemak dapat dihasilkan dengan menggunakan lipase amobil sebagai katalis. Pembentukan ester dapat pula ditentukan dari aktivitas enzim dalam mengkatalisis reaksi (Schmid, *et al*, 2001). Hal ini karena enzim bekerja secara spesifik terhadap substrat yang dikatalisisnya.

4.4. Pengaruh Jumlah Enzim Teradsorpsi terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Amobil

Menurut Lehninger (1990) aktivitas spesifik enzim adalah aktivitas enzim per miligram protein, sehingga jumlah enzim teradsorpsi akan mempengaruhi besar aktivitas spesifik enzim amobil. Semakin banyak jumlah enzim yang dapat teradsorpsi dalam karier, maka aktivitas enzim akan besar dan aktivitas spesifik enzim akan konstan. Kajian tentang pengaruh jumlah enzim teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik dilakukan pada lima variasi konsentrasi larutan enzim. Dari hasil penelitian diperoleh data pada Tabel 4.4 dan digambarkan pada Gambar 4.6 dengan perhitungan pada lampiran L.9 dan L.10.

Tabel 4.4 Aktivitas Spesifik Enzim Amobil

Konsentrasi larutan enzim (mg/mL)	Jumlah enzim yang teradsorpsi (mg enzim/0,1 g enzim amobil)	Aktivitas ($\mu\text{g/g}$ menit)	Aktivitas spesifik ($\mu\text{g/mg}$ menit)
0,746	0,49	107,838	16,019
1,492	1,69	215,864	12,773
2,238	2,72	279,642	10,099
2,984	3,11	304,172	9,780
3,730	3,67	338,514	9,224



Gambar 4.6 Grafik hubungan jumlah enzim yang teradsorpsi dengan aktivitas spesifik enzim amobil

Berdasarkan uji statistik (lampiran 11) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh jumlah enzim yang teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil. Hal ini dibuktikan dengan nilai $F_{hitung}(35,116) > F_{tabel}(3,48)$. Uji BNT dengan tingkat kesalahan 5% menunjukkan hasil berbeda nyata untuk konsentrasi larutan enzim 0,746 mg/mL dan 1,492 mg/mL.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa aktivitas spesifik enzim amobil menurun dengan semakin meningkatnya jumlah enzim teradsorpsi. Hal ini karena kenaikan jumlah enzim tidak sebanding dengan kenaikan aktivitasnya, yaitu kenaikan jumlah enzim teradsorpsi lebih besar daripada kenaikan aktivitasnya. Ketidaksebandingan tersebut disebabkan oleh substrat sulit untuk masuk ke dalam aluminosilikat. Semakin besar konsentrasi enzim yang dikenakan pada permukaan karier berarti jumlah enzim teradsorpsi dalam aluminosilikat semakin besar pula. Akan tetapi dengan semakin banyaknya jumlah enzim teradsorpsi maka ruang dalam aluminosilikat yang tersisa akan semakin berkurang, dan substrat sulit untuk berikatan dengan sisi aktif enzim. Hal ini menyebabkan kompleks enzim-substrat tidak terbentuk secara optimal.

4.5. Pengaruh Amobilisasi terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Amobil

Amobilisasi enzim adalah suatu keadaan dimana enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak. Berdasarkan hal tersebut, maka aktivitas spesifik lipase pada saat keadaan amobil

lebih besar dibanding pada saat lipase dalam keadaan bebasnya. Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan kajian tentang pengaruh amobilisasi terhadap aktivitas spesifik enzim amobil. Dari hasil penelitian diperoleh data pada Tabel 4.5 dengan perhitungan pada lampiran L.10.

Tabel 4.5 Aktivitas Spesifik Lipase Bebas dan Amobil

Jumlah enzim* (mg)	Aktivitas spesifik ($\mu\text{g}/\text{mg}$ menit)	Kenaikan aktivitas spesifik
3,73	3,275	1x
0,49	16,019	5x
1,69	12,773	4x
2,72	10,099	3x
3,11	9,780	2x
3,67	9,224	2x

* dalam 1 mL lipase murni (untuk enzim bebas) dan dalam 0,1 g (aluminosilikat + enzim) untuk enzim amobil yang digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

Berdasarkan Tabel 4.4 aktivitas spesifik lipase amobil lebih besar daripada aktivitas spesifiknya dalam keadaan bebas. Amobilisasi menyebabkan lipase dalam keadaan statis sehingga substrat lebih mudah mencari sisi aktif lipase untuk berikatan. Hal ini menyebabkan enzim amobil bekerja secara spesifik lebih baik terhadap substrat. Sedangkan pada keadaan bebasnya substrat lebih sulit mencari sisi aktif enzim, karena baik substrat maupun enzim terus bergerak. Pada jumlah enzim 0,49 mg/0,1 g enzim amobil, menghasilkan aktivitas spesifik terbesar (16,701 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit) dari variasi konsentrasi larutan enzim yang dilakukan dengan kenaikan aktivitas spesifik sebesar lima kali dari aktivitas spesifiknya saat keadaan bebas, sehingga pada jumlah enzim tersebut merupakan jumlah enzim amobil yang optimal.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Pemurnian meningkatkan aktivitas spesifik enzim yaitu dari 0,202 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit menjadi 3,275 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit
2. Jumlah enzim teradsorpsi mempengaruhi aktivitas spesifiknya. Pada jumlah lipase teradsorpsi 0,49-3,67 mg/0,1 g (aluminosilikat+enzim), aktivitas spesifik menurun (16,019 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit - 9,224 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit)
3. Amobilisasi lipase pada aluminosilikat dapat menaikkan aktivitas spesifik lipase amobil, yaitu sebesar 5 kali dibandingkan dengan enzim bebasnya.

