

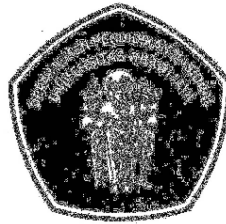
**AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* PADA
MATRIKS POLIPROPILEN UNTUK ESTERIFIKASI
LAKTOSIL OLEAT**

SKRIPSI

Oleh :

AREZA PUTRI SEMINAR

0510920008-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2009

**AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* PADA
MATRIKS POLIPROPILEN UNTUK ESTERIFIKASI
LAKTOSIL OLEAT**

SKRIPSI

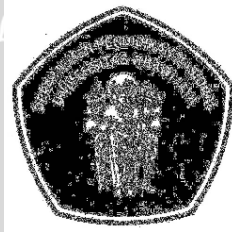
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh :

AREZA PUTRI SEMINAR

0510920008-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* PADA
MATRIKS POLIPROPILEN UNTUK ESTERIFIKASI
LAKTOSIL OLEAT**

oleh :

AREZA PUTRI SEMINAR

0510920008-92

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc

Dr. Diah Mardiana, MS

NIP. 132 000 070

NIP. 131 960 436

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS

NIP. 131 653 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Areza Putri Seminar

NIM : 0510920008-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

"Amobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor miehei* Pada Matriks Polipropilen Untuk Esterifikasi Laktosil Oleat"

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2009
Yang menyatakan,

(Areza Putri Seminar)
NIM. 0510920008-92

AMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI *Mucor miehei* PADA MATRIKS POLIPROPILEN UNTUK ESTERIFIKASI LAKTOSIL OLEAT

ABSTRAK

Lipase dapat digunakan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi dan memiliki peran yang penting dalam berbagai industri. Lipase perlu diamobilkan agar dapat digunakan untuk beberapa kali pemakaian. Lipase dari *Mucor miehei* dapat diamobilisasi menggunakan matriks polipropilen (PP) dengan adsorpsi fisik. Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum amobilisasi lipase menggunakan PP meliputi lama pengocokan dan konsentrasi lipase, mengetahui aktivitas spesifik lipase bebas serta pengaruh jumlah lipase yang teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil. Aktivitas spesifik lipase dapat ditentukan berdasarkan jumlah asam oleat yang bereaksi dengan laktosa dalam membentuk laktosil oleat per menit per mg lipase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum adsorpsi lipase dicapai pada lama pengocokan 2 jam dan konsentrasi lipase 2082 ppm, menghasilkan lipase teradsorpsi sebanyak 68,51 mg/g PP. Jumlah lipase teradsorpsi mempengaruhi aktivitas spesifiknya, yaitu pada jumlah lipase teradsorpsi 4,47 – 19,75 mg/g (PP + lipase), aktivitas spesifik menurun (16,926 – 10,670 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit). Amobilisasi dapat meningkatkan aktivitas spesifik lipase, yaitu 5,2 kali dibandingkan lipase dalam keadaan bebas.

Kata kunci: lipase, esterifikasi, amobilisasi, kondisi optimum

IMMOBILIZATION OF *Mucor miehei* LIPASE ON POLIPROPILEN MATRIX FOR ESTERIFICATION OF LACTOSIL OLEAT

ABSTRACT

Lipase can be used to catalyze esterification and has crucial role in industries. Lipase needs to be immobilized for repeatable use. *Mucor miehei* lipase is immobilized in polypropylene (PP) matrix by physical adsorption. The aim of this experiment was to determine optimum condition of immobilized lipase using PP include shaking time and lipase concentration, investigate specific activity of free lipase and also the effect of adsorbed lipase quantity to specific activity of immobilized lipase. Specific activity of lipase is determined based on the amount of oleic acid which reacted to lactose to produce lactosyl oleate per minute per mg of lipase. The result showed that the optimum of lipase adsorption was reached at 2 hours shaking time and lipase concentration of 2082 ppm resulting in adsorbed lipase of 68,51 mg/g PP. The adsorbed lipase quantity influenced its specific activity that showed from decreasing the specific activity (16,926 – 10,670 µg/mg minute) on 4,47 – 19,75 mg/g (PP + lipase) of adsorbed lipase. The immobilized lipase showed 5,2 times specific activity of free lipase.

Keywords: lipase, esterification, immobilization, optimum condition

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Amobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor miehei* Pada Matriks Polipropilen Untuk Esterifikasi Laktosil Oleat**, sebagai salah satu syarat kelulusan dan memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

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

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc dan Dr. Diah Mardiana, MS selaku Dosen Pembimbing I dan II, atas bimbingan, pengarahan dan kesabaran yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Atikah, Apt. MSc., selaku Dosen penasehat akademik yang telah memberikan nasehat dan arahan selama perkuliahan.
3. Dosen penguji, atas segala masukan, kritik dan saran yang diberikan untuk perbaikan naskah skripsi ini.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS., selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia yang telah memberikan fasilitas kepada penulis untuk mengadakan penelitian di seluruh laboratorium kimia.
5. Ibu, Ayah, Koko dan Adik yang selalu mendoakan, memberikan semangat dan kasih sayang.
6. Semua rekan-rekan Kimia 2005 dan semua pihak yang telah memberikan semangat dan persahabatan selama ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, sehingga penulis mengharap kritik dan saran guna perbaikannya dan semoga dapat bermanfaat bagi semua.

Malang, Agustus 2009

Penulis

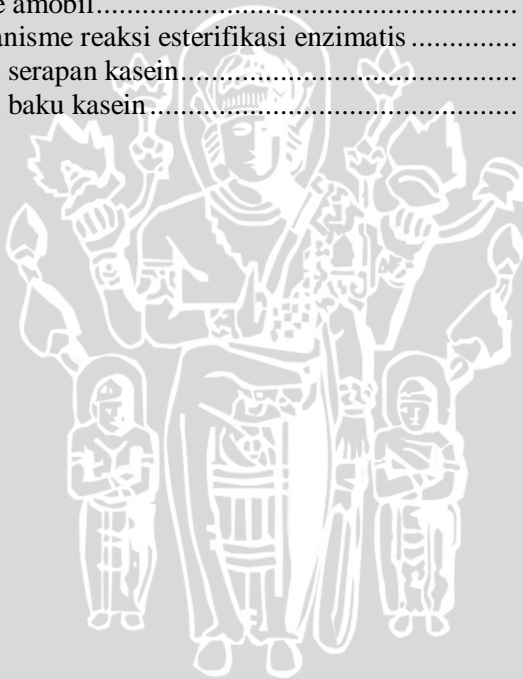
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah.....	3
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Enzim Lipase sebagai Katalis Reaksi Esterifikasi.....	4
2.2. Mikroba Penghasil Lipase.....	5
2.3. Isolasi Enzim.....	6
2.4. Pemurnian Enzim.....	6
2.5. Amobilisasi Enzim.....	7
2.6. Polipropilen.....	8
2.7. Ester Gula dari Laktosa dan Asam Oleat.....	9
2.7.1. Ester gula.....	9
2.7.2. Laktosa.....	10
2.7.3. Asam oleat.....	10
2.8. Aktivitas Esterifikasi Lipase.....	11
2.9. Penentuan Aktivitas Spesifik Lipase.....	11
2.10. Penentuan Kadar Protein.....	13
2.11. Hipotesis.....	14
BAB III. METODE PENELITIAN	15
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	15

3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	15
3.2.1. Bahan penelitian.....	15
3.2.2. Bahan kimia.....	15
3.2.3. Alat penelitian.....	15
3.3. Metode Penelitian.....	16
3.4. Cara Kerja Penelitian	16
3.4.1. Pembuatan matriks polipropilen	16
3.4.2. Pembuatan media padat.....	17
3.4.3. Penanam biakan murni	17
3.4.4. Pembuatan media cair untuk produksi enzim lipase... ..	17
3.4.5. Pembuatan inokulum	18
3.4.6. Produksi dan isolasi enzim lipase.....	18
3.4.7. Pembuatan kurva baku larutan kasein	18
3.4.8. Pemurnian ekstrak kasar lipase	19
3.4.9. Penentuan kadar protein lipase.....	20
3.4.10. Uji aktivitas lipase	20
3.4.11. Amobilisasi enzim	20
3.4.11.1. Penentuan lama pengocokan optimum adsorpsi enzim.....	20
3.4.11.2. Penentuan konsentrasi optimum enzim saat amobilisasi.....	21
3.4.12. Penentuan kadar protein sisa.....	21
3.4.13. Uji aktivitas lipase amobil.....	21
3.5. Analisa Data	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1. Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Enzim Lipase Menggunakan Matriks Polipropilen	23
4.1.1. Lama pengocokan optimum	23
4.1.2. Konsentrasi lipase optimum	24
4.2. Pengaruh Jumlah Lipase Teradsorpsi terhadap Aktivitas Spesifik Lipase Amobil	25
4.3. Pengaruh Amobilisasi terhadap Aktivitas Spesifik Lipase ...	28
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	30
5.1. Kesimpulan	30
5.2. Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	35

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur sisi aktif lipase.....	5
Gambar 2.2. Struktur polipropilen.....	9
Gambar 2.3. Struktur laktosa.....	10
Gambar 2.4. Struktur asam oleat.....	10
Gambar 2.5. Pembentukan kompleks ungu Protein-Biuret.....	13
Gambar 4.1. Penentuan lama pengocokan optimum terhadap jumlah lipase yang teradsorpsi polipropilen.....	23
Gambar 4.2. Penentuan konsentrasi lipase optimum terhadap jumlah lipase yang teradsorpsi polipropilen.....	25
Gambar 4.3. Pengaruh jumlah lipase terhadap aktivitas spesifik lipase amobil.....	26
Gambar 4.4. Mekanisme reaksi esterifikasi enzimatis.....	27
Gambar L.6.1. Kurva serapan kasein.....	50
Gambar L.7.1. Kurva baku kasein.....	51

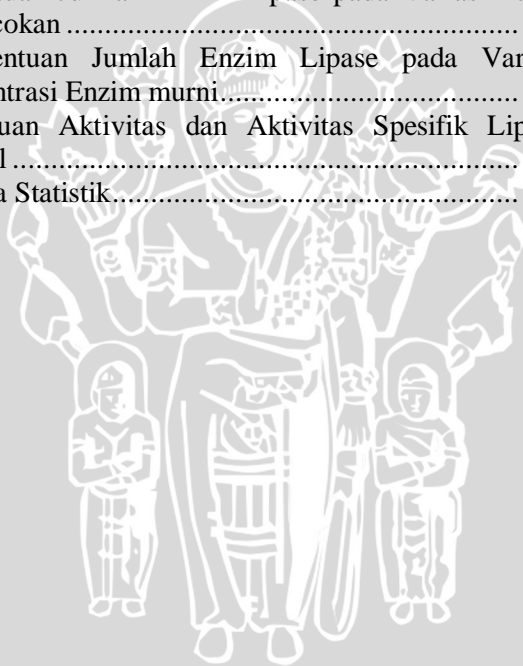


DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1. Perbandingan aktivitas spesifik lipase bebas dengan lipase teramobil PP.....	29
Tabel L.3.1. Pembakuan KOH 0,2 M dengan asam oksalat 0,1 M.....	40
Tabel L.6.1. Absorbansi Larutan Baku Kasein 833,3 ppm	50
Tabel L.7.1. Absorbansi Larutan Baku Kasein λ 540 nm	51
Tabel L.9. Data volume titran KOH hasil titrasi.....	54
Tabel L.9.1. Aktivitas lipase bebas	54
Tabel L.9.2.1. Kadar protein lipase bebas.....	56
Tabel L.9.2.2. Aktivitas, kadar protein dan aktivitas spesifik lipase bebas.....	57
Tabel L.10.2.1. Kadar protein lipase bebas.....	58
Tabel L.10.2.2. Jumlah lipase setelah amobilisasi.....	59
Tabel L.10.3. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP	60
Tabel L.11.2.1. Volume larutan enzim setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim murni	61
Tabel L.11.2.2. Jumlah lipase setelah amobilisasi.....	62
Tabel L.11.3.1. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP	63
Tabel L.11.3.2. Berat (PP + lipase) setelah amobilisasi.....	63
Tabel L.11.3.3. Jumlah lipase dalam 0,1 g (PP + lipase)	64
Tabel L.12. Data volume titran KOH setelah amobilisasi.....	65
Tabel L.12.1. Aktivitas lipase amobil	65
Tabel L.12.2. Aktivitas spesifik lipase amobil	66
Tabel L.13.1. Aktivitas lipase amobil	67
Tabel L.13.2. Data analisa varian satu arah	69
Tabel L.13.3. Data uji BNT 5% terhadap variasi konsentrasi enzim	69
Tabel L.13.4. Analisis pengaruh lama pengocokan terhadap jumlah lipase teradsorpsi pada PP.....	70
Tabel L.13.5. Data analisa varian satu arah	72
Tabel L.13.6. Data uji BNT 5% terhadap variasi lama pengocokan.....	72
Tabel L.13.7. Analisis pengaruh konsentrasi larutan enzim terhadap jumlah lipase teradsorpsi PP.....	73
Tabel L.13.8. Data analisa varian satu arah	75
Tabel L.13.9. Data uji BNT 5% terhadap variasi konsentrasi enzim	75

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Preparasi Larutan.....	35
Lampiran 2. Perhitungan Preparasi Larutan	38
Lampiran 3. Pembakuan Larutan KOH.....	40
Lampiran 4. Alur Penelitian.....	41
Lampiran 5. Diagram Kerja Penelitian.....	42
Lampiran 6. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein	50
Lampiran 7. Pembuatan Kurva Baku	51
Lampiran 8. Pemurnian Enzim	52
Lampiran 9. Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Lipase Bebas.....	54
Lampiran 10. Penentuan Jumlah Enzim Lipase pada Variasi Lama Pengocokan	57
Lampiran 11. Penentuan Jumlah Enzim Lipase pada Variasi Konsentrasi Enzim murni.....	58
Lampiran 12. Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Lipase Amobil	65
Lampiran 13. Analisa Statistik.....	67



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan suatu protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi yang berlangsung di dalamnya. Enzim dapat diisolasi dari jaringan hewan, tanaman dan mikroba. Enzim dari mikroba lebih cepat diproduksi dibandingkan dengan enzim dari tanaman dan hewan (Suharto, 1995), sehingga enzim sering diisolasi dari mikroba.

Lipase merupakan enzim yang banyak digunakan dalam berbagai industri diantaranya industri makanan, detergen, kosmetika, farmasi dan agrokimia (Putranto, *dkk*, 2006). Lipase dapat diisolasi dari berbagai mikroba, salah satunya yaitu kapang *Mucor miehei* (Winarno, 1995). Menurut Othmer (1987), lipase hasil isolasi masih bercampur dengan protein non enzim, sehingga harus dilakukan pemurnian untuk memperoleh lipase murni. Metode pemurnian yang sering dilakukan adalah pengendapan protein dengan menambahkan garam amonium sulfat dengan berbagai variasi konsentrasi ke dalam larutan ekstrak kasar enzim disertai pengadukan pada suhu rendah (Sorensen, *et al*, 1999). Pada penelitian ini lipase dimurnikan pada fraksi 20-60% karena menurut Roosdiana *dkk* (2006) pada fraksi ini lipase terendapkan paling maksimal.