5.2. Saran

1. Identifikasi dan karakterisasi sebaiknya dilakukan terhadap ester yang terbentuk.
2. Untuk mengetahui efisiensi lipase amobil maka perlu dilakukan penelitian tentang kestabilan lipase untuk tetap teradsorpsi dalam karier setelah beberapa kali pemakaian.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous^a, 2006, **Asam Palmitat**, <http://id.wikipedia.org/wiki/Asampalmitat>
- Anonymous^b, **Introduction: Immobilized Enzymes Past, Present and Prospect**, <http://media.wiley.com>, Diakses tanggal 23 September 2006
- Anonymous^c, 2006, **Investigating Proteins**, <http://www.unilever.com>, Diakses tanggal 12 Mei 2006
- Anugrawati, R., 2007, **Penentuan Suhu Dan Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Lipase Dari *Rhizopus oryzae* untuk Pembuatan Ester laktosa**, Skripsi, Universitas Brawijaya
- Beck, J.S., Vartulli, J.C., and Roth, W.J., 1992, **A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Template**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1083-10843
- Belitz, H.D., and W Grosch, 1987, **Food Chemistry**, Springer-Verlag, Berlin, pp 118-120
- Charlie, M.J., and Wilkinson, 1994, **Fungi**, Academic Press, London
- Dauids, M.E., and Lobo, R.F., 1992, **Zeolite dan Molecular Sieve Synthesis**, *Journal of American Chemical Society*, vol 2, pp 756-768
- Day, R.A., dan Underwood, A.L., 2001, **Analisis Kimia Kuantitatif**, Alih Bahasa: Dr.Ir. Iis Sopyan, M.Eng, Erlangga, Jakarta
- Fennema, O.R., 1996, **Food Chemistry**, 3rd ed., Marcell Dekker, Inc., New York, pp 455, 504
- Fessenden, R.J., dan J.S Fessenden, 1986, **Kimia Organik Jilid 2**, edisi ketiga, alih bahasa: A.H Pudjaatmaka, Erlangga, hal 351
- Fessner, W.D., 2000, **Biocatalysis from Discovery to Application**, Springer-Verlag, Germany, pp 96,106
- Fox, P., and Gruferty, 1991, **Food Enzymology**, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp 245-247

- Gilson, J.P., 1991, **Organic and Inorganic Agents in The Synthesis of Molecular Sieves**, Zeolith Microporous solid : Synthesis, Structure, and Reactivity, p.20-21, Kluwer Academic Publishers, Netherland
- Gritco, Moldovan, and Simon, V., 2005, **Thermal dan Infrared Analyses of Aluminosilicate Glass**, Journal of Optoelectronics dan Advanced Materials Vol. 7, No. 6, December 2005, pp 2845 – 2847, Diakses tanggal 10 September 2006
- Hawley's, G., 1987, **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**, 7th edition, Van Nostrdan Reinhold, new York
- Hay, J.N., and H.M Raval, 1998, **Solvent-Free Synthesis Of Binary Inorganic Oxides**, Journal Mater. Chem., pp 1233–1239, Diakses tanggal 10 September 2006
- Janson, J.C., and L. Ryden, 1998, **Protein purification**, John Willey dan Sons, Inc., New York, pp 13, 21-31
- Jay, J.M., 1991, **Modern Food Biotechnology**, fourth ed, Van Nostrdan Reinhold, New York
- Judoamidjojo, R.M., Darwis, A.A., dan Sa'id E.G., 1992, **Teknologi Fermentasi**, Rajawali Press, Jakarta, hal 10-13
- Kawi, S., and Lai, M.W, 1998, **More Economical Synthesis of Mesoporous MCM-41**, Enabling science 1407
- Kurniawati. R., 2004, **Studi Awal Amobilisasi Enzim Linamarase menggunakan Zeolit Alam yang Difosfatasi**, Skripsi, Universitas Brawijaya
- Lehninger, A.L., 1992, **Dasar-dasar Biokimia**, jilid 1, Alih bahasa: Thenawidjaja, M., Erlangga, Jakarta, hal 235-241
- Lichtenthaler, F., 2004, **Carbohydrates as raw material for Chemical Industry**, Darmstadt university of technology, Germany
- Luan, Z., Cheng, C.F., Zhou, W., and Klinoswki, J., 1995, **Mesopore Molecular Sieve MCM-41 Containing Framework Aluminium**, J.phys. Chem., 99, 1018-1024
- Mathews, C.K and Van Holde, K.E., 1990, **Biochemistry**, Benjamin Cummings Pubkishing Company Inc., USA, hal 12-13

- Martoharsono, S., 1983, Jilid 1, UGM Press, hal 45-73
- Page, D.S., 1989, **Prinsip-prinsip Biokimia**, edisi kedua, diterjemahkan oleh Soendoro, Erlangga, Jakarta, hal 80-141
- Palmer, T., 1991, **Understaning Enzymes**, 3th ed., Ellis Harwood Limited, Engl, pp 81-83
- Prayitno, K.B., 1989, **Zeolit sebagai Alternatif Industri Komoditi Mineral di Indonesia**, Majalah BPPt, no XXXV, Jakarta, hal 15-24
- Roosdiana, A., Tutik, S., Diah, M., dan Suratmo, 2006, **Pembuatan Ester Laktosa dari Limbah Susu (Whey) menggunakan Lipase yang diamobilisasi dalam Aluminosilikat**, Universitas Brawijaya, Malang
- Sangceta, D., John, K., and Kiemly, **Inorganic Materials Chemistry**, 2nd ed., CRC Press, New York
- Sastroamidjojo, H., 1992, **Spektroskopi Inframerah**, Liberty, Yogyakarta
- Schmid, R., Bertagnolii, and Dieter H Wolf, 2001, **Enzymatic Production Of Sugar Fatty Acid Esters**, Stuttgart University, Germany, Diakses tanggal 23 September 2006, pp 4, 12-15
- Sekeroglu, G., Fadiloglu, S., and Ibanoglu, E., **Production and Characterization of Isopropyl Laurate Using Immobilized Lipase**, J.Eng.Env.Sci.Turkish.TURBITAK, Diakses tanggal 24 Januari 2006, Hal 241-246
- Shimada, Y., Iwai, M., and Tsujisaka, Y., **Reversibility of the Modification of Rhizopus delemar Lipases by Phosphatidylcholine**, 1993, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>, Diakses tanggal 30 November 2006
- Silverstein, R., Francis, W., and David, K., 2005, **Spectrometric Identification Organic Compounds**, seventh edition, John Willey and Sons, Inc., New York, pp 72-103
- Smart, L., and Moore, E., 1992, **Solid State Chemistry**, Chapman dan Hall, London, pp 202-203
- Smith, J.E., 1995, **Bioteknologi** ed 2, Alih bahasa: dr. Danry Hartono, Penerbit Buku Kedoteran EGC, Jakarta, hal 76-81

- Sorensen, H.S., and Sorensen, C.B., and Michaelsen, 1999, **Chromatographi and Capillary Electrophoresis in Food Analysis**, MPG Books, Ltd., Bodmin Cornwall, UK
- Suharto, 1995, **Bioteknologi dalam Dunia Industri**, Dani Offset, Yogyakarta, hal 122, 139
- Suhendra, L., 2004, **Aktivitas Hidrolisis dan Esterifikasi Lipase Ekstrak Kecambah Biji Wijen (*Sesamun indicum*)**, Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Gadjah Mada
- Tortora, G.J., Berdell, K., and Christine, L. C., 2001, **Microbiology an Introduction**, Addison Wesley Longman, Inc., USA pp 173-174
- Trevan, M.D., 1980, **Immobilized Enzymes an Introduction dan Application in Biotechnology**, John Willey dan Sons, Ltd, USA, pp 1-10
- Utomo, Hari, 1997, **Rangkuman Metode Isolasi Enzim Skala Laboratorium**, Universitas Brawijaya, Malang, hal 45-55
- Voet, D and Voet, J., 1990, **Biochemistry**, John Willey dan Sons, Inc., New York, pp 432,509
- Vosmann, Foglia, T.A., and Jones, K.C., 2006, **Solvent Free Lipase Catalyzed Preparation iof Long Chain Alkyl Phenylpropane and Phenylpropyl Alkanoates**, Germany
- Widyastutik, C., 2005, **Penentuan Suhu dan Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Lipase Amobil dari *Mucor Miehei***, Skripsi, Universitas Brawijaya
- Winarno, F.G., 1995, **Enzim Pangan**, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal 66- 71
- Wiseman, A., 1985, **Handbook of Enzyme Biotechnology**, 2nd ed., Ellis Horwood Ltd
- Wong, D. W, 1995, **Food Enzymes**, Chapman & Hall, New York, pp 175-181
- Zhao, X. S., Lu., g. q., and Millar, G. J., 1996, “**Advances in Mesoporous Molecular Sieve MCM-41**”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 35, 2075-2090

LAMPIRAN

Lampiran 1: Pembuatan Pereaksi

L.1.1. Larutan KOH 0,2 M

Ditimbang 11,20 g KOH dan dilarutkan dengan alkohol dalam gelas kimia lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L dan diencerkan dengan alkohol hingga tanda batas.

L.1.2. Standarisasi larutan KOH 0,1653 M

Ditimbang 1,26 g asam oksalat dihidrat ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) dilarutkan dengan akuades lalu diencerkan labu ukur 100 mL hingga tanda batas. Dipipet 10 mL larutan asam oksalat di atas dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL, ditambahkan indikator fenolftalein 1% sebanyak 3 tetes lalu dititrasi dengan larutan KOH 0,2 M sampai berwarna merah muda. Selanjutnya normalitas KOH dihitung dari dua kali ulangan.

L.1.3. Larutan HCl 0,1 M

Dipipet 0,83 mL dari larutan HCl pekat, dimasukkan dalam gelas kimia lalu ditambah akuades hingga volume 100 mL.

L.1.4. Larutan $BaCl_2$ 0,1 M

Ditimbang 2,4428 g $BaCl_2$, lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia lalu diencerkan hingga volume 100 mL.

L.1.5. Larutan stok Bovin Serum Albumin (BSA) 10000 ppm.

Ditimbang sebanyak 1,0 g BSA, dilarutkan dalam 50 mL akuades dalam gelas kimia lalu dipindah ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas.

L.1.6. Larutan BSA Standar

Disiapkan 9 buah labu ukur 10 mL, masing-masing diisi dengan larutan stok BSA 10000 ppm sebanyak (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan BSA standar (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000)ppm.

L.1.7. Larutan Indikator Fenolftalein 0,1%

Ditimbang 0,1 gram fenolftalein dalam 100 mL etanol 70%.

L.1.8. Larutan asam sitrat 0,1 M

Ditimbang 4,80 gram asam sitrat, lalu dilarutkan dengan sedikit air. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL, diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.9. Larutan Na_2HPO_4 0,2 M

Ditimbang 2,84 gram Na_2HPO_4 , lalu dilarutkan dengan sedikit air. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.10. Larutan Buffer sitrat fosfat pH 5

Sebanyak 100 mL larutan Na_2HPO_4 0,2 M dimasukkan dalam gelas kimia, lalu ke dalamnya dimasukkan pengaduk magnetik. Elektroda dipasang dan dicelupkan pada larutan. Dilakukan penambahan asam sitrat sedikit demi sedikit ke dalam larutan hingga mencapai pH 5.

L.1.11. Reagen Biuret

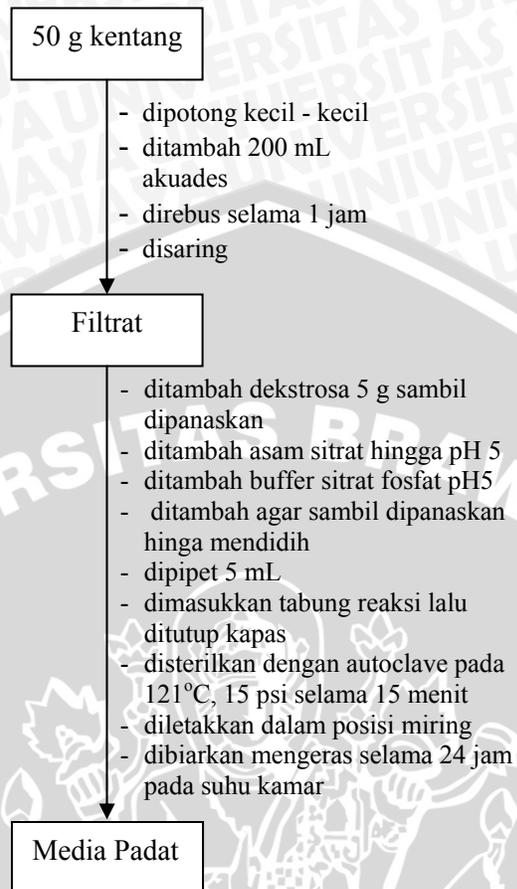
Ditimbang 0,375 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 1,8 gram Natrium Kalium Tartrat ($\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dan dilarutkan dengan 100 mL akuades lalu dipindah ke dalam labu ukur 250 mL. Setelah itu, ditambahkan 75 mL larutan NaOH 10 % sambil dikocok dan diencerkan sampai tanda batas.