Salah satu peran lipase dalam esterifikasi yaitu pada pembuatan ester gula, karena lipase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi dan transesterifikasi (Lee, *et al*, 2006). Ester gula merupakan ester dari gula dan asam lemak yang dikenal dengan sebutan biosurfaktan (Schmid, 2001). Contoh ester gula adalah laktosil oleat, yang dapat disintesis dari laktosa dan asam oleat melalui proses esterifikasi secara enzimatik. Menurut Roosdiana *dkk* (2006), kondisi optimum lipase dalam mengkatalisis esterifikasi dicapai pada temperatur 50°C dan waktu inkubasi 24 jam.

Pemakaian enzim dalam pembuatan ester gula dapat mencegah hasil reaksi samping dibandingkan penggunaan katalis kimia, tetapi enzim tidak dapat dipakai kembali karena sulit dipisahkan dari produknya (Judoamidjojo, *dkk*, 1992). Oleh karena itu, perlu

dilakukan amobilisasi enzim karena dapat meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim serta enzim dapat dipakai berulang kali (Chibata, *et al*, 1978). Selain memberikan keuntungan, amobilisasi enzim juga memiliki kekurangan, yaitu turunnya aktivitas spesifik enzim yang disebabkan karena kondisi pori yang terlalu rapat sehingga menyulitkan interaksi antara enzim dan substrat (Suhartono, 1989).

Enzim amobil merupakan enzim yang berada dalam ruang yang dibatasi secara sempurna oleh pembatas (Suharto, 1995). Metode amobilisasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 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 dan lama pengocokan. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka semakin banyak jumlah enzim yang teradsorpsi pada karier sampai pada batas tertentu, dan semakin lama waktu pengocokan maka semakin besar jumlah enzim yang teradsorpsi pada karier, namun ketika kesetimbangan terjadi adsorpsi cenderung tetap, yang berarti lama pengocokan telah mencapai optimum.

Dalam metode pengikatan pada karier, jenis karier yang digunakan bisa dari bahan anorganik ataupun organik, salah satunya adalah polipropilen (PP). Minovska *et al* (2005) melakukan penelitian hidrolisis minyak zaitun oleh lipase yang teramobilkan pada PP. Jumlah lipase yang teradsorpsi oleh PP lebih banyak dibanding dengan menggunakan silika gel dan SiO_2 karena adsorpsi lipase pada permukaan PP lebih kuat. Hal ini disebabkan karena lipase memiliki sisi hidrofobik yang mampu berikatan dengan PP yang memiliki sifat hidrofob yang tinggi. Selain murah dan tidak bereaksi dengan substrat yang digunakan, penggunaan PP membuat stabilitas lipase tinggi karena memiliki kepolaran yang sama dengan t-butanol sebagai media esterifikasi pada penelitian ini.

1.2. Rumusan Masalah

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

1. Bagaimanakah kondisi optimum amobilisasi lipase menggunakan polipropilen yang meliputi lama pengocokan dan konsentrasi lipase?
2. Sejauh mana pengaruh jumlah lipase yang teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil?
3. Bagaimana pengaruh amobilisasi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil dibandingkan lipase dalam keadaan bebas?

1.3. Batasan Masalah

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

1. Lipase diisolasi dari kapang *Mucor miehei*
2. Pemurnian lipase dengan metode pengendapan menggunakan amonium sulfat fraksi 20-60%
3. Aktivitas spesifik lipase diukur berdasarkan reaksi esterifikasi laktosa dan asam oleat

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. Menentukan kondisi optimum amobilisasi lipase menggunakan polipropilen yang meliputi lama pengocokan dan konsentrasi lipase
2. Mengetahui pengaruh jumlah lipase yang teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil
3. Mengetahui pengaruh amobilisasi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil dibandingkan lipase dalam keadaan bebas

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kondisi optimum lipase yang diamobilkan dengan polipropilen sehingga dapat meningkatkan kinerja lipase dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi pembentukan laktosil oleat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

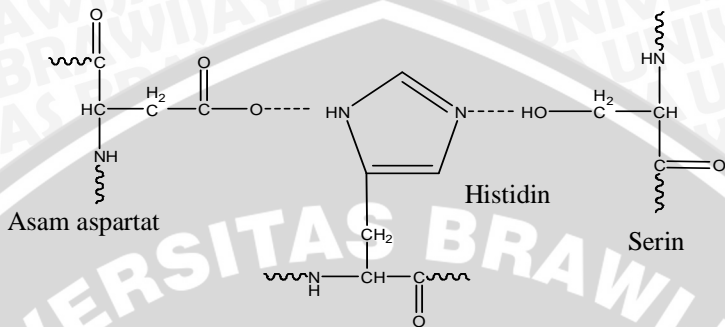
2.1. Enzim Lipase sebagai Katalis Reaksi Esterifikasi

Enzim adalah katalis protein yang dapat memediasi sintesis suatu senyawa organik. Enzim banyak diaplikasikan dalam bentuk teramobilisasi (Conn, *et al.*, 1987). Sifat istimewa enzim yang menonjol adalah kapasitas katalitik dan spesifitasnya yang sangat tinggi. Enzim memiliki spesifitas yang tinggi dalam jenis reaksi maupun substratnya. Enzim dapat mempercepat laju reaksi paling sedikit satu juta kali (Winarno, 1995). Enzim memiliki gugus yang dapat terionisasi. Perubahan pH dapat memberi efek pada 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.

Salah satu jenis enzim adalah lipase. Lipase adalah protein hidrofobik yang berperan pada ester asam karboksilat seperti lipid gliserida. Lipase memiliki resistansi yang cukup tinggi dalam pelarut organik dimana lipase dapat memfasilitasi reaksi sintesis ester (Pereira, *et al.*, 2003).

Lipase bekerja sangat lambat pada larutan lemak dalam air tetapi lipase aktif dalam emulsi minyak dalam air. Keaktifan lipase dapat diketahui dengan mengikuti hilangnya substrat atau timbulnya produk hidrolisis asam lemak bebas. Lipase hanya bekerja pada fase antara minyak dan air, sehingga substrat perlu dijadikan emulsi minyak/air lebih dahulu (Winarno, 1995). Keaktifan optimum lipase tergantung pada pH, temperatur dan juga senyawa pengemulsi yang digunakan, serta ada dan tidaknya garam dalam substrat. Temperatur optimal lipase pada 50-60°C (Sekeroğlu, *et al.*, 1998). Pada rentang temperatur tersebut aktivitas lipase maksimum dalam mengkatalisis substratnya, sedangkan pH optimum lipase berkisar antara 4,5-8,0 (Mathews dan Van Holde, 1990). Menurut Wong (1995), struktur

sisi aktif lipase adalah seperti pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur sisi aktif lipase

Pada Gambar 2.1 diketahui 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 H gugus karboksilat dari asam aspartat.

2.2. Mikroba Penghasil Lipase

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

Kingdom	: Thallophyta
Divisi	: Fungi
Sub divisi	: Eumycetes
Kelas	: Phycmycetes
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). *Mucor* banyak ditemukan di tanah dan sisa tanaman lain (Charlie dan Wilkinson, 1994).

2.3. Isolasi Enzim

Proses isolasi enzim ditentukan oleh sumber enzimnya, apakah dari tanaman atau hewan (Utomo, 1997). Isolasi enzim dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi (Judoamidjojo, *dkk*, 1992). Keberhasilan isolasi enzim bergantung pada macam dan kondisi sumber enzim, proses produksi dan cara ekstraksinya (Rahayu, 1996). Teknik pemisahan enzim dari sel dan komponen lain dipengaruhi oleh keberadaan enzim tersebut. Lipase termasuk enzim ekstraseluler yang aktivitasnya berada di luar sel sehingga tidak perlu dilakukan pemecahan dinding sel dan isolasinya dapat dilakukan dengan metode sentrifugasi (Suhartono, 1989).

2.4. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari pengotor komponen lain. Hal ini diperlukan untuk menghilangkan senyawa lain yang mengganggu sisi aktif enzim (Othmer, 1987). Menurut Smith (1993), 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 amonium sulfat ke dalam larutan protein akan memberikan pengaruh terhadap kelarutan enzim, yaitu menurunkan kelarutan enzim di dalam air (efek salting out) (Voet dan Voet, 1990). Amonium sulfat merupakan garam dengan kelarutan tinggi (Anonymous^a, 2008), sehingga dapat dengan mudah menarik molekul air yang mensolvasi protein.

Setelah enzim diendapkan dengan amonium sulfat dan dilarutkan dalam buffer, larutan tersebut mengandung residu amonium sulfat yang terikat pada enzim. Salah satu cara memisahkan kelebihan garam amonium sulfat adalah melalui dialisis protein menggunakan buffer dengan konsentrasi lebih rendah pada temperatur sekitar 4°C (Sorensen, *et al*, 1999). Penggantian fase cair diluar beberapa kali dapat menurunkan konsentrasi molekul garam dalam larutan sampai jumlah yang sedikit (Lehninger, 1992). Selama dialisis, molekul yang kecil (BM lebih kecil dari ukuran pori-pori kantong dialisis) akan berdifusi dari kantong dialisis sampai konsentrasi molekul tersebut di dalam dan di luar membran selulosa sama (Sorensen, *et al*, 1999).

2.5. 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).

Metode-metode amobilisasi enzim digolongkan menjadi 3 kelompok, yaitu (Said, 1987):

1. Metode pengikatan enzim pada karier

Metode ini didasarkan pada pengikatan suatu matriks yang tidak larut dalam air. Sebagai matriks dapat digunakan bahan organik maupun bahan anorganik, misalnya alumina, selulosa, tanah liat, hidroksilpatit.

2. Metode ikatan silang

Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan silang antara molekul-molekul enzim. Dalam metode ini tidak digunakan 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.

3. Metode penjebakan

Metode ini didasarkan pada penempatan enzim di dalam kisi suatu polimer atau dalam suatu membran yang bersifat semi permeabel. Contohnya adalah penjebakan enzim dalam pori membran Ca-alginat.

Dalam metode pengikatan enzim pada karier, faktor utama yang mempengaruhi jumlah enzim yang dapat diadsorpsi oleh karier adalah konsentrasi enzim yang dikenakan pada permukaan karier selama proses amobilisasi serta lama pengocokan. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka akan semakin banyak jumlah enzim yang teradsorpsi pada karier sampai pada batas tertentu. Peningkatan waktu pengocokan juga akan meningkatkan jumlah enzim yang teradsorpsi pada karier, namun ketika kesetimbangan terjadi adsorpsi cenderung tetap, yang berarti lama pengocokan telah mencapai optimum (Wiseman, 1985). Menurut Ariesta (2009), lipase yang diadsorpsi oleh polietilen mencapai kondisi optimum pada lama pengocokan 3 jam dan konsentrasi 2778 ppm.

Enzim amobil memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat meningkatkan aktivitas spesifik dibandingkan enzim dalam keadaan bebas, stabilitas enzim lebih tinggi dalam arti waktu penyimpanan, macam enzim amobil dapat dibuat sesuai perencanaan untuk pemakaian tertentu, enzim dapat dipakai berulang kali tanpa melalui prosedur regenerasi yang non-ekonomis, pemakaian bahan baku lebih efisien dan polusi yang diharapkan dapat dikurangi (Chibata, *et al*, 1978).

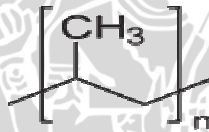
Amobilisasi enzim juga memiliki kekurangan, yaitu turunnya aktivitas spesifik enzim yang disebabkan karena kondisi pori yang terlalu rapat sehingga menyulitkan interaksi antara enzim dan substrat (Suhartono, 1989).

2.6. Polipropilen

Polipropilen (PP) merupakan polimer termoplastik yang dapat diaplikasikan secara luas untuk tekstil, plastik, peralatan laboratorium, komponen otomotif, dan lain-lain. PP bersifat kasar dan lebih kaku dibanding plastik-plastik yang lain, memiliki daya tahan yang sangat baik serta memiliki titik leleh 160°C sehingga

sering dimanfaatkan untuk keperluan medis ataupun laboratorium karena dapat menahan panas pada autoklaf (Anonymous^b, 2008). Pemanfaatannya yang sangat luas dimungkinkan karena polimer ini memiliki banyak sifat-sifat yang bermanfaat antara lain tahan terhadap zat kimia, non toksik dan ekonomis (Anonymous^c, 2008).

PP merupakan salah satu karier organik yang mampu mengikat enzim, salah satunya enzim lipase, dengan metode adsorpsi fisik. Menurut Minovska, *et al* (2005), jumlah lipase yang teradsorpsi oleh PP lebih banyak dibanding dengan menggunakan karier silika gel atau SiO₂ karena adsorpsi lipase dengan permukaan PP lebih kuat. Hal ini disebabkan karena lipase memiliki sisi hidrofobik yang mampu berikatan dengan PP yang memiliki sifat hidrofob yang tinggi. PP memiliki kepolaran yang sama dengan t-butanol sebagai media esterifikasinya, sehingga penggunaan PP membuat stabilitas lipase tinggi. Struktur umum PP adalah seperti pada Gambar 2.2 (Anonymous^b, 2008).



Gambar 2.2. Struktur Polipropilen

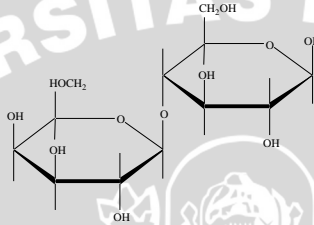
2.7. Ester Gula dari Laktosa dan Asam Oleat

2.7.1. Ester gula

Ester gula merupakan ester dari gula dengan asam lemak yang terbentuk berdasarkan reaksi esterifikasi, yaitu reaksi antara asam karboksilat dengan alkohol (Fessenden dan Fessenden, 1999). Contoh ester gula adalah laktosil oleat. Laktosil oleat dapat disintesis dari laktosa dan asam oleat melalui proses esterifikasi secara enzimatik, karena reaksi enzim berlangsung spesifik. Secara ekonomis proses ini memiliki keunggulan karena ester gula yang terbentuk memiliki komponen yang mudah dibiodegradasi dan tidak beracun (Aran, *et al*, 2000).