Lampiran 2: Alur Penelitian



Lampiran 3: Diagram Kerja Penelitian

L.3.1. Pembuatan Media Padat



L.3.2. 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 akuades hingga volume 400 mL
- dituang tiap 200 mL larutan ke dalam erlenmeyer 500 mL
- ditambah 18,75 g asam palmitat
- ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklave 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 autoklave pada 121°C , 15 psi selama 15menit

- dicampurkan tiap 50 mL larutan laktosa dan dekstrosa ke dalam tiap 200 mL larutan pertama

Media Cair

L.3.3. Produksi dan Isolasi Enzim

Kapang dari biakan

- dipindahkan sebanyak 1 mata ose ke dalam media padat
- diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari di inkubator

Kapang tumbuh pada PDA

- ditambahkan akuades steril 10 mL pada tiap tabung reaksi
- dipindah ke dalam 100 mL media cair

100 mL larutan inokulum

- dipipet sebanyak 25 mL

25 mL larutan inokulum

- dimasukan dalam erlenmeyer 500 mL berisi 250 mL media cair
- diinkubasi dalam inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm selama 4 hari dalam suhu ruang hingga ke awal fase stasioner (56 jam)

Media Produksi

- disaring dengan kertas saring

Filtrat

- ditambah buffer sitrat fosfat pH 5 sebanyak 25 mL
- disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C, selama 30 menit
- diambil supernatannya

Ekstrak kasar lipase

L.3.4. Penentuan Kadar Protein Lipase

L.3.4.1. Pembuatan Larutan Stok BSA 10000 ppm

1 gram BSA

- dilarutkan dalam 50 mL akuades
- dipindahkan ke dalam labu ukur 100mL
- diencerkan dengan akuades hingga tanda batas
- dikocok sampai homogen

Larutan BSA 10000 ppm

- diambil sebanyak (1,2,3,4,5,6,7,8,9)mL lalu dimasukkan labu ukur 10 mL yang berbeda
- ditambah akuades hingga tanda batas
- dikocok hingga homogen

Larutan BSA (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm

L.3.4.2. Penentuan λ_{maks} BSA

2 mL BSA 5000 ppm

- ditambah 8 mL reagen biuret
- ditambah 2 mL buffer sitrat fosfat pH5
- dikocok dan didiamkan pada suhu 50°C
- diukur absorbansinya pada λ 460 nm sampai 590 nm
- dicari λ maksimumnya

Data

L.3.4.3. Penentuan Kurva Baku BSA

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

- ditambah 8 mL reagen biuret
- ditambah 2 mL buffer sitrat fosfat pH 5
- dikocok
- diinkubasi selama 30 menit pada 50°C
- diukur absorbansinya pada λ_{maks}

Data

L.3.4.4. Penentuan Kadar Protein

Larutan enzim

- diambil 2 mL
- ditambah 8 mL reagen biuret
- ditambah 2 mL BSA
- diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ_{maks} BSA

Data

L3.5. Uji Aktivitas Lipase

Laktosa : asam palmitat (1 : 10)

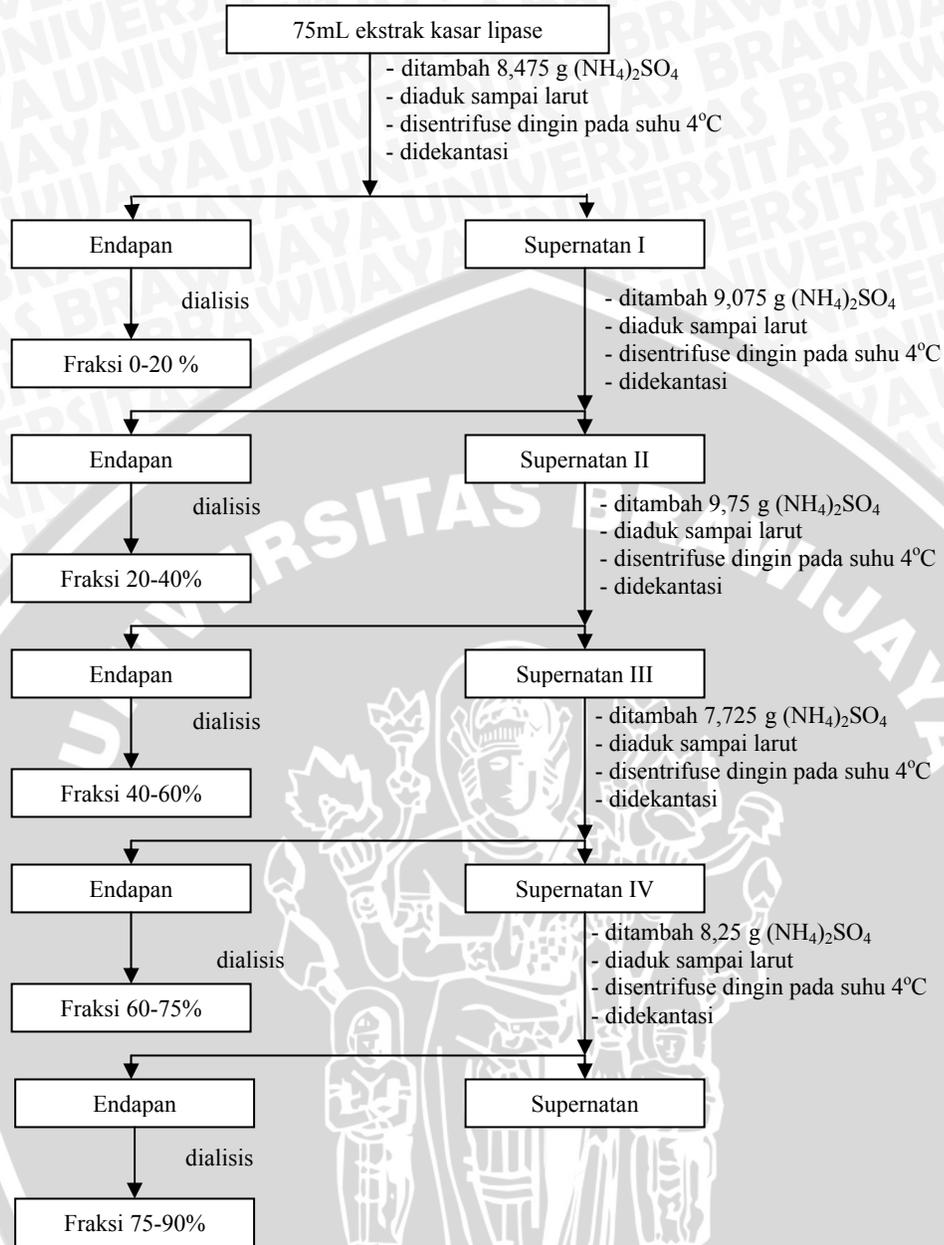
- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL t-butanol
- ditambahkan 2 mL larutan enzim
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C
- ditambah 3 tetes fenolftalein
- dititrasi dengan KOH 0,1653M sampai berwarna merah muda

Hasil

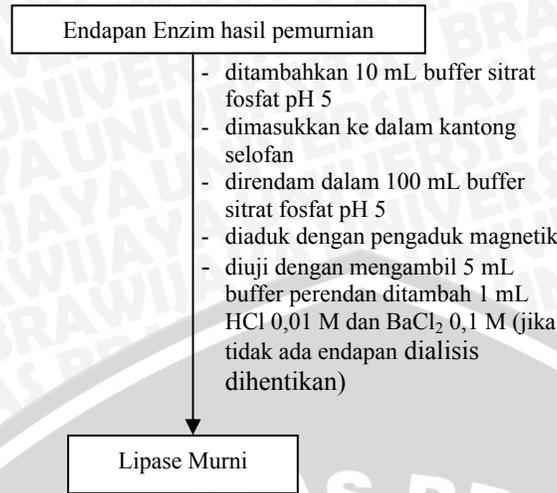
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



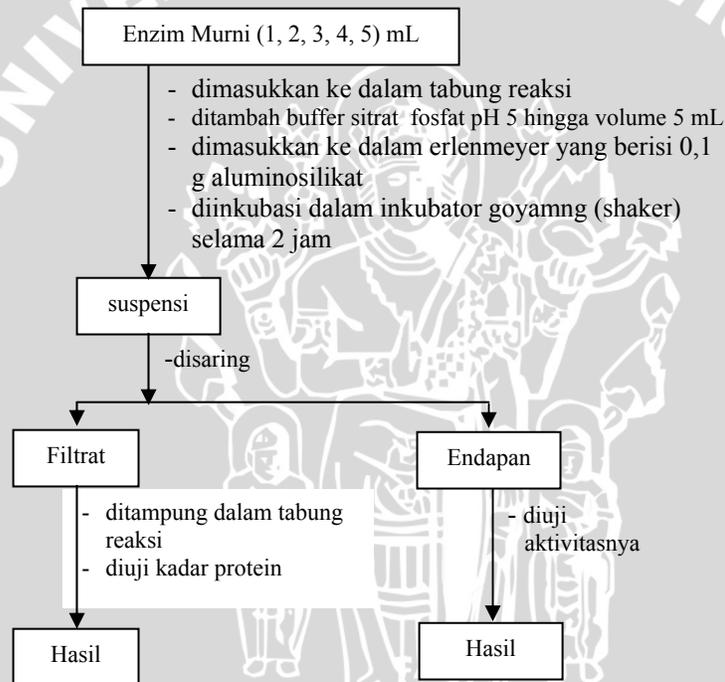
L.3.6. Pemurnian Ekstrak Kasar Lipase Fraksi (0-90%)



L.3.7. Dialisis



L.3.8. Amobilisasi Enzim Lipase

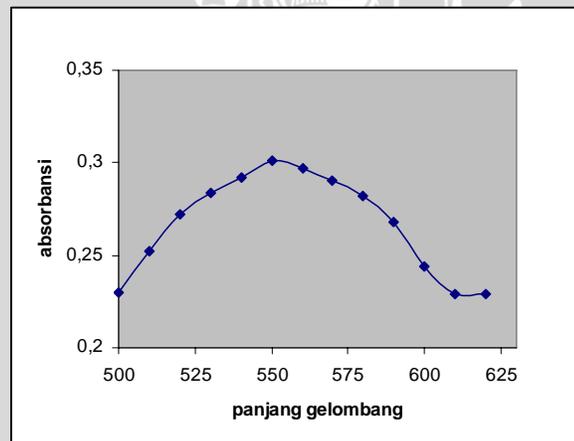


Lampiran 4

Penentuan panjang gelombang maksimum
Bovin Serum Albumin (BSA)

Tabel L.4.1. Absorbansi Larutan Standar BSA 833,333 ppm

λ (nm)	A1	A2	A Rata-rata
500	0,231	0,229	0,230
510	0,252	0,252	0,252
520	0,272	0,272	0,272
530	0,284	0,284	0,284
540	0,292	0,292	0,292
550*	0,301	0,301	0,301
560	0,297	0,297	0,297
570	0,292	0,288	0,290
580	0,284	0,280	0,282
590	0,268	0,268	0,268
600	0,244	0,244	0,244
610	0,299	0,229	0,229
620	0,229	0,229	0,229



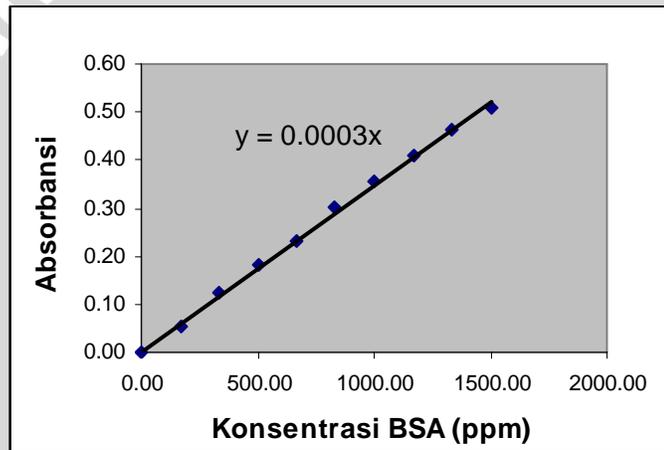
Gambar L.4.1 Kurva Penentuan Panjang gelombang maksimum BSA

Lampiran 5

Pembuatan Kurva Baku

Tabel L.5.1. Absorbansi Larutan Baku BSA λ 550 nm

BSA (ppm)	A1	A2	A3	A Rata-rata
0	0	0	0	0
166,6	0,055	0,051	0,052	0,053
333,3	0,125	0,124	0,125	0,125
500,0	0,187	0,180	0,185	0,183
666,6	0,237	0,229	0,233	0,233
833,3*	0,301	0,301	0,303	0,302
1000,0	0,356	0,356	0,354	0,355
1166,6	0,415	0,409	0,413	0,409
1333,3	0,469	0,456	0,464	0,464
1500,0	0,509	0,506	0,510	0,508