2.7.2. Laktosa

Susu adalah sumber utama dari laktosa (Fox dan Gruffery, 1991). Laktosa merupakan disakarida alamiah yang dijumpai hanya pada binatang menyusui; air susu sapi dan manusia. Dalam metabolisme tubuh manusia yang normal, laktosa dihidrolisis secara enzimatis menjadi D-Galaktosa dan D-Glukosa. Struktur laktosa adalah sebagai berikut (Fessenden dan Fessenden, 1999):



Gambar 2.3. Struktur Laktosa

2.7.3. Asam oleat

Asam oleat adalah asam lemak tak jenuh yang mempunyai rumus molekul $C_{18}H_{34}O_2$ (asam-9-oktadekanoat). Berat molekul asam oleat adalah 282,470 g/mol, mempunyai titik didih 286°C, titik leleh 4°C dan densitas 0,895 g/mL pada 25°C. Asam oleat berbentuk cairan minyak berwarna kuning kecoklatan, tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol. Asam ini stabil dalam temperatur kamar, tetapi dalam udara terbuka asam oleat dapat teroksidasi dan warnanya berubah dari kuning menjadi coklat dengan bau tengik. Struktur asam oleat seperti terlihat pada Gambar 2.4 (Harrison, 2008).

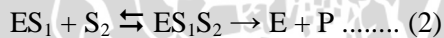


Gambar 2.4. Struktur Asam Oleat

2.8. Aktivitas Esterifikasi Lipase

Lipase mengkatalisis reaksi antara laktosa dan asam oleat sehingga dihasilkan produk ester yaitu laktosil oleat. Pembentukan ester dapat ditentukan dengan aktivitas enzim dalam mengkatalisis reaksi (Schmid, *et al*, 2001). Hal ini karena enzim bekerja secara spesifik terhadap substrat yang dikatalisnya.

Enzim memiliki 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 letaknya berdekatan. Gugus-gugus asam amino ini dipengaruhi oleh pH sehingga konsentrasi ion H^+ yang ada di sekitar asam amino tersebut mempengaruhi keadaan ionisasinya. Pada pH yang sesuai, gugus R mengion dan berperan dalam reaksi katalitik (Wong, 1995). Reaksi enzimatik dalam pembentukan ester secara umum yaitu:



sehingga reaksi esterifikasi pembentukan produk dan enzim kembali tidak bersifat reversibel seperti pada reaksi esterifikasi pada umumnya. Hal ini menyebabkan tidak terjadi reaksi hidrolisis oleh lipase.

2.9. Penentuan Aktivitas Spesifik Lipase

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*, 1998), yaitu berdasarkan jumlah asam lemak sisa hasil esterifikasi. Prinsip dari pengukuran ini adalah substrat asam oleat dan laktosa ditambahkan lipase yang belum diketahui aktivitasnya, diinkubasi pada pH dan temperatur

optimum. Selama inkubasi asam oleat bereaksi dengan laktosa, dan dengan cara titrasi akan didapat jumlah titer per satuan waktu yang merupakan harga aktivitas lipase. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, temperatur dan waktu inkubasi (Winarno, 1995).

1. pH

Perubahan pH dapat berpengaruh dalam pembentukan kompleks enzim substrat. pH yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi dan perubahan struktur protein. Pada umumnya, enzim aktif pada pH netral dan mempunyai aktivitas yang maksimal (McKee dan James, 2003). pH optimum lipase berkisar antara 4,5-8,0 (Mathew dan Van Holde, 1990).

2. Temperatur

Pengaruh temperatur terhadap enzim agak kompleks. Temperatur yang terlalu tinggi dapat mempercepat pemecahan atau perusakan enzim, sebaliknya semakin tinggi temperatur (dalam batas tertentu) semakin aktif enzim tersebut. Bila temperatur masih naik terus, kerusakan enzim akan melampaui reaksi katalisis enzim. Pada temperatur rendah, laju inaktivasi enzim sangat lambat sehingga boleh diabaikan. Sebaliknya pada temperatur tinggi, laju inaktivasi enzim semakin cepat sehingga reaksi enzimatik praktis berhenti sama sekali (Winarno, 1995). Temperatur optimum lipase berkisar antara 50-60°C (Sekeroglu, *et al*, 1998).

3. Waktu inkubasi

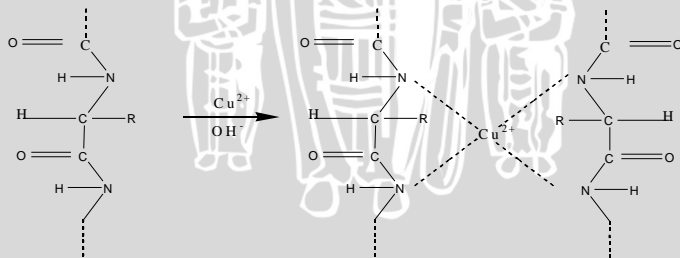
Aktivitas enzim juga dipengaruhi waktu inkubasi. Waktu inkubasi ini diperlukan enzim untuk berikatan dengan substrat. Semakin lama waktu inkubasi semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga produkyang terbentuk semakin banyak pula. Apabila enzim sudah jenuh dengan substrat, maka lamanya waktu inkubasi sudah tak berpengaruh lagi (Pudjiharti dan Wirahadikusumah, 1994).

Menurut Lehninger (1992), aktivitas spesifik 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.

2.10. Penentuan Kadar Protein

Kadar protein dapat ditentukan secara kuantitatif dengan menggunakan metode Biuret dan kasein sebagai larutan bakunya. Kasein dapat digunakan sebagai larutan baku karena kasein merupakan protein yang dapat membentuk kompleks dengan reagen Biuret sehingga menghasilkan warna yang dapat diserap pada daerah λ 400-600 nm. Selain itu kasein memiliki BM yang besar dan stabilitas tinggi sehingga dapat memperkecil kesalahan pengukuran dan memenuhi syarat sebagai larutan baku (West, 1996). Intensitas warna proporsional terhadap kadar protein yang diukur adalah pada λ 530-550 nm. Kompleks terbentuk jika suatu protein yang mempunyai 4 atom nitrogen yang berasal dari asam amino berikatan dengan ion Cu^{2+} dari CuSO_4 (Owusu dan Appenten, 2002). Polipeptida dan protein yang mempunyai dua atau lebih ikatan peptida dapat memberikan warna ungu yang karakteristik apabila ditambah dengan larutan tembaga sulfat pada pH alkali. Warna ini terbentuk karena terbentuknya ikatan kompleks antara Cu (II) dengan atom nitrogen yang berasal dari dua ikatan peptida. Reaksi yang terjadi seperti terlihat pada Gambar 2.5 (West, 1996).



Gambar 2.5. Pembentukan kompleks ungu Protein-Biuret

2.11. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Amobilisasi lipase menggunakan polipropilen mempunyai kondisi optimum meliputi lama pengocokan dan konsentrasi lipase.
2. Aktivitas spesifik lipase amobil menurun dengan semakin banyaknya jumlah lipase yang teradsorpsi pada polipropilen.
3. Amobilisasi meningkatkan aktivitas spesifik lipase amobil dibandingkan dalam keadaan bebasnya.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Oktober 2008 sampai Januari 2009.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel kapang *Mucor miehei* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, serta plastik polipropilen komersil.

3.2.2. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah 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 oleat, ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BaCl_2 , HCl pekat, KOH, indikator fenolftalein, t-butanol, etanol, toluena dan metanol. Semua bahan tersebut mempunyai kemurnian pro analisis (p.a) kecuali kasein, ekstrak yeast, agar, pepton, kertas saring, kentang, dan akuades.

3.2.3. Alat penelitian

Alat penelitian yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, magnetik stirer, autoklaf elektrik, jarum ose, inkubator (merek Heracus tipe B 50 Memmert), sentrifuse (Fischer Scientific Centrifuge), shaker (Edmund Buhler SM 25), pH meter (schottgerate tipe CG-820), oven (Memmert), neraca analitik (mettler Todelo AL 204), spektrofotometer UV-Vis, kuvet dan freezer.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah pemurnian lipase menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60% dan amobilisasi lipase dengan variasi lama pengocokan dan konsentrasi. Pola rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Tahapan penelitiannya adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan matriks polipropilen
2. Penyiapan media padat
3. Peremajaan biakan murni
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar lipase
7. Pemurnian ekstrak kasar lipase
8. Penentuan kadar protein hasil pemurnian
9. Penentuan aktivitas enzim hasil pemurnian
10. Amobilisasi enzim meliputi:
 - penentuan lama pengocokan optimum adsorpsi enzim dengan variasi waktu (1, 2, 3, 4 dan 5) jam
 - penentuan konsentrasi optimum enzim saat amobilisasi dengan variasi larutan lipase (1, 2, 3, 4 dan 5) mL
11. Penentuan kadar protein sisa
12. Penentuan aktivitas enzim amobil

3.4. Cara Kerja Penelitian

3.4.1. Pembuatan matriks polipropilen

Matriks polipropilen dibuat dari plastik polipropilen komersil dengan cara digunting kecil-kecil lalu ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian dimasukkan ke dalam 300 mL toluena lalu dididihkan hingga larut. Larutan polimer dalam keadaan panas dituangkan sedikit demi sedikit ke dalam 600 mL non pelarut metanol sambil diaduk. Setelah itu disaring menggunakan kertas whatman dan dibiarkan hingga mengering. Setelah kering dilakukan pengayakan untuk mendapatkan serbuk polipropilen dengan ukuran yang

seragam, yaitu antara 80 sampai 100 mesh.

3.4.2. Pembuatan media padat

Media padat yang digunakan adalah PDA atau agar dekstrosa kentang, yang terdiri atas: kentang 50 gram, dekstrosa 5 gram, agar 5 gram, dan akuades 200 mL. Kentang dicuci dan dipotong kecil-kecil, lalu direbus dalam akuades hingga mendidih dan volume dibuat tetap dengan menambahkan akuades, kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat ditambah dekstrosa 5 g dan dipanaskan lalu larutan didinginkan. pH larutan diatur dengan menambahkan asam sitrat sampai pH 5 kemudian ditambahkan larutan buffer sitrat fosfat pH 5 untuk mempertahankan pH. Setelah itu larutan ditambah agar dan dididihkan sampai larut. Larutan tersebut dipipet 5 mL, dimasukkan dalam tabung, disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit. Tabung yang berisi media disimpan dalam temperatur kamar dengan keadaan miring 45° dan dibiarkan memadat.

3.4.3. Penanaman biakan murni

Biakan *Mucor miehei* digoreskan pada media padat dengan ujung jarum ose secara aseptik yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan diletakkan dalam inkubator pada temperatur 30° C selama 4 hari.

3.4.4. Pembuatan media cair untuk produksi enzim lipase

Media pertumbuhan *Mucor miehei* untuk menghasilkan enzim lipase terdiri atas pepton 0,75 g, ekstrak yeast 2,5 g, NaCl 2,5 g, KH₂PO₄ 6,7 g, K₂HPO₄ 8,4 g, MgSO₄·7H₂O 0,25 g, larutan aktivator 0,5 mL dan asam oleat 15,0 mL. Kondisi pH diatur hingga 5 dengan penambahan asam sitrat. Ditambah larutan buffer sitrat fosfat hingga volume 400 mL, lalu tiap 200 mL larutan dituang ke dalam erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan 15 mL asam oleat ke dalam masing-masing erlenmeyer sebagai larutan pertama. Semua erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C, 15 psi selama 15 menit.

Laktosa 5 g dan dekstrosa 5 g dilarutkan dalam 100 mL

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

3.4.5. Pembuatan inokulum

Kapang yang telah tumbuh dalam media padat yang berumur 4 hari ditambahkan akuades steril sebanyak 10 mL pada tiap tabung reaksi lalu dikocok. Hasil kocokan dipindah ke dalam 100 mL media cair dan diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar selama 24 jam. Suspensi spora ini berfungsi sebagai inokulum.

3.4.6. Produksi dan isolasi enzim lipase

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

3.4.7. Pembuatan kurva baku larutan kasein

1,0000 gram kasein ditimbang lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan larutan NaOH 0,1 N sampai kasein larut sempurna dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL serta ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm, kemudian dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL lalu dimasukkan labu ukur 10 mL yang berbeda. Masing-masing larutan ditambahkan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000,

9000) ppm. Larutan kasein 5000 ppm diambil 2 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer sitrat fosfat pH 5, kemudian dikocok dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada λ kasein yaitu 460-650 nm untuk dicari λ maksimumnya. Untuk membuat kurva baku kasein, dilakukan pengukuran absorbansi larutan pada masing-masing konsentrasi kasein dengan cara yang sama, kemudian dibuat kurva hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi sehingga dihasilkan kurva baku kasein.

3.4.8. Pemurnian ekstrak kasar lipase

Ekstrak kasar lipase dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60%. Berat amonium sulfat yang ditambahkan dihitung berdasarkan tabel kejenuhan amonium sulfat yang tertera pada Lampiran 8.2. Sebelum dibuat fraksi 20-60% terlebih dahulu dibuat fraksi 0-20% yaitu sebanyak 8,550 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 disentrifugasi pada 300 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan ditambahkan 19,650 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lalu disentrifugasi menghasilkan endapan yang setelah dilakukan dialisis menghasilkan fraksi 20-60%. Dialisis dilakukan dengan menambahkan 10 mL buffer sitrat fosfat pH 5 pada endapan lalu 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 stirrer pada suhu rendah. Dialisis dilakukan selama 24 jam dengan tiga kali penggantian larutan buffer perendam dengan buffer perendam yang baru agar semua garam terpisah dari larutan enzim. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan cara 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan ke 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. Penentuan kadar protein lipase

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim ditambah 2 mL larutan kasein 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 kasein sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku kasein.

3.4.10. Uji aktivitas lipase bebas

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (0,036 g; 0,317 mL) dicampur dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya larutan t-butanol sebagai media esterifikasinya sebanyak 5 mL dan lipase hasil pemurnian 2 mL. Campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Setelah itu ditambahkan indikator fenolftalein sebanyak 3 tetes. Campuran yang berisi asam oleat sisa hasil esterifikasi dititrasi dengan larutan KOH 0,1653 M hingga terjadi perubahan dari tidak berwarna menjadi merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Sebagai blanko digunakan campuran yang dititrasi sebelum inkubasi.

3.4.11. Amobilisasi enzim

3.4.11.1. Penentuan lama pengocokan optimum adsorpsi enzim

Enzim hasil pemurnian dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi lalu diencerkan dengan buffer sitrat fosfat pH 5 hingga volume 5 mL. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 0,1 gram polipropilen yang telah di preaktifkan dengan 2,5 mL etanol. Campuran diinkubasi dalam inkubator goyang pada suhu ruang dengan kecepatan 22 rpm selama (1, 2, 3, 4, dan 5) jam agar diketahui lama pengocokan optimum enzim teradsorpsi pada polipropilen. Selanjutnya suspensi yang dihasilkan disaring menggunakan Corong Buchner dengan bantuan pompa vakum, lalu filtrat yang diperoleh diuji kadar protein. Diplotkan grafik hubungan

antara lama pengocokan dengan jumlah lipase yang teradsorpsi.