Gambar L.5.1 Kurva Standar BSA

Lampiran 6

Pembakuan Larutan KOH

Tabel L.6.1 Pembakuan KOH 0,2 M dengan asam oksalat 0,1 M

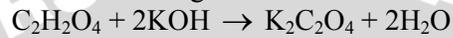
Volume asam oksalat (mL)	Volume KOH (mL)			Total (mL)	Volume KOH rata-rata
	I	II	II		
10	12,10	12,10	12,10	36,30	12,10

Konsentrasi asam oksalat:

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

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

Reaksi antara asam oksalat dengan KOH:



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

$$M_{\text{KOH}} = \frac{2 \times \text{vol. asam oksalat} \times [\text{asam oksalat}]}{\text{vol. KOH}}$$

$$= \frac{2 \times 10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ M}}{12,10} = 0,1653 \text{ M}$$



Lampiran 7

Pemurnian Enzim

L.7.1. Pemurnian ekstrak kasar lipase dengan ammonium sulfat fraksi 0-90%

Penambahan amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar lipase berdasarkan Tabel amonium sulfat yang ditambahkan pada setiap liter larutan enzim (lampiran 13).

Contoh: fraksi 0-20%, maka perlu ditambahkan 113 g amonium sulfat pada 1000 mL larutan enzim, sehingga pada 75 mL ekstrak kasar lipase adalah :

$$\frac{113 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{w}{75 \text{ mL}}$$

$$w = 8,475 \text{ g}$$

w = banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan

Table L.7.1. Data Volume titran KOH hasil titrasi

Fraksi (%)	Volume Titran (mL)				
	I	II	III	Rerata	Blanko
0	7,15	7,15	7,15	7,15	7,22
0-20	7,05	7,05	7,1	7,067	7,22
20-40	6,5	6,45	6,45	6,467	7,22
40-60	6,4	6,4	6,35	6,380	7,22
60-75	6,9	6,9	6,95	6,917	7,22
75-90	7,10	7,10	7,10	7,070	7,22

Lampiran 8

Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Lipase bebas

L.8.1. Aktivitas lipase

Satu unit aktivitas lipase bebas adalah 1 µg asam palmitat yang bereaksi dengan laktosa oleh 2 mL lipase bebas dalam setiap menit.

$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{volume titrasi KOH} \times \text{M.KOH}}{\text{volume enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times \text{BM (asam lemak)}$$

$$= \frac{\text{volume titrasi (blanko - sampel)} \times \text{M.KOH}}{\text{volume enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times \text{BM (asam lemak)}$$

Contoh: Penentuan aktivitas lipase setelah pemurnian dengan volume titrasi 7,05 mL dan volume titrasi blanko 7,22 mL adalah:

$$\text{Aktivitas} = \frac{0,17 \text{ mL} \times 0,1653 \text{ mmol/mL}}{2 \text{ mL} \times 1440 \text{ menit}} \times 256,43 \text{ mg/mmol}$$

$$= 2,502 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL menit}$$

$$= 2,502 \text{ µg/mL menit}$$

Tabel L.8.1. Aktivitas lipase bebas

Fraksi (%)	Aktivitas (µg/mL menit)			Aktivitas rata-rata
	I	II	III	
0	1,030	1,030	1,030	1,030
0-20	2,502	2,502	1,766	2,257
20-40	10,597	11,333	11,333	11,088
40-60	12,069	12,069	12,510	12,215
60-75	4,709	4,709	3,974	4,464
75-90	1,766	1,766	1,766	1,766

L.8.2. Aktivitas spesifik Lipase bebas

L.8.2.1. Perhitungan Kadar Protein Lipase Bebas

Perhitungan kadar protein yaitu melalui pengkonversian nilai absorbansi lipase pada persamaan kurva standar BSA. menggunakan persamaan regresi kurva baku BSA. Diketahui persamaan BSA :

$$Y = 3.10^{-4}X$$

Dimana: Y = absorbansi
X = konsentrasi

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar BSA 833,333 ppm yang ditambahkan = 2mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$2 \text{ mL} \times 5000 \text{ ppm} = 12 \text{ mL} \times M_2$$

$$M_2 = 833,333$$

$$\text{Konsentrasi total} = \text{Konsentrasi Protein Enzim} + \text{BSA } 833,333 \text{ ppm}$$

Contoh: perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,43 adalah:

$$Y = 3.10^{-4}X$$

$$0,43 = 3.10^{-4}X$$

$$X = 1433,333$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total - konsentrasi BSA yang ditambahkan
 $= 1433,333 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm}$
 $= 600,000 \text{ ppm}$
 $= 0,600 \text{ mg/mL}$

Sehingga kadar protein lipase bebas:

$$= 0,600 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}$$

$$= 3,600 \text{ mg/mL}$$

Tabel L.8.2.1. Kadar protein lipase bebas

Fraksi (%)	Absorbansi			Kadar protein (mg/mL)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
0	0,31*	0,30*	0,31*	5,17	5,00	5,17	5,11
0-20	0,26*	0,26*	0,27*	4,35	4,35	4,5	4,40
20-40	0,425	0,425	0,418	3,500	3,500	3,360	3,453
40-60	0,43	0,45	0,43	3,60	4,00	3,60	3,73
60-75	0,45	0,475	0,48	4,00	4,50	4,60	4,36
75-90	0,355	0,345	0,345	2,10	1,90	1,90	1,97

* dilakukan tanpa penambahan larutan standar BSA 2 mL

Perhitungan kadar protein tanpa penambahan BSA 833,333 ppm:

Contoh: perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,26 ppm adalah:

$$\begin{aligned}
 Y &= 3.10^{-4}X \\
 0,26 &= 3.10^{-4}X \\
 X &= 866,67 \text{ ppm} \\
 &= 0,87 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

$$\text{Sehingga kadar protein} = 0,87 \text{ mg/mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} = 4,35 \text{ mg/mL}$$

L.8.2.2. Aktivitas spesifik lipase bebas

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{aktivitas}}{\text{kadar protein}}$$

Contoh : penentuan aktivitas spesifik lipase bebas dengan aktivitas 12,215 µg/mL menit.

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas spesifik} &= \frac{\text{aktivitas}}{\text{kadar protein}} \\
 &= \frac{12,215 \text{ µg/mL menit}}{3,73 \text{ mg/mL}} \\
 &= 3,275 \text{ µg/mg menit}
 \end{aligned}$$

Tabel L.8.2.2. Aktivitas, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Lipase Bebas

Fraksi (%)	Aktivitas ($\mu\text{g}/\text{mL}$ menit)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik ($\mu\text{g}/\text{mg}$ menit)
0	1,030	5,11	0,202
0-20	2,257	4,40	0,513
20-40	11,088	3,453	3,211
40-60	12,215	3,73	3,275
60-75	4,464	4,36	1,024
75-90	1,766	1,97	0,893

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 9

Penentuan Jumlah Enzim Lipase

L.9.1. Jumlah enzim sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah enzim bebas setelah pemurnian yaitu 3,73 mg/mL enzim. Sehingga jumlah enzim lipase sebelum amobilisasi dalam 5 mL larutan enzim yang mengandung V mL enzim dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$W = 3,73 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ mL enzim yang dicuplik}$$

Dimana :

V = volume enzim murni yang dicuplik = (1, 2, 3, 4, 5) mL

W = jumlah enzim mula-mula sebelum amobilisasi (mg)

Contoh :

W (1 mL) enzim = 3,73 mg/mL enzim x 1 mL = 3,73 mg

Dengan cara yang sama, maka jumlah enzim sebelum amobilisasi yaitu: (3,73; 7,46; 11,19; 14,92; 18,65) mg.

Konsentrasi lipase sebelum amobilisasi untuk 1mL/ 5 mL adalah:

$$\frac{3,73 \text{ mg/mL} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0,746 \text{ mg/mL}$$

Dengan cara yang sama diketahui konsentrasi larutan enzim sebelum amobilisasi sebesar : (0,746; 1,492; 2,238; 2,984; 3,73) mg/mL

L.9.2. Jumlah enzim setelah amobilisasi

Tabel L.9.2.1. Volume larutan enzim setelah amobilisasi

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Volume larutan enzim (mL)			Volume larutan enzim (mL) rata-rata
	I	II	III	
0,746	2,5	2,6	2,5	2,53
1,492	2,4	2,4	2,5	2,43
2,238	2,4	2,3	2,3	2,36
2,984	2,3	2,2	2,3	2,33
3,730	2,3	2,4	2,2	2,30

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan= 2 mL
 Volume larutan BSA 833,333 ppm yang ditambahkan= 2 mL
 Volume larutan yang diukur absorbansinya=12mL

Jumlah enzim setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi lipase yang tidak terjebak dengan persamaan regresi BSA.

Untuk perhitungan jumlah enzim setelah amobilisasi pada konsentrasi 0,746 mg/mL dengan nilai absorbansinya 0,32 adalah:

Diketahui persamaan regresi :

$$y = 3.10^{-4}X$$

$$0,31 = 3.10^{-4}X$$

$$X = 1033,33 \text{ ppm}$$

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

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi enzim} &= 1033,33 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm} \\ &= 199,997 \text{ mg/L} \\ &= 0,199 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Diketahui volume larutan enzim setelah amobilisasi adalah 2,53 mL sehingga jumlah lipase setelah amobilisasi:

$$0,199 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 2,53 \text{ mL} = 3,04 \text{ mg}$$

Tabel L.9.2.2. Jumlah enzim setelah amobilisasi

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Absorbansi			Jumlah enzim setelah amobilisasi (mg)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
0,746	0,30	0,30	0,31	2,53	2,53	3,04	2,70
1,492	0,31	0,33	0,32	2,92	3,89	3,40	3,40
2,238	0,34	0,35	0,37	4,25	4,72	5,66	4,88
2,984	0,39	0,40	0,38	6,52	6,99	6,06	6,52
3,730	0,43	0,45	0,44	8,29	9,20	8,74	8,74

L.9.3. Penentuan jumlah enzim yang teradsorpsi dalam aluminosilikat

Untuk menentukan jumlah enzim yang teradsorpsi dalam aluminosilikat dilakukan dengan mengurangi jumlah enzim sebelum amobilisasi dengan jumlah enzim setelah amobilisasi.

$$W_{\text{teradsorpsi}} = W_{\text{sebelum amobilisasi}} - W_{\text{setelah}}$$

Dimana : $W_{\text{sebelum amobilisasi}}$ = jumlah enzim sebelum amobilisasi (mg)
 $W_{\text{setelah amobilisasi}}$ = jumlah enzim setelah amobilisasi (mg)

Tabel L.9.3.1. Jumlah enzim yang teradsorpsi dalam 0,1 g aluminosilikat

Jumlah enzim sebelum amobilisasi (mg)	Jumlah enzim setelah amobilisasi (mg)			Jumlah enzim teradsorpsi dalam 0,1 g aluminosilikat (mg)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
3,73	2,53	2,53	3,04	1,20	1,20	0,69	1,03
7,46	2,92	3,89	3,40	4,54	3,57	4,06	4,06
11,19	4,25	4,72	5,66	7,67	7,20	6,32	7,06
14,92	6,52	6,99	6,06	8,40	7,93	8,86	8,39
18,65	8,29	9,20	8,74	10,36	9,45	9,91	9,91

Diketahui : berat (enzim + aluminosilikat) yang digunakan pada saat pengukuran aktivitas = 0,1 g, sedangkan berat aluminosilikat+enzim seluruhnya setelah amobilisasi:

Tabel L.9.3.2. Berat aluminosilikat setelah amobilisasi

Konsentrasi larutan enzim hasil pemurnian (mg/mL)	Berat aluminosilikat setelah amobilisasi (g)
0,746	0,21
1,492	0,24
2,238	0,26
2,984	0,27
3,730	0,27

Sehingga jumlah lipase dalam 0,1 g (aluminosilikat+enzim) dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

Berat enzim dalam 0,1 g (aluminosilikat + enzim)

$$= \frac{0,1g}{W_c} \times W_{\text{teradsorpsi}}$$

Dimana: $W_{\text{teradsorpsi}}$ = jumlah enzim yang teradsorpsi dalam 0,1 g aluminosilikat

W_c = berat aluminosilikat setelah amobilisasi (g)

Contoh:

Perhitungan jumlah enzim setelah amobilisasi dalam 0,1 g (enzim+aluminosilikat) dengan W_c sebesar 0,22 g

$$= \frac{0,1 \text{ g}}{0,21 \text{ g}} \times 1,03 \text{ mg} = 0,49 \text{ mg}$$

Tabel L.9.3.3. Jumlah enzim dalam 0,1 g (aluminosilikat+enzim)