3.4.11.2. Penentuan konsentrasi optimum enzim saat amobilisasi

Penentuan konsentrasi optimum enzim dilakukan dengan cara yang sama dengan penentuan lama pengocokan optimum adsorpsi enzim, namun enzim murni yang diambil bervariasi yaitu (1, 2, 3, 4 dan 5) mL dan lama pengocokan yang digunakan adalah lama pengocokan optimum enzim. Filtrat yang dihasilkan diuji kadar protein sisa dan endapan yang dihasilkan diuji aktivitasnya. Diplotkan grafik hubungan antara konsentrasi enzim dalam larutan dengan jumlah protein yang teradsorpsi.

3.4.12. Penentuan kadar protein sisa

Untuk menentukan kadar protein tidak terjerbak maka sebanyak 2 mL filtrat dari enzim amobil setelah penyaringan ditambah 2 mL larutan kasein 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 kasein, yaitu 540 nm. Kadar protein lipase diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku kasein.

3.4.13. Uji aktivitas lipase amobil

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (0.036 g; 0,317 mL) dicampur dan dimasukkan dalam Erlenmeyer ditambahkan kedalam 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 fenolftalein 3 tetes. Campuran yang berisi asam oleat sisa hasil esterifikasi dititrasi dengan larutan KOH 0,1653 M hingga terjadi perubahan dari tidak berwarna menjadi merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Sebagai blanko digunakan campuran yang dititrasi sebelum inkubasi.

3.5. Analisa Data

Data tentang penentuan aktivitas spesifik enzim lipase amobil dianalisis dengan uji F menggunakan metode analisa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan perlakuan diulang 3 kali. Bila F hitung lebih besar dari F tabel (α db) maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan tingkat kepercayaan 95% atau BNT 5% yang dapat dilihat pada lampiran 13.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



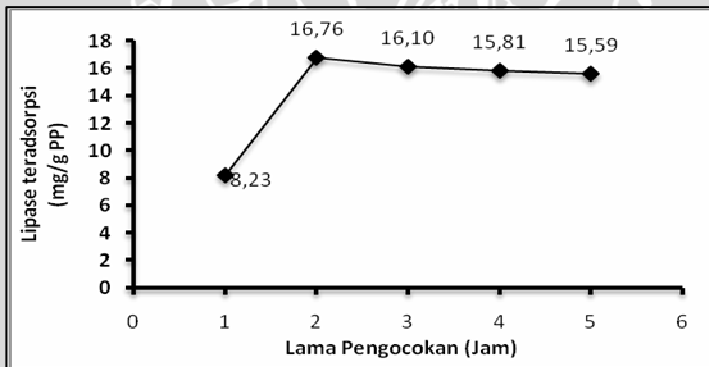
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Enzim Lipase Menggunakan Matriks Polipropilen

4.1.1. Lama pengocokan optimum

Dalam proses amobilisasi, setiap enzim membutuhkan waktu tertentu untuk berinteraksi dengan karier. Lama pengocokan optimum pada penelitian ini merupakan waktu optimum yang dibutuhkan oleh lipase untuk berinteraksi dengan PP sebagai media pengadsorpsinya. Penentuan lama pengocokan optimum dilakukan pada variasi (1, 2, 3, 4, 5) jam dengan konsentrasi lipase sama, yaitu dari 1 mL lipase hasil pemurnian dan berat PP 0,1 g. Hasil penentuan lama pengocokan optimum terhadap lipase yang teradsorpsi PP dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Penentuan lama pengocokan optimum terhadap jumlah lipase yang teradsorpsi polipropilen

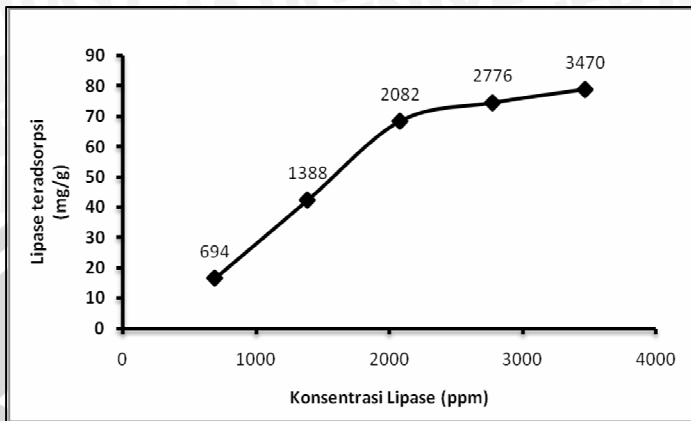
Berdasarkan Gambar 4.1. dapat diketahui bahwa lama pengocokan optimum terjadi pada lama pengocokan 2 jam dengan jumlah lipase teradsorpsi sebesar 16,76 mg/g PP. Peningkatan jumlah lipase teradsorpsi PP pada lama pengocokan 1 jam sampai 2 jam

terjadi karena peningkatan waktu kontak antara sisi hidrofobik lipase dengan permukaan PP yang bersifat non polar semakin besar sehingga jumlah lipase yang teradsorpsi oleh PP juga semakin banyak. Sedangkan jumlah lipase yang teradsorpsi PP pada lama pengocokan 2, 3, 4 dan 5 jam menunjukkan jumlah yang hampir konstan. Hal ini sesuai dengan uji BNT 5% (Tabel L.13.6) yang menunjukkan bahwa lama pengocokan 2, 3, 4 dan 5 jam tidak berbeda nyata, sehingga lama pengocokan 2 jam merupakan waktu kesetimbangan adsorpsi lipase pada PP.

Interaksi yang terjadi antara lipase dengan PP adalah interaksi antara gugus R lipase yang bersifat non polar dengan permukaan makromolekul PP yang juga bersifat non polar. Lama pengocokan memengaruhi banyaknya enzim lipase yang teradsorpsi pada PP. Semakin lama waktu pengocokan yang dilakukan maka semakin besar pula jumlah lipase yang teradsorpsi, namun ketika kesetimbangan terjadi adsorpsi cenderung tetap, yang berarti lama pengocokan telah mencapai optimum dan selanjutnya akan memberikan jumlah lipase teradsorpsi yang konstan.

4.1.2. Konsentrasi lipase optimum

Proses amobilisasi lipase menggunakan matriks PP ini juga dilakukan dengan berbagai variasi konsentrasi lipase yang diambil dari (1, 2, 3, 4, 5) mL lipase hasil pemurnian, dengan lama pengocokan 2 jam dan berat polipropilen 0,1 g. Hasil penentuan konsentrasi lipase optimum terhadap lipase yang teradsorpsi PP dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Penentuan konsentrasi lipase optimum terhadap jumlah lipase yang teradsorpsi polipropilen

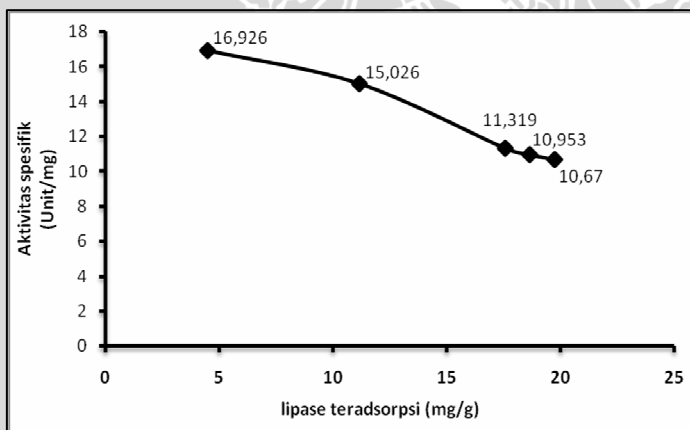
Gambar 4.2. menunjukkan bahwa jumlah lipase yang teradsorpsi PP cenderung meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi lipase, dengan nilai optimum tercapai saat konsentrasi 2082 ppm dan jumlah lipase teradsorpsi adalah 68,51 mg/g PP. Mulai konsentrasi lipase 694 hingga 2082 ppm, adsorpsi lipase pada PP meningkat secara signifikan, namun saat konsentrasi diatas 2082 ppm, meningkatnya perubahan konsentrasi hanya sedikit berpengaruh terhadap lipase yang teradsorpsi. Peningkatan adsorpsi pada keadaan awal terjadi karena perbedaan potensial antara fasa ruah dengan permukaan PP yang tinggi, sehingga laju difusi lipase cepat. Laju difusi yang cepat pada kondisi ini menyebabkan laju adsorpsi lebih tinggi dibanding laju desorpsi. Saat konsentrasi lebih besar dari 2082 ppm, laju adsorpsi tidak berbeda jauh dibanding laju desorpsi, sehingga peningkatan jumlah lipase teradsorpsi tidak terlalu besar.

4.2. Pengaruh Jumlah Lipase Teradsorpsi terhadap Aktivitas Spesifik Lipase Amobil

Aktivitas spesifik enzim adalah aktivitas enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik merupakan indikator tingkat kemurnian

relatif suatu enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim maka tingkat kemurnian enzim dalam larutan meningkat (Lehninger, 1997). Aktivitas spesifik lipase pada penelitian ini diperoleh dengan membandingkan nilai aktivitas lipase dari masing-masing variasi konsentrasi lipase dengan kadar proteinnya.

Nilai aktivitas lipase diperoleh dari pengukuran aktivitas lipase untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi secara kuantitatif berdasarkan jumlah asam oleat yang bereaksi dengan laktosa untuk membentuk laktosil oleat yang diukur sebelum dan sesudah waktu inkubasi secara titrasi asam basa. Sedangkan kadar protein yang digunakan merupakan jumlah lipase yang teradsorpsi 0,1 gram (PP + lipase) pada proses amobilisasi, sehingga jumlah lipase yang teradsorpsi dapat mempengaruhi aktivitas spesifik lipase amobil. Pengaruh jumlah lipase teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Pengaruh jumlah lipase teradsorpsi terhadap aktivitas spesifik lipase amobil

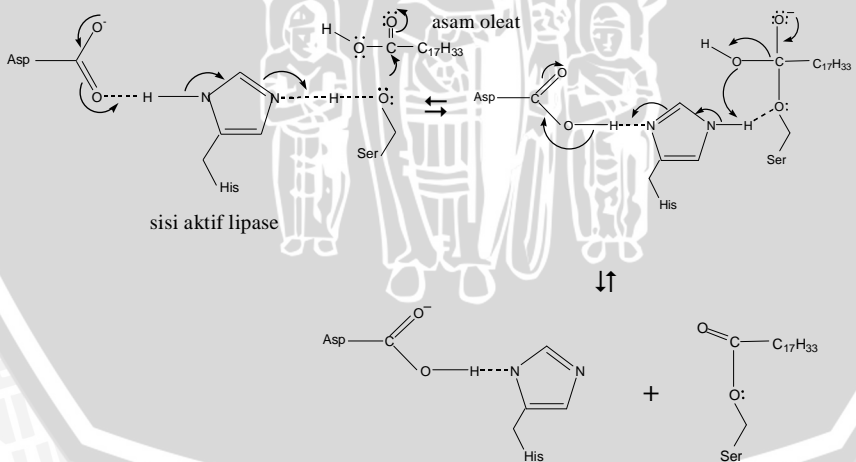
Berdasarkan Gambar 4.3. tampak bahwa aktivitas spesifik lipase amobil mengalami penurunan dengan semakin meningkatnya jumlah lipase yang teradsorpsi. Hal ini didukung oleh uji analisa statistik dimana nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ (taraf nyata $\alpha = 0,05$) yang berarti bahwa

jumlah enzim teradsorpsi berpengaruh terhadap aktivitas spesifik lipase amobil. Uji BNT 5% menunjukkan bahwa konsentrasi lipase 0,694 mg/mL dan 1,388 mg/mL berbeda nyata dengan konsentrasi lipase 2,082 mg/mL, 2,776 mg/mL dan 3,470 mg/mL.

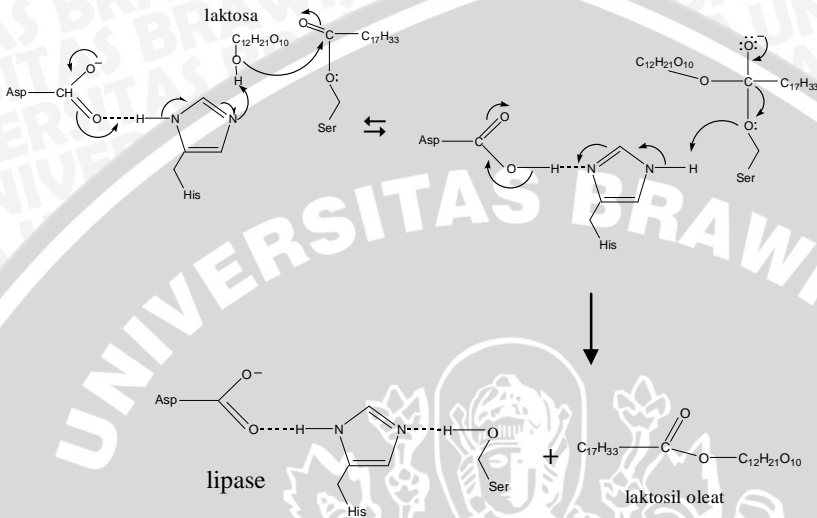
Kenaikan jumlah lipase yang teradsorpsi tidak sebanding dengan kenaikan aktivitasnya, yaitu kenaikan jumlah enzim teradsorpsi lebih besar daripada kenaikan aktivitasnya. Ketidakebandingan tersebut disebabkan substrat sulit untuk mencari sisi aktif lipase karena permukaan PP semakin sempit. Semakin besar konsentrasi lipase yang dikenakan pada permukaan PP berarti jumlah lipase teradsorpsi pada PP semakin besar pula. Akan tetapi dengan semakin banyaknya jumlah enzim teradsorpsi maka ruang yang tersisa pada PP semakin berkurang, dan substrat sulit untuk berikatan dengan sisi aktif enzim. Hal ini menyebabkan kompleks enzim-substrat tidak terbentuk secara optimal.

Mekanisme reaksi esterifikasi enzimatik pembentukan laktosil oleat ditunjukkan pada Gambar 4.4.

Tahap asilasi



Tahap deasilasi



Gambar 4.4. Mekanisme reaksi esterifikasi enzimatis

Dari Gambar 4.3, diketahui bahwa mekanisme reaksi esterifikasi asam lemak dengan laktosa terdiri dari dua tahap yaitu asilasi dan deasilasi. Pada tahap asilasi enzim asil dibentuk dari histidin yang mendeprotonasi dari rantai samping hidroksi dari serin dan menyerang atom C dari asam lemak. H_2O ini berasal dari gugus OH asam lemak dan H dari serin. Pada tahap deasilasi gugus N dari histidin membentuk ikatan hidrogen dengan laktosa dan gugus OH dari laktosa menyerang atom C asam lemak menghasilkan produk laktosil lemak dan enzim kembali pada bentuk semula. Tahap asilasi berjalan lambat, semakin banyak enzim yang mengikat asam lemak, maka pada tahap deasilasi akan semakin banyak laktosa yang bereaksi dengan asam lemak.

4.3. Pengaruh Amobilisasi terhadap Aktivitas Spesifik Lipase

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). Pada penelitian ini dihasilkan bahwa aktivitas spesifik lipase pada keadaan amobil lebih besar dibandingkan pada keadaan bebasnya. Pengaruh amobilisasi terhadap aktivitas spesifik lipase dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Perbandingan aktivitas spesifik lipase bebas dengan lipase teramobil PP

Jumlah lipase (mg)	Aktivitas spesifik ($\mu\text{g}/\text{mg}$ menit)	Notasi BNT 5%	Kenaikan aktivitas spesifik (kali)
3,470*	3,286	-	1
0,447	16,926	c	5,2
1,115	15,026	b	4,6
1,757	11,319	a	3,5
1,865	10,953	a	3,3
1,975	10,67	a	3,2

* lipase bebas

Dari Tabel 4.1. dapat diketahui bahwa lipase amobil memiliki aktivitas spesifik lebih besar dibanding lipase dalam keadaan bebas. Amobilisasi menyebabkan lipase dalam keadaan statis sehingga substrat lebih mudah mencari sisi aktif lipase untuk berikatan, dimana sisi aktif lipase yang bersifat non polar berinteraksi hidrofobik dengan PP dan sisi aktif lipase yang bersifat hidrofilik berinteraksi dengan substrat, sehingga tidak menyebabkan perubahan konformasi sisi aktif lipase. Hal ini menyebabkan lipase amobil bekerja secara spesifik lebih baik terhadap substrat. Sedangkan pada lipase bebas, baik lipase maupun substrat terus bergerak sehingga substrat lebih sulit mencari sisi aktif lipase. Pada jumlah lipase 4,47 mg/g lipase amobil menghasilkan aktivitas spesifik terbesar, yaitu 16,926 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit dari variasi larutan lipase yang digunakan dengan kenaikan aktivitas spesifik sebesar 5,2 kali dari aktivitas spesifik dalam keadaan bebasnya, sehingga pada jumlah lipase tersebut merupakan jumlah lipase amobil yang optimal.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan antara lain:

1. Kondisi optimum amobilisasi lipase menggunakan PP dicapai pada lama pengocokan 2 jam dan konsentrasi lipase 2082 ppm, menghasilkan lipase teradsorpsi sebanyak 68,51 mg/g PP.
2. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP berpengaruh terhadap aktivitas spesifik. Pada jumlah lipase teradsorpsi 4,47 – 19,75 mg/g (PP + lipase), aktivitas spesifik menurun (16,926 – 10,670 μ g/mg menit).
3. Amobilisasi lipase pada PP dapat meningkatkan aktivitas spesifik lipase, yaitu 5,2 kali dibandingkan dalam keadaan bebasnya.

5.2. Saran

Pada penelitian selanjutnya perlu dikaji tentang kestabilan lipase pada lama dan temperatur penyimpanan, keboleahulangan lipase amobil dan matriks pengamobil lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous^a, 2008, **Investigating Proteins**, <http://www.unilever.com>, Diakses tanggal 7 September 2008
- Anonymous^b, 2008, **Polypropylene**, <http://www.answer.com/Polypropylen.htm>, Diakses tanggal 7 September 2008
- Anonymous^c, 2008, **Polypropylene**, <http://www.lenntech.com/Polypropylene.htm>, Diakses tanggal 7 September 2008
- Aran, H.K., Prasertan, P., and Sungpud, C., 2000, **System Continuous Production of Fatty Acid from Palm Oil by Immobilized Lipase in A Two-Phase**, Journal American Oil Chemistry, pp 599-603
- Ariesta L. R., 2009, **Amobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor miehei* Menggunakan Matriks Polipropilen**, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang
- Charlie, M.J., dan Wilkinson, 1994, **The Fungi**, Academic Press, London, pp 35-39
- Chibata, I., H. Horitsu, S. Adachi, dan Y. Takashi, 1978, **Immobilized Enzymes**, John Willey and Sons Inc. New York, hal 191-197, 219
- Conn, E. E., K. S. Paul, B. Goorges dan H. D. Roy, 1987, **Outlines of Biochemistry**, John Willey and Sons Inc., New York, pp 213-219
- Fennema, R.D, 1996, **Food Chemistry**, 3rd Edition., Marcel Desken Inc. New York, pp 515-517
- Fessenden, R.J., dan J.S. Fessenden, 1999, **Kimia Organik Jilid 2**, Edisi Ketiga, Alih Bahasa: A.H.Pudjaatmaka, Erlangga, hal 351
- Fox, P., dan Gruferty, 1991, **Food Enzymology**, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp 245-247

Harrison, K., 2008, **Oleic Acid Unsaturated Fatty Acid**, <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=384>, Diakses tanggal 7 September 2008

Jay, J.M, 1991, **Modern Food Biotechnology, fourth ed**, Van Nostrand Reinhold. New York

Judoamidjojo, R.M., Darwis, A.A., dan Sa'id E.G, 1992, **Teknologi Fermentasi**. Rajawali Press. Jakarta, hal 10-13

Lee, Dong H., K. Jung Mo, S. Hyun Yong, dan K. Seung Wook, 2006, **Optimization of Lipase Treatment Prior to Lipase Immobilization to Prevent Loss of Activity**, J. Microbial Biotechnol, 17 (4), 650-654

Lehninger, A.L., 1992, **Dasar-dasar Biokimia**, jilid I, Alih Bahasa: Thenawidjaya, M., Erlangga, Jakarta, hal 235-241

Mathews, C.K. and Van Holde, K.E, 1990, **Biochemistry**, Benjamin Cummings Pubkishing Company Inc. USA, pp 12-13

McKee, T., dan James R. M., 2003, **Biochemistry : The Molecular Basic of Life**, 3th Ed., Mc Graw Hill, Philadelphia, pp 183

Minovska, V., E. Winkelhausen, and S. Kuzmanova, 2005, **Lipase Immobilized by Different Techniques on Various Support Materials Applied in Oil Hydrolysis**, J. Serb. Chem. Soc., 70 (4), 609-624

Othmer, K., 1987, **Encyclopedia of Chemical Technology**, John Wiley and Sons Inc. New York, pp 180-216

Owusu, R.K dan Appenten, 2002, **Food Protein Analysis : Quantitative Effects on Processing**. Macel Dekker Inc, New York, pp 47-53

Pereira, E. B., G. M. Zanin dan H. F. Castro, 2003, **Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Esterification Reactions**, 2003, Brazilian Journal of Chemical

Engineering, 4 : 1-15

- Pudjiharti, S. M., dan Wirahadikusumah, 1994, **Amobilisasi Enzim *Penicillin* Asilase Sel Transform *Eschericia colli* sc 50 Menggunakan Gel Poliakrilamid**, JKTI, 4 : 6-1
- Putranto, R. A., Djoko S., Tri Panji S., Asmini B., 2006, **Karakterisasi Gen Penyandi Lipase dari Kapang *Rhizopus Oryzae* dan *Absidia corymbifera***, Menara Perkebunan, 74 (1), 23-32
- Rahayu, K., 1996, **Isolasi dan Pegujian Aktivitas Enzim**, PAU Pangan dan Gizi UGM, hal 79-89
- Roosdiana, A., T. Setianingsih, D. Mardiana, dan Suratmo, 2006, **Pembuatan Ester Laktosa dari Limbah Susu (Whey) Menggunakan Lipase yang Diamobilisasi dalam Aluminosilikat**, Laporan Penelitian, Universitas Brawijaya, Malang
- Said, E.G., 1987, **Bioindustri**. Mediyatama Sarana Perkasa. Jakarta, hal 87
- Schmid, R., Bertagnolii, and Dieter H Wolf, 2001, **Enzymatic Production of Sugar Fatty Acid Esters**, Stuttgart University, Germany, 4: 12-15
- Sekeroglu, G., Sibel F., dan Esra I., 1998, **Production and Characterization of Isopropyllaurate Using Immobilized Lipase**. *J. Eng. Env. Sci. Turkish*. 28: 241-247
- Smith, J.C., 1993, **Prinsip Bioteknologi**. alih bahasa: A Dharma, PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta, hal 66
- Sorensen, H., S. Sorensen, C., Bjerregaard, dan S. Michaelson, 1999, **Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 77-88, 324

Suharto, 1995, **Bioteknologi dalam Dunia Industri**, Dani Offset, Yogyakarta, hal 122, 139

Suhartono, 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, PAU Bioteknologi, IPB, Bogor, hal 147-150

Utomo, 1997, **Rangkuman Metode Isolasi Enzim Skala Laboratorium**, Universitas Brawijaya, Malang, hal 45-55

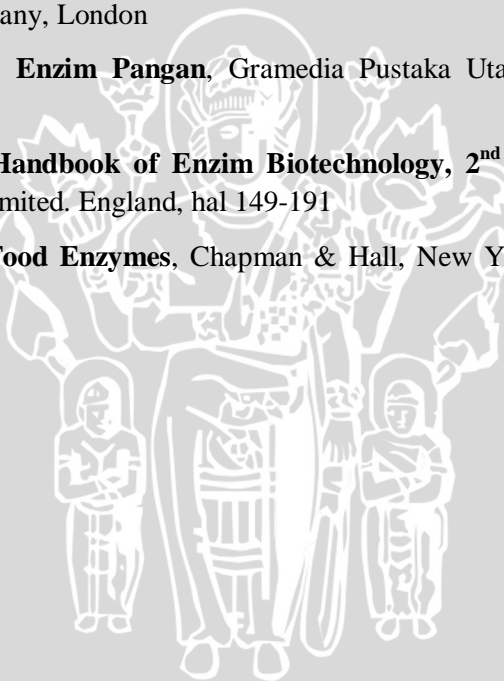
Voet, D., dan Voet, J., 1990, **Biochemistry**, John Willey dan Sons, Inc., New York, pp 432,509

West, E.S., 1996, **Textbook of Biochemistry**, 4th edition, The Maxmillan Company, London

Winarno, F.G., 1995, **Enzim Pangan**, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal 66-71

Wiseman, A, 1985, **Handbook of Enzim Biotechnology**, 2nd ed, Ellis Horwood Limited. England, hal 149-191

Wong, D.W., 1995, **Food Enzymes**, Chapman & Hall, New York, hal 175-181



LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi Larutan

L.1.1. Larutan asam sitrat 0,1 M

Sebanyak 1,9200 gram $C_6H_8O_7$ ditimbang lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

L.1.2. Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M

Sebanyak 2,8400 gram Na_2HPO_4 ditimbang lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

L.1.3. Larutan buffer sitrat fosfat pH 5

Sebanyak 100 mL larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dimasukkan dalam gelas beaker, lalu ke dalamnya dimasukkan batang pengaduk magnetik. Kemudian dipasangkan elektroda pH meter ke dalam larutan tersebut. Dilakukan penambahan asam sitrat sedikit demi sedikit ke dalam larutan hingga mencapai pH 5.

L.1.4. Larutan aktivator

Komposisi bahan-bahan larutan aktivator adalah sebagai berikut:

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	= 0,2200 gram
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	= 0,0500 gram
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	= 0,0160 gram

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

L.1.5. Larutan stok kasein 10000 ppm

Sebanyak 1,0000 gram kasein ditimbang lalu dilarutkan dengan akuades 50 mL dalam gelas beaker dan ditambahkan larutan NaOH

0,1 M hingga kasein larut sempurna. Kemudian larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

L.1.6. Larutan standar kasein

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

L.1.7. Pereaksi biuret

Sebanyak 0,1500 gram $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan 0,6000 gram NaKC_4O_6 ditimbang lalu dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian larutan ditambahkan 30 mL NaOH 10% sambil diaduk. Selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

L.1.8. Larutan indikator fenolftalein 0,1%

Sebanyak 0,1000 gram fenolftalein ditimbang lalu dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 50 mL dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian larutan dituangkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan etanol 70% sampai tanda batas.

L.1.9. Larutan HCl 0,1 M

Sebanyak 0,80 mL larutan HCl pekat dipipet lalu dimasukkan dalam gelas kimia yang telah berisi air. Kemudian larutan ditambah akuades hingga volume 100 mL.

L.1.10. Larutan BaCl_2 0,1 M

Sebanyak 2,4430 gram BaCl_2 ditimbang lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dengan gelas kimia. Kemudian larutan dipindah ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambah akuades sampai tanda batas.

L.1.11. Larutan KOH 0,2 M

Sebanyak 2,8000 gram KOH ditimbang lalu dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 100 mL dalam gelas beaker 250 mL.

Kemudian larutan dituangkan ke dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan dengan etanol 70% sampai tanda batas.

L.1.12. Pembakuan larutan KOH 0,2 M

Sebanyak 1,2600 gram asam oksalat dihidrat ditimbang lalu dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 mL dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian larutan dipindahkan ke dalam 100 mL labu ukur dan diencerkan sampai tanda batas. Larutan yang telah diencerkan tersebut dipipet 10 mL lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 3 tetes indikator fenolftalein 0,1%. Kemudian larutan dititrasi dengan larutan KOH 0,2 M sampai berwarna merah muda dan dicatat volume KOH yang digunakan. Dilakukan 3 kali.



Lampiran 2. Perhitungan Preparasi Larutan

L.2.1. Larutan asam sitrat 0,1 M

Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (BM $C_6H_8O_7$ = 192,06 g/mol).

$$\begin{aligned}\text{mol } C_6H_8O_7 &= [C_6H_8O_7] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol} \\ \text{berat } C_6H_8O_7 &= \text{mol } C_6H_8O_7 \times \text{BM } C_6H_8O_7 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 192,06 \text{ g/mol} \\ &= 1,92 \text{ g}\end{aligned}$$

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

L.2.2. Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M

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

$$\begin{aligned}\text{mol } Na_2HPO_4 &= [Na_2HPO_4] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol} \\ \text{berat } Na_2HPO_4 &= \text{mol } Na_2HPO_4 \times \text{BM } Na_2HPO_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol} \\ &= 2,84 \text{ g}\end{aligned}$$

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

L.2.3. Larutan buffer sitrat fosfat pH 5

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan dibuat dengan mencampur larutan asam sitrat dan larutan dinatrium

hidrogen fosfat (Lampiran L.1.3), berdasarkan persamaan berikut ini:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{garam}]}{[\text{asam}]}$$

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

$$\begin{aligned} \text{pKa}_{\text{asam sitrat}} &= 4,62 \\ 5 &= 4,62 + \log \frac{(100 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}{(V \times 0,1 \text{ mmol/mL})} \\ 0,38 &= \log \frac{20}{0,1 V} \\ V &= 83,37 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.2.4. Larutan KOH 0,2 M

Larutan KOH 0,2 M dibuat sebanyak 250 mL (BM KOH = 56 g/mol).

$$\begin{aligned} \text{mol KOH} &= [\text{KOH}] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \\ &= 0,05 \text{ mol} \\ \text{berat KOH} &= \text{mol KOH} \times \text{BM KOH} \\ &= 0,05 \text{ mol} \times 56 \text{ g/mol} \\ &= 2,80 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi KOH yang harus ditimbang untuk membuat larutan KOH 0,2 M adalah 2,80 gram.