Konsentrasi larutan enzim hasil pemurnian (mg/mL)	Jumlah enzim(mg) yang teradsorpsi dalam 0,1 g (aluminosilikat+enzim)
0,746	0,49
1,492	1,69
2,238	2,72
2,984	3,11
3,730	3,67

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 10**Penentuan aktivitas dan aktivitas spesifik
Lipase Amobil****Tabel L.10 Volume titran KOH setelah amobilisasi**

Volume enzim (mL)	Volume Titrasi KOH (mL)				
	I	II	III	Rata-rata	Blanko
1	6,80	6,85	6,80	6,82	7,05
2	6,85	6,80	6,80	6,78	7,55
3	6,70	6,70	6,70	6,70	7,65
4	6,60	6,65	6,60	6,67	7,65
5	6,55	6,55	6,55	6,55	7,70

L.10.1. Aktivitas Lipase Amobil

Penentuan aktivitas lipase amobil dilakukan dengan cara membuat variasi konsentrasi larutan lipase, yaitu dengan mengambil (1, 2, 3, 4, 5) mL larutan enzim kemudian dilarutkan dengan buffer sitrat fosfat pH 5 hingga volume 5 mL. Perhitungan aktivitas lipase amobil dilakukan seperti pada perhitungan aktivitas lipase bebas pada L.8.1

Tabel L.10.1. Aktivitas enzim amobil

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Volume KOH yang dipakai (mL)			Aktivitas ($\mu\text{g/g}$ menit)			Aktivitas rata-rata ($\mu\text{g/g}$ menit)
	I	II	III	I	II	III	
0,746	0,25	0,30	0,25	73,590	88,308	73,590	78,496
1,492	0,70	0,75	0,75	206,052	220,770	220,770	215,864
2,238	0,95	0,95	0,95	279,642	279,642	279,642	279,642
2,984	1,05	1,00	1,05	309,078	294,360	309,078	304,172
3,730	1,15	1,15	1,15	338,514	338,514	338,514	338,514

L.10.2. Penentuan aktivitas spesifik lipase amobil

Perhitungan aktivitas spesifik lipase amobil dilakukan seperti pada perhitungan aktivitas spesifik lipase bebas pada L.8.2.2, dimana kadar protein untuk lipase amobil adalah jumlah lipase tiap 0,1 g (aluminosilikat + enzim).

Tabel L.10.2. Aktivitas spesifik lipase amobil

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (µg/mg menit)			Aktivitas spesifik rata-rata (µg/mg menit)
	I	II	III	
0,746	15,018	18,022	15,018	16,019
1,492	12,192	13,063	13,063	12,773
2,238	10,280	10,280	9,739	10,099
2,984	9,938	9,465	9,938	9,780
3,730	9,224	9,224	9,224	9,224



Lampiran 11

Uji statistik terhadap aktivitas spesifik lipase

Untuk mengetahui pengaruh jumlah enzim teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil maka harus dianalisis dengan menggunakan pola RAL sebagai berikut:

Tabel L.11.1. Analisis pengaruh konsentrasi larutan enzim terhadap aktivitas spesifik enzim amobil

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Aktivitas spesifik (µg/mg menit)			Total
	I	II	III	
0,746	15,018	18,022	15,018	48,058
1,492	12,192	13,063	13,063	38,318
2,238	10,280	10,280	9,739	30,299
2,984	9,938	9,465	9,938	29,341
3,730	9,224	9,224	9,224	27,672
Jumlah				173,688

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} = \frac{39.167,521}{15} = 2,011.10^3$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{a. JK total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ &= 2,114.10^3 - 2,011.10^3 \\ &= 103,367 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK}_{\text{perlakuan}} (\text{JK}_p) &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - \text{FK} \\ &= 2,108.10^3 - 2,011.10^3 \\ &= 96,501 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK}_{\text{galat percobaan}} (\text{JK}_G) &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\ &= 103,367 - 96,501 \\ &= 6,866 \end{aligned}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\begin{aligned} \text{a. Kuadrat Tengah}_{\text{perlakuan}} (\text{KT}_p) &= \frac{\text{JK}_p}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{96,501}{4} \end{aligned}$$

$$= 24,125$$

$$\begin{aligned} \text{b. Kuadrat Tengah}_{\text{galat percobaan}} (\text{KT}_G) &= \frac{\text{JK}_G}{\text{db}_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{6,866}{10} \\ &= 0,687 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$\begin{aligned} F_{\text{hitung}} &= \frac{\text{KT}_p}{\text{KT}_G} = \frac{24,125}{0,687} \\ &= 35,116 \end{aligned}$$

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

Tabel L.11.2. Analisis ragam pengaruh konsentrasi larutan enzim terhadap aktivitas spesifik enzim amobil

Sumber keragaman	db	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}
Perlakuan	4	103,367	24,125	35,116	3,48
Galat Percobaan	10	6,866	0,687		
Total	14				

5. Menghitung nilai BNT 5%

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } (\alpha) &= \frac{\alpha/2}{t_{dbg}} \sqrt{\frac{2KT_{galat}}{n}} \\
 &= 2,228 \sqrt{\frac{2 \times 0,687}{3}} \\
 &= 1,508
 \end{aligned}$$

Tabel L.11.3. Hasil uji BNT 5%

Konsentrasi	Konsentrasi	3,730	2,984	2,238	1,492	0,746
	Rataan	9,224	9,780	10,099	12,773	16,019
3,730	9,224	0	0,556	0,875	3,549*	6,795*
2,984	9,780		0	0,319	2,993*	6,239*
2,238	10,099			0	2,674*	5,920*
1,492	12,773				0	3,246*
0,746	16,019					0

Lampiran 12

Tabel L.12. Amonium sulfat yang ditambahkan (gram) dalam setiap liter larutan enzim (Sorensen, *et al*, 1999)

S1 %	S2 %	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	
	10			28	57	86	117	149	182	216	
		15			28	58	88	119	151	185	
			20			29	59	89	121	154	
				25			29	60	91	123	
					30			30	61	92	
						35			30	62	
							40			31	
								45			50
S1 %	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40	63	96	130	166	202	241	281	322	366	410	457
45	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
	55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
		60		33	67	103	140	179	219	261	305
			65		34	69	105	143	183	224	266
				70		34	70	107	146	186	228
					75		35	72	110	149	190
						80		36	73	112	152
							85		37	75	144
								90		37	76
									95		38