Lampiran 3. Pembakuan Larutan KOH

Tabel L.3.1. Pembakuan KOH 0,2 M dengan asam oksalat 0,1 M

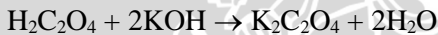
Volume asam oksalat (mL)	Volume KOH (mL)			Total (mL)	Volume KOH rata-rata
	I	II	III		
10	12,10	12,10	12,10	36,30	12,10

Konsentrasi asam oksalat:

$$\frac{W \text{ asam oksalat}}{\text{BM asam oksalat}} = \frac{1,2600 \text{ g}}{126 \text{ g/mol}} = 0,01 \text{ mol}$$

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

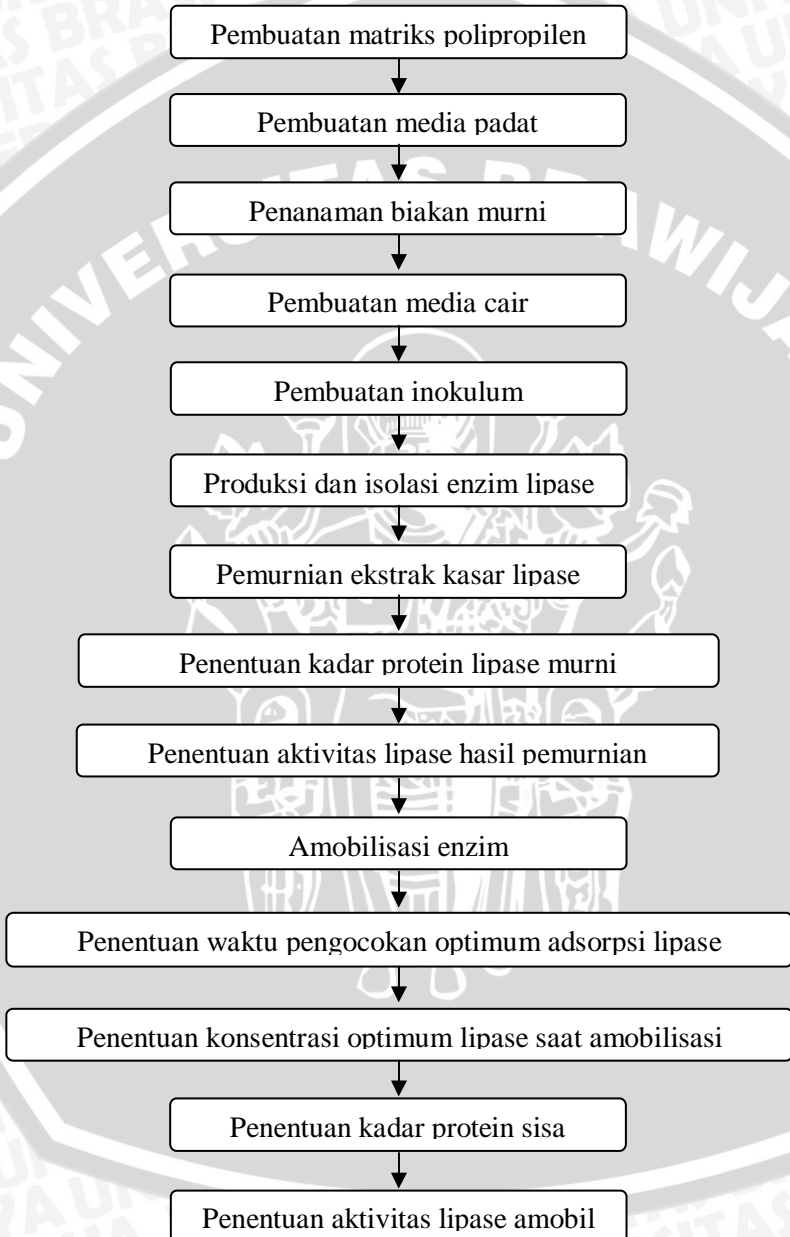
Reaksi antara asam oksalat dengan KOH:



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

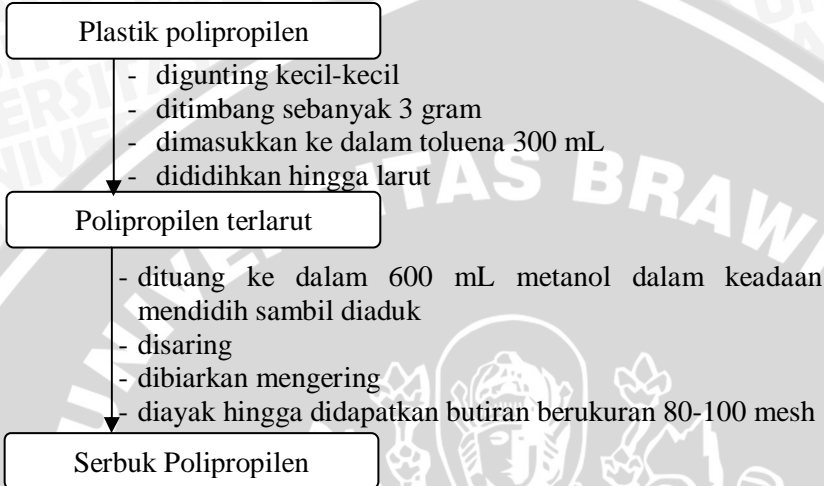
$$[\text{KOH}] = \frac{2 \times V \text{ asam oksalat} \times [\text{asam oksalat}]}{V \text{ KOH}}$$
$$= \frac{2 \times 10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ M}}{12,10 \text{ mL}} = 0,1653 \text{ M}$$

Lampiran 4. Alur Penelitian

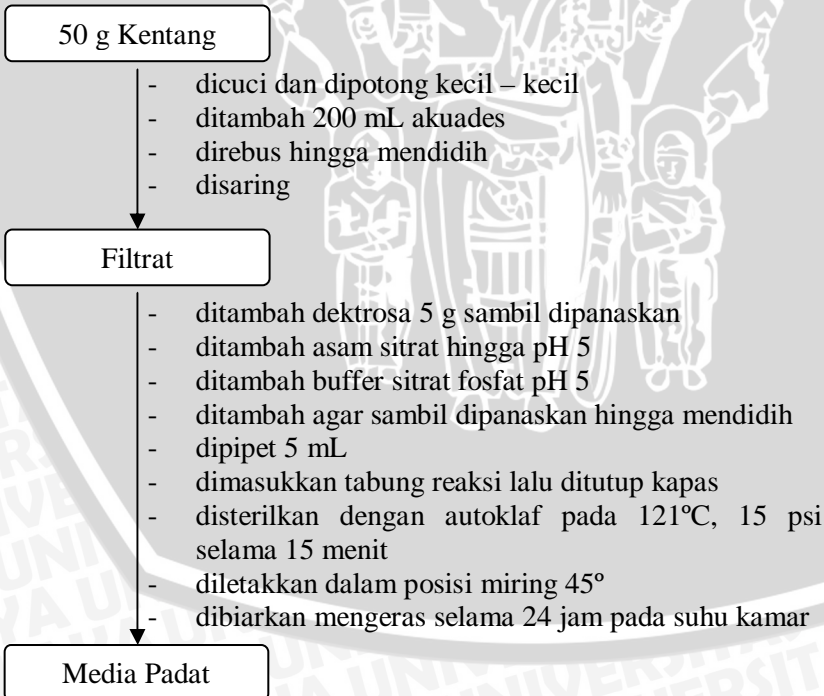


Lampiran 5. Diagram Kerja Penelitian

L.5.1. Pembuatan Matriks Polipropilen



L.5.2. Pembuatan Media Padat



L.5.3. Pembuatan Media Padat

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

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

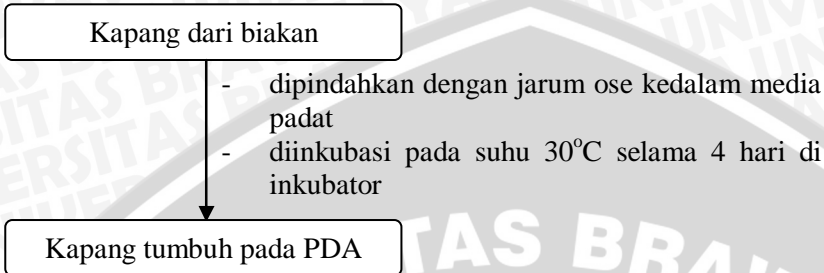
Laktosa (5 g) dan dekstrosa (5 g)

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

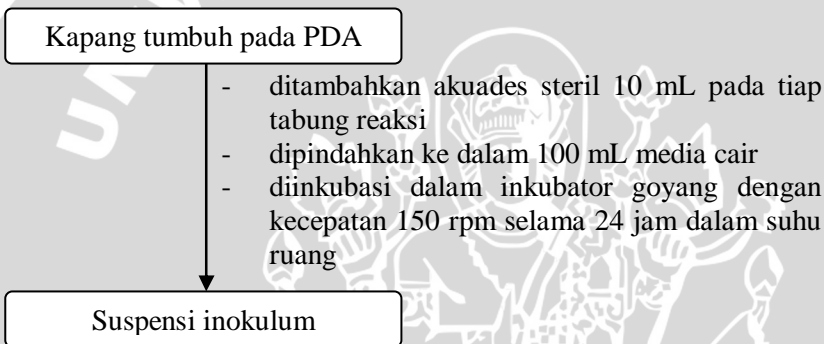
- dicampurkan tiap 50 mL larutan laktosa dan dekstrosa ke dalam tiap 200mL larutan pertama

Media Cair

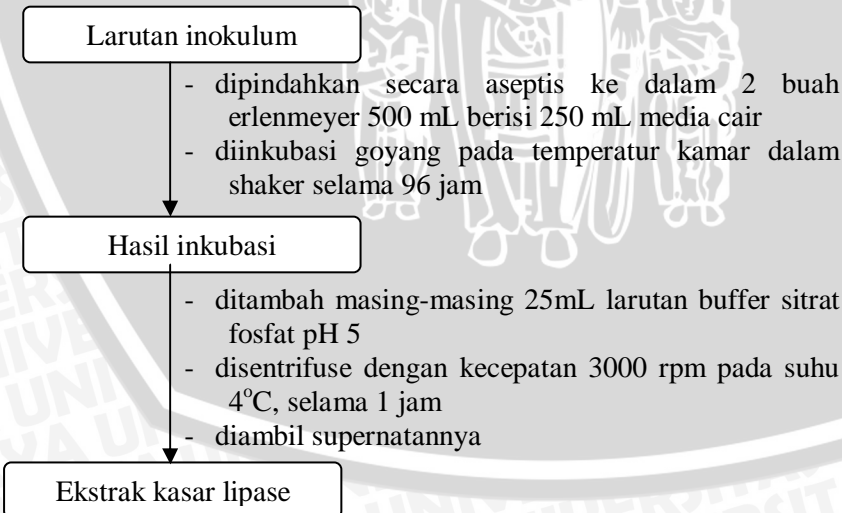
L.5.4. Penanaman Biakan Murni



L.5.5. Pembuatan Inokulum



L.5.6. Produksi dan Isolasi Enzim Lipase



L.5.7. Pembuatan Larutan Stok Kasein 10000 ppm

1 gram kasein

- dilarutkan dalam 50 mL akuades
- ditambah beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M
- dipindahkan ke dalam labu ukur 100mL
- diencerkan dengan akuades hingga tanda batas
- dikocok sampai homogen

Larutan kasein 10000 ppm

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

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

L.5.8. Penentuan λ_{maks} Kasein

2 mL larutan kasein 5000 ppm

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 8 mL reagen Biuret
- ditambah 2 mL buffer sitrat fosfat pH5
- dikocok dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ 460 nm sampai 650 nm
- dicari λ maksimumnya

540 nm

L.5.9. Penentuan Kurva Baku Kasein

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

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 8 mL reagen Biuret
- ditambah 2 mL buffer sitrat fosfat pH 5
- dikocok
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansi pada λ 540 nm
- diplotkan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi

Kurva baku

L.5.10. Penentuan Kadar Protein

2 mL larutan enzim

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 2 mL larutan kasein 5000 ppm
- ditambah 8 mL reagen Biuret
- dikocok
- diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ_{maks} kasein
- diplotkan pada kurva baku larutan kasein

Kadar protein

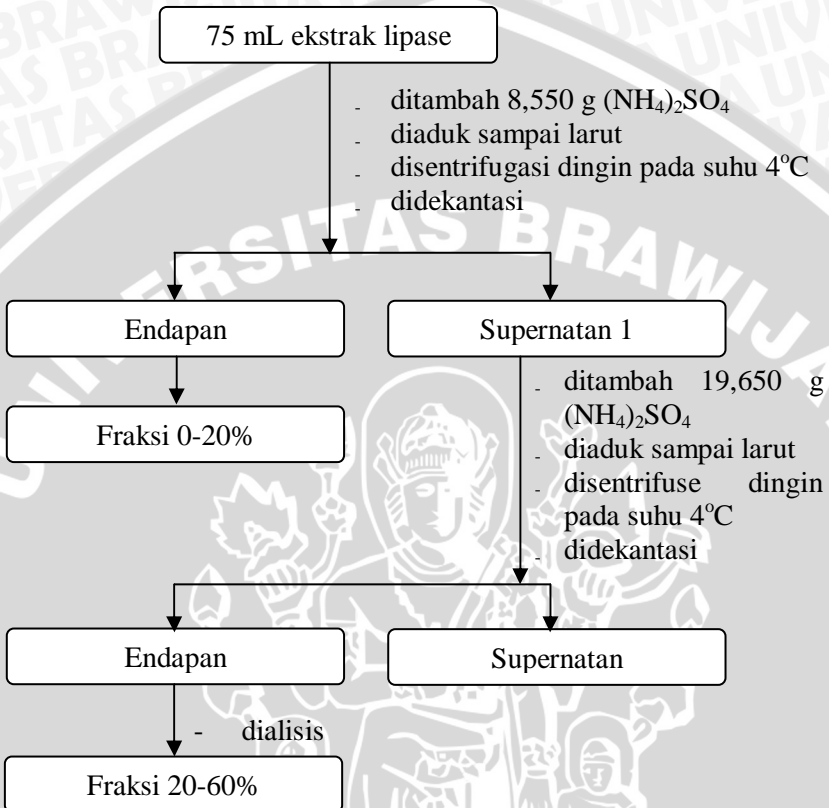
L.5.11. Uji Aktivitas Lipase

Laktosa : asam oleat (1 : 10)

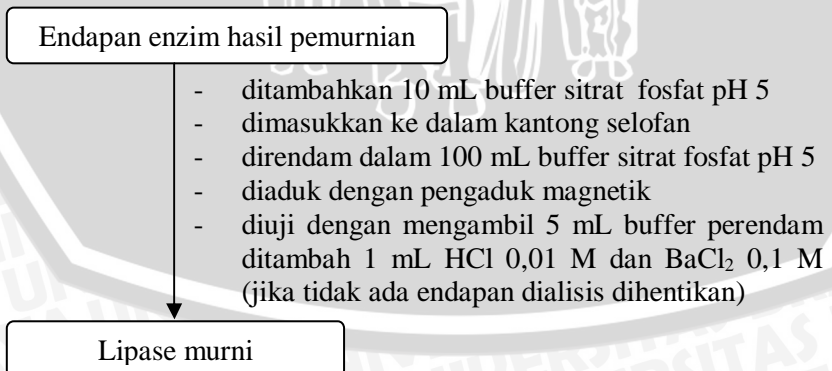
- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL t-butanol
- ditambahkan 2 mL larutan enzim
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C
- ditambah 3 tetes fenoltalein
- dititrasi dengan larutan KOH 0,1653 M sampai berwarna merah muda

Volume KOH

L.5.12. Pemurnian Ekstrak Kasar Lipase Fraksi 20-60%



L.5.13. Dialisis



L.5.14. Amobilisasi Enzim Lipase

L.5.14.1. Penentuan Lama Pengocokan Optimum Adsorpsi Lipase

Lipase hasil pemurnian 1 mL

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah buffer sitrat fosfat pH 5 hingga volume 5 mL
- dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 0,1 g polipropilen yang telah dipreaktifkan dengan 2.5 mL etanol
- diinkubasi dalam inkubator goyang (shaker) dengan kecepatan 22 rpm selama (1, 2, 3, 4, dan 5) jam

Suspensi

- disaring vakumkan dengan corong Buchner

Filtrat

- ditampung dalam tabung reaksi
- diuji kadar protein

Kadar protein

Endapan

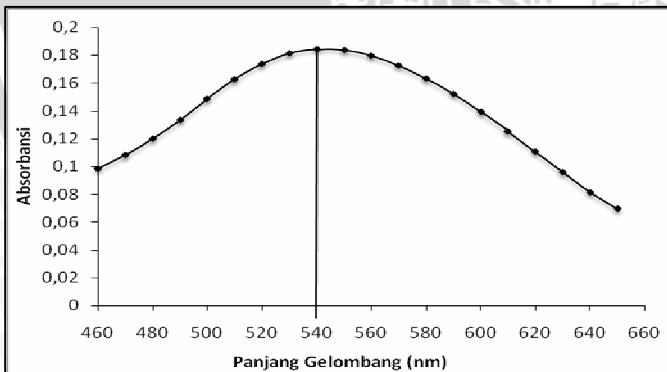
L.5.14.2. Penentuan Konsentrasi Optimum Lipase Saat Amobilisasi



Lampiran 6. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

Tabel L.6.1. Absorbansi Larutan Baku Kasein 833,3 ppm

λ (nm)	A1	A2	A rata-rata
460	0,100	0,097	0,099
470	0,109	0,107	0,108
480	0,121	0,119	0,120
490	0,135	0,132	0,134
500	0,150	0,147	0,149
510	0,164	0,161	0,163
520	0,175	0,172	0,174
530	0,183	0,180	0,182
540	0,186	0,183	0,185
550	0,185	0,182	0,184
560	0,181	0,178	0,180
570	0,174	0,171	0,173
580	0,164	0,162	0,163
590	0,153	0,151	0,152
600	0,14	0,138	0,139
610	0,126	0,125	0,126
620	0,111	0,110	0,111
630	0,096	0,096	0,096
640	0,081	0,082	0,082
650	0,069	0,070	0,070

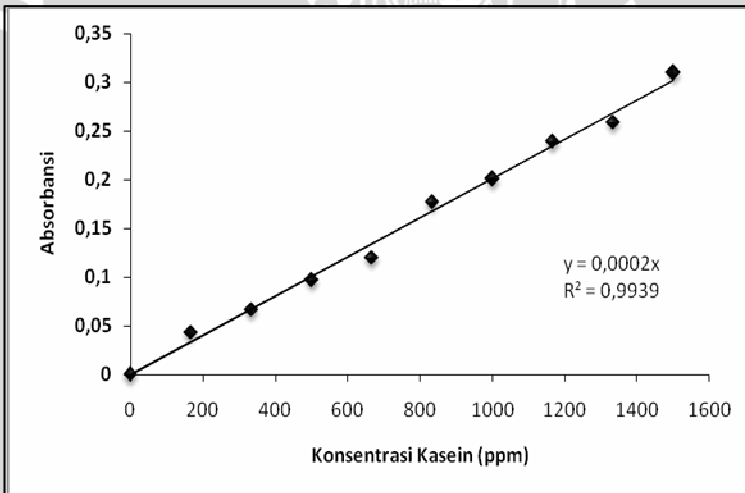


Gambar L.6.1. Kurva Serapan Kasein

Lampiran 7. Pembuatan Kurva Baku

Tabel L.7.1. Absorbansi Larutan Baku Kasein λ 540 nm

Kasein (ppm)	A 1	A 2	A 3	A (rata-rata)
0	0	0	0	0
166,6	0,042	0,042	0,045	0,043
333,3	0,067	0,063	0,069	0,066
500,0	0,098	0,093	0,100	0,097
666,6	0,123	0,120	0,116	0,120
833,3	0,180	0,174	0,176	0,177
1000,0	0,206	0,196	0,200	0,201
1166,6	0,237	0,241	0,239	0,239
1333,3	0,255	0,266	0,255	0,259
1500,0	0,308	0,310	0,310	0,309



Gambar L.7.1. Kurva Baku Kasein

Lampiran 8. Pemurnian Enzim

L.8.1. Pemurnian ekstrak kasar lipase dengan amonium sulfat fraksi 20-60%

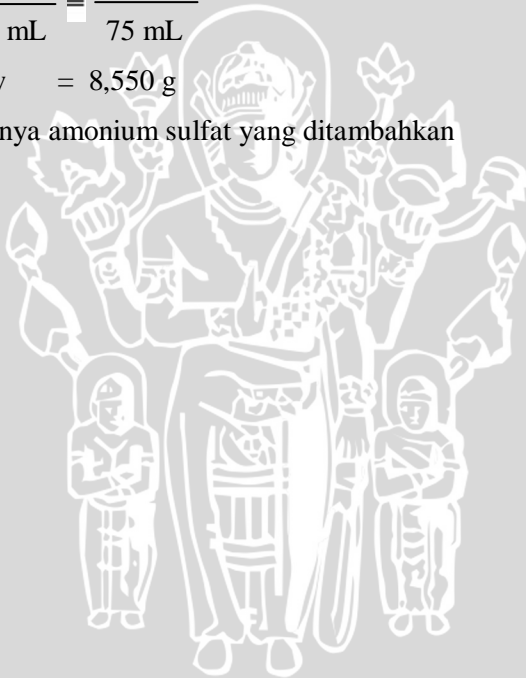
Penambahan amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar lipase berdasarkan Tabel amonium sulfat yang ditambahkan pada setiap liter larutan enzim (Lampiran L.8.2).

Contoh: fraksi 0-20%, maka perlu ditambahkan 114 g amonium sulfat pada 1000 mL larutan enzim, sehingga pada 75 mL ekstrak kasar lipase adalah:

$$\frac{114 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{w}{75 \text{ mL}}$$

$$w = 8,550 \text{ g}$$

w = banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan



L.8.2. Berat amonium sulfat (gram) yang ditambahkan pada setiap liter larutan

Ammonium Sulfate Saturation Tables														
Starting concentration	Final concentration													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	—	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%	—	—	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%	—	—	—	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%	—	—	—	—	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%	—	—	—	—	—	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%	—	—	—	—	—	—	31	63	97	132	168	205	245	285
45%	—	—	—	—	—	—	—	32	65	99	134	171	210	250
50%	—	—	—	—	—	—	—	—	33	66	101	137	176	214
55%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33	67	103	141	179
60%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34	69	105	143

Values given are the number of grams to be added to 1 liter of solution to change the ammonium sulfate concentration from the starting concentration to final concentration. All values are adjusted for changes in volume at room temperature. The saturation of ammonium sulfate does not vary significantly between 4°C and 25°C, so the values given here can normally be used at both temperatures. Saturated ammonium sulfate is 4.1 M at 25°C (add 761 grams to 1 liter of distilled H₂O).

Lampiran 9. Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Lipase Bebas

Tabel L.9. Data volume titran KOH hasil titrasi

Fraksi (%)	Volume titran KOH (mL)				
	I	II	III	Rerata	Blanko
0	7,05	7,05	7,05	7,05	7,17
0-20	6,95	6,95	7,00	6,97	7,17
20-60	6,45	6,50	6,45	6,47	7,17

L.9.1. Aktivitas lipase bebas

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

$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{Volume titrasi KOH} \times [\text{KOH}]}{\text{Volume enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times \text{BM}_{\text{asam oleat}}$$

$$= \frac{\text{Volume titrasi (blanko - sampel)} \times [\text{KOH}]}{\text{Volume enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times \text{BM}_{\text{asam oleat}}$$

Contoh: Penentuan aktivitas lipase fraksi 0% dengan volume titrasi 7,05 mL (volume titrasi blanko 7,17 mL) adalah:

$$\text{Aktivitas} = \frac{0,12 \text{ mL} \times 0,1653 \text{ mmol/mL}}{2 \text{ mL} \times 1440 \text{ menit}} \times 282,470 \text{ mg/mmol}$$

$$= 1,946 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL menit}$$

$$= 1,946 \text{ µg/mL menit}$$

Tabel L.9.1. Aktivitas lipase bebas

Fraksi (%)	Aktivitas (µg/mL menit)			Aktivitas rata-rata
	I	II	III	
0	1,946	1,946	1,946	1,946
0-20	3,567	3,567	2,756	3,297
20-60	11,673	10,862	11,673	11,403

L.9.2. Aktivitas Spesifik Lipase Bebas

L.9.2.1. Perhitungan kadar protein lipase bebas

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

Diketahui persamaan kasein:

$$Y = 2,10^{-4} X$$

Dimana: Y = absorbansi

X = konsentrasi

Volume lipase yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar kasein yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan biuret yang ditambahkan = 8 mL

Volume total larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

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

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

$$M_2 = 833,333 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Enzim + Konsentrasi Kasein
--

Contoh: Perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,282 adalah:

$$Y = 2,10^{-4} X$$

$$0,282 = 2,10^{-4} X$$

$$X = 1410 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi total – konsentrasi kasein

$$= 1410 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm}$$

$$= 576,667 \text{ ppm}$$

$$= 0,577 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Sehingga kadar protein lipase bebas} = 0,577 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}$$

$$= 3,460 \text{ mg/mL}$$

Tabel L.9.2.1. Kadar protein lipase bebas

Fraksi (%)	Absorbansi			Kadar Protein (mg/mL)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
0	0,174*	0,173*	0,174*	5,220	5,190	5,220	5,210
0-20	0,143*	0,143*	0,142*	3,990	3,990	3,960	3,980
20-60	0,282	0,283	0,282	3,460	3,490	3,460	3,470

* dilakukan tanpa penambahan larutan standar kasein 2 mL

Perhitungan kadar protein tanpa penambahan kasein 833,333 ppm:

Contoh: Perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,174 adalah:

$$\begin{aligned}
 Y &= 2.10^{-4} X \\
 0,174 &= 2.10^{-4} X \\
 X &= 870 \text{ ppm} \\
 &= 0,870 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

$$\text{Sehingga kadar protein} = 0,870 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} = 5,220 \text{ mg/mL}$$

L.9.2.2. Perhitungan aktivitas spesifik lipase bebas

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

Contoh: Penentuan aktivitas spesifik lipase bebas dengan aktivitas 1,946 µg/mL menit.

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas spesifik} &= \frac{\text{aktivitas}}{\text{kadar protein}} \\
 &= \frac{1,946 \text{ µg/mL menit}}{5,210 \text{ mg/mL}} \\
 &= 0,374 \text{ µg/mg menit}
 \end{aligned}$$

Tabel L.9.2.2. 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	1,946	5,210	0,374
0-20	3,297	3,567	0,824
20-60	11,403	3,470	3,286

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 10. Penentuan Jumlah Enzim Lipase pada Variasi Lama Pengocokan

L.10.1. Jumlah lipase sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah enzim lipase bebas setelah pemurnian yaitu 3,470 mg/mL enzim. Sehingga jumlah enzim lipase sebelum amobilisasi dalam 5 mL larutan enzim yang mengandung V mL enzim dapat ditentukan dengan rumus berikut:

$$W = 3,470 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ mL enzim yang dicuplik}$$

Dimana:

V = volume enzim murni yang dicuplik = 1 mL

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

Sehingga:

$$W (1 \text{ mL}) \text{ enzim} = 3,470 \text{ mg/mL enzim} \times 1 \text{ mL} = 3,470 \text{ mg}$$

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

$$\frac{3,470 \text{ mg/mL} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0,694 \text{ mg/mL}$$

L.10.2. Jumlah lipase setelah amobilisasi pada variasi lama pengocokan

Tabel L.10.2.1. Volume larutan enzim setelah amobilisasi pada variasi lama pengocokan

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Lama pengocokan (jam)	Volume larutan enzim (mL)			Volume larutan enzim (mL) rata-rata
		I	II	III	
0,694	1	2,65	2,60	2,60	2,62
0,694	2	2,30	2,35	2,35	2,33
0,694	3	2,50	2,45	2,50	2,48
0,694	4	2,60	2,60	2,55	2,58
0,694	5	2,75	2,75	2,70	2,73

Volume lipase yang digunakan untuk penentuan = 2 mL
 Volume larutan standar kasein yang ditambahkan = 2 mL
 Volume larutan biuret yang ditambahkan = 8 mL
 Volume total larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

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

Contoh: Perhitungan jumlah lipase setelah amobilisasi pada lama pengocokan 1 jam dengan nilai absorbansi 0,200 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

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

$$0,200 = 2.10^{-4} X$$

$$X = 1000 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi total – konsentrasi kasein
 = 1000 ppm – 833,333 ppm
 = 166,667 ppm
 = 0,167 mg/mL

Diketahui volume larutan enzim lipase setelah amobilisasi adalah 2,62 mL sehingga jumlah lipase setelah amobilisasi adalah:

$$0,167 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 2,62 \text{ mL} = 2,620 \text{ mg}$$

Tabel L.10.2.2. Jumlah lipase setelah amobilisasi

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Lama pengocokan (jam)	Absorbansi			Jumlah lipase setelah amobilisasi (mg)			Rerata
		I	II	III	I	II	III	
0,694	1	0,200	0,201	0,200	2,620	2,699	2,620	2,646
0,694	2	0,192	0,193	0,192	1,771	1,841	1,771	1,794
0,694	3	0,191	0,192	0,192	1,810	1,885	1,885	1,860
0,694	4	0,191	0,191	0,191	1,889	1,889	1,889	1,889
0,694	5	0,190	0,190	0,190	1,911	1,911	1,911	1,911

L.10.3. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP

Untuk menentukan jumlah lipase yang teradsorpsi PP maka jumlah lipase sebelum amobilisasi dikurangkan dengan jumlah lipase setelah amobilisasi.

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

Dimana:

$W_{\text{sebelum amobilisasi}}$ = jumlah lipase sebelum amobilisasi (mg)

$W_{\text{setelah amobilisasi}}$ = jumlah lipase setelah amobilisasi (mg)

Tabel L.10.3. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP

Jumlah lipase sebelum amobilisasi (mg)	Lama pengocokan (jam)	Jumlah lipase setelah amobilisasi (mg)			Jumlah lipase teradsorpsi 0,1 g PP (mg)			Rerata
		I	II	III	I	II	III	
3,470	1	2,620	2,699	2,620	0,850	0,770	0,850	0,823
3,470	2	1,771	1,841	1,771	1,699	1,629	1,699	1,676
3,470	3	1,810	1,885	1,885	1,660	1,585	1,585	1,610
3,470	4	1,889	1,889	1,889	1,581	1,581	1,581	1,581
3,470	5	1,911	1,911	1,911	1,559	1,559	1,559	1,559

Lampiran 11. Penentuan Jumlah Enzim Lipase pada Variasi Konsentrasi Enzim murni

L.11.1. Jumlah lipase sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah enzim lipase bebas setelah pemurnian yaitu 3,470 mg/mL enzim. Sehingga jumlah enzim lipase sebelum amobilisasi dalam 5 mL larutan enzim yang mengandung V mL enzim dapat ditentukan dengan rumus berikut:

$$W = 3,470 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ mL enzim yang dicuplik}$$

Dimana:

V = volume enzim murni yang dicuplik = 1 mL

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

Contoh:

$$W (1 \text{ mL}) \text{ enzim} = 3,470 \text{ mg/mL enzim} \times 1 \text{ mL} = 3,470 \text{ mg}$$

Dengan cara yang sama, maka jumlah enzim sebelum amobilisasi yaitu: (3,470; 6,940; 10,410; 13,880; 17,350) mg.

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

$$\frac{3,472 \text{ mg/mL} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0,694 \text{ mg/mL}$$

Dengan cara yang sama diketahui konsentrasi larutan enzim sebelum amobilisasi sebesar: (0,694; 1,388; 2,082; 2,776; 3,470) mg/mL.

L.11.2. Jumlah lipase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim murni

Tabel L.11.2.1. Volume larutan enzim setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim murni

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Volume larutan enzim (mL)			Volume larutan enzim (mL) rata-rata
	I	II	III	
0,694	2,40	2,30	2,30	2,33
1,388	2,20	2,30	2,20	2,23
2,082	2,10	2,20	2,10	2,17
2,776	2,00	2,00	2,00	2,00
3,470	2,00	1,90	1,90	1,93

Volume lipase yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar kasein $833,333 \text{ ppm}$ yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan biuret yang ditambahkan = 8 mL

Volume total larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

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

Contoh: Perhitungan jumlah lipase setelah amobilisasi pada konsentrasi enzim $0,694 \text{ mg/mL}$ dengan nilai absorbansi $0,192$ adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 2.10^{-4} X$$
$$0,192 = 2.10^{-4} X$$
$$X = 960 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = konsentrasi enzim + konsentrasi kasein

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi total – konsentrasi kasein

$$= 960 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm}$$
$$= 126,667 \text{ ppm}$$
$$= 0,127 \text{ mg/mL}$$

Diketahui volume larutan enzim lipase setelah amobilisasi adalah $2,33 \text{ mL}$ sehingga jumlah lipase setelah amobilisasi adalah:

$$0,127 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 2,33 \text{ mL} = 1,771 \text{ mg}$$

Tabel L.11.2.2. Jumlah lipase setelah amobilisasi

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Absorbansi			Jumlah lipase setelah amobilisasi (mg)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
0,694	0,192	0,193	0,193	1,771	1,841	1,841	1,818
1,388	0,207	0,207	0,207	2,703	2,703	2,703	2,703
2,082	0,221	0,221	0,222	3,537	3,537	3,602	3,559
2,776	0,274	0,273	0,274	6,440	6,380	6,440	6,420
3,470	0,330	0,330	0,330	9,448	9,448	9,448	9,448

L.11.3. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP

Untuk menentukan jumlah lipase yang teradsorpsi PP maka jumlah lipase sebelum amobilisasi dikurangkan dengan jumlah lipase setelah amobilisasi.

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

Dimana:

$W_{\text{sebelum amobilisasi}}$ = jumlah lipase sebelum amobilisasi (mg)

$W_{\text{setelah amobilisasi}}$ = jumlah lipase setelah amobilisasi (mg)

Tabel L.11.3.1. Jumlah lipase yang teradsorpsi PP

Jumlah lipase sebelum amobilisasi (mg)	Jumlah lipase setelah amobilisasi (mg)			Jumlah lipase teradsorpsi 0,1 g PP (mg)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
3,470	1,771	1,841	1,841	1,699	1,629	1,629	1,652
6,940	2,703	2,703	2,703	4,237	4,237	4,237	4,237
10,410	3,537	3,537	3,602	6,873	6,873	6,808	6,851
13,880	6,440	6,380	6,440	7,440	7,500	7,440	7,460
17,350	9,448	9,448	9,448	7,902	7,902	7,902	7,902

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

Tabel L.11.3.2. Berat (PP + lipase) setelah amobilisasi

Konsentrasi larutan lipase hasil pemurnian (mg/mL)	Berat (PP + lipase) setelah amobilisasi (g)
0,694	0,37
1,388	0,38
2,082	0,39
2,776	0,40
3,470	0,40

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

$$\text{Berat lipase dalam 0,1 g (PP + lipase)} = \frac{0,1 \text{ g}}{W_c} \times W_{\text{teradsorpsi}}$$

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

W_c = berat (PP + lipase) setelah amobilisasi

Contoh: Perhitungan jumlah lipase setelah amobilisasi dalam 0,1 g (PP + lipase) dengan W_c sebesar 0,37 g adalah:

$$= \frac{0,1 \text{ g}}{0,37 \text{ g}} \times 1,652 \text{ mg} = 0,447 \text{ mg}$$

Tabel L.11.3.3. Jumlah lipase dalam 0,1 g (PP + lipase)

Konsentrasi larutan lipase hasil pemurnian (mg/mL)	Berat lipase (mg) yang teradsorpsi dalam 0,1 g (PP + lipase)
0,694	0,447
1,388	1,115
2,082	1,757
2,776	1,865
3,470	1,975

Lampiran 12. Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Lipase Amobil

Tabel L.12. Data volume titran KOH setelah amoilisasi

Volume Enzim (mL)	Volume titran KOH (mL)				
	I	II	III	Rata-rata	Blanko
1	6,80	6,85	6,80	6,82	7,05
2	7,00	6,95	7,00	6,98	7,50
3	7,10	7,10	7,00	7,07	7,68
4	7,20	7,20	7,20	7,20	7,83
5	7,20	7,20	7,20	7,20	7,85

L.12.1. Penentuan 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 dilakuka seperti pada perhitungan aktivitas lipase bebas pada L.9.1.

Tabel L.12.1. Aktivitas lipase amobil

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Volume KOH yang dipakai (mL)			Aktivitas ($\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata
	I	II	III	I	II	III	
0,694	0,25	0,20	0,25	81,063	64,850	81,063	75,659
1,388	0,50	0,55	0,50	162,126	178,339	162,126	167,530
2,082	0,58	0,58	0,68	188,066	188,066	220,490	198,875
2,776	0,63	0,63	0,63	204,279	204,279	204,279	204,279
3,470	0,65	0,65	0,65	210,764	210,764	210,764	210,764

L.12.2. Penentuan aktivitas spesifik lipase amobil

Perhitungan aktivitas spesifik lipase amobil dilakukan seperti pada perhitungan aktivitas spesifik lipase bebas pada L.9.2.2, dimana kadar protein untuk lipase amobil adalah jumlah lipase tiap 0,1 g (PP+lipase).

Tabel L.12.2. Aktivitas spesifik lipase amobil

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Aktivitas spesifik ($\mu\text{g}/\text{mg}$ menit)			Aktivitas spesifik rata-rata ($\mu\text{g}/\text{mg}$ menit)
	I	II	III	
0,694	18,135	14,508	18,135	16,926
1,388	14,541	15,995	14,541	15,026
2,082	10,704	10,704	12,549	11,319
2,776	10,953	10,953	10,953	10,953
3,470	10,670	10,670	10,670	10,670



Lampiran 13. Analisa Statistik

A. Aktivitas spesifik lipase amobil

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

Tabel L.13.1. Aktivitas lipase amobil

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Aktivitas spesifik (µg/mg menit)			Total	Rataan
	I	II	III		
0,694	18,135	14,508	18,135	50,778	16,926
1,388	14,541	15,995	14,541	45,077	15,026
2,082	10,704	10,704	12,549	33,957	11,319
2,776	10,953	10,953	10,953	32,859	10,953
3,470	10,670	10,670	10,670	32,010	10,670

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} FK &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} \\ &= \frac{(50,778 + \dots + 32,010)^2}{3 \times 5} \\ &= 2526,713 \end{aligned}$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{a. } JK_{\text{total}} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ &= (18,135^2 + \dots + 10,670^2) - 2526,713 \\ &= 108,327 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. JK}_{\text{perlakuan}} (\text{JK}_p) &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - \text{FK} \\
 &= \frac{(50,778^2 + \dots + 32,010^2)}{3} - 2526,713 \\
 &= 95,878
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{c. JK}_{\text{galat percobaan}} (\text{JK}_G) &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\
 &= 108,327 - 95,878 = 12,449
 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT}_{\text{perlakuan}} = \frac{\text{JK}_p}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} = \frac{95,878}{4} = 23,970$$

$$\text{b. KT}_{\text{galat percobaan}} = \frac{\text{JK}_G}{\text{db}_{\text{percobaan}}} = \frac{12,449}{10} = 1,250$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KT}_p}{\text{KT}_G} = \frac{23,970}{1,250} = 19,253$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,480$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, artinya variasi konsentrasi larutan enzim berpengaruh terhadap aktivitas spesifik lipase amobil. Untuk mengetahui variasi konsentrasi larutan enzim mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas spesifik lipase amobil, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$.

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{db})} \times (2\text{KT}_g / n)^{0,5} \\
 &= t_{(0,05/2; 10)} \times (2 \times 1,245/3)^{0,5} \\
 &= 2,228 \times 0,911 \\
 &= 2,030
 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi konsentrasi larutan enzim yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	2526,713
JK total	108,327
JK perlakuan	95,878
JK galat percobaan	12,449
KT perlakuan	23,970
KT galat percobaan	1,250
F hitung	19,253
F tabel 5%	3,480
BNT 5%	2,030

Tabel L.13.2. Data analisa varian satu arah

Sebar keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	95,878	23,970	19,253	3,480
Galat percobaan	10	12,449	1,250		
Total	14	108,327	25,215		

Tabel L.13.3. Data uji BNT 5% terhadap variasi konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Konsentrasi enzim (mg/mL)	3,470	2,776	2,082	1,388	0,694	Notasi
	rataan	10,670	10,953	11,319	15,026	16,926	
3,470	10,670	0					a
2,776	10,953	0,283	0				a
2,082	11,319	0,649	0,366	0			a
1,388	15,026	4,356	4,073	3,707	0		b
0,694	16,926	6,256	5,973	5,607	1,900	0	c

Notasi: a = tidak berbeda nyata

b = berbeda nyata

c = sangat berbeda nyata

B. Jumlah lipase yang teradsorpsi dalam 0,1 g PP

B.1. Pada variasi lama pengocokan

Tabel L.13.4. Analisis pengaruh lama pengocokan terhadap jumlah lipase teradsorpsi pada PP

Lama pengocokan (jam)	Jumlah lipase teradsorpsi 0,1 g PP (mg)			Total	Rerata
	I	II	III		
1	0,850	0,770	0,850	2,470	0,823
2	1,699	1,629	1,699	5,027	1,676
3	1,660	1,585	1,585	4,830	1,610
4	1,581	1,581	1,581	4,743	1,581
5	1,559	1,559	1,559	4,677	1,559

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\text{FK} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$
$$= \frac{(2,470 + \dots + 4,677)^2}{3 \times 5}$$
$$= 31,529$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

$$\text{a. JK}_{\text{total}} = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK}$$
$$= (0,850^2 + \dots + 1,559^2) - 31,529$$
$$= 1,506$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. JK}_{\text{perlakuan}} (\text{JK}_p) &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - \text{FK} \\
 &= \frac{(2,470^2 + \dots + 4,677^2)}{3} - 31,529 \\
 &= 1,495
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{c. JK}_{\text{galat percobaan}} (\text{JK}_G) &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\
 &= 1,506 - 1,495 = 0,011
 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT}_{\text{perlakuan}} = \frac{\text{JK}_p}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} = \frac{1,495}{4} = 0,374$$

$$\text{b. KT}_{\text{galat percobaan}} = \frac{\text{JK}_G}{\text{db}_{\text{percobaan}}} = \frac{0,011}{10} = 0,001$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KT}_p}{\text{KT}_G} = \frac{0,374}{0,001} = 339,773$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,48$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, artinya variasi lama pencocokan berpengaruh terhadap jumlah lipase teradsorpsi pada PP. Untuk mengetahui variasi lama pencocokan mana saja yang berpengaruh terhadap jumlah lipase teradsorpsi pada PP, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$.

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{db})} \times (2\text{KTg} / n)^{0,5} \\
 &= t_{(0,05/2; 10)} \times (2 \times 0,001/3)^{0,5} \\
 &= 2,228 \times 0,029 \\
 &= 0,067
 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi lama pengocokan yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	31,529
JK total	1,506
JK perlakuan	1,495
JK galat percobaan	0,011
KT perlakuan	0,374
KT galat percobaan	0,001
F hitung	339,773
F tabel 5%	3,48
BNT 5%	0,067

Tabel L.13.5. Data analisa varian satu arah

Sebar keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	1,495	0,374	339,773	3,48
Galat percobaan	10	0,011	0,001		
Total	14	1,506	0,375		

Tabel L.13.6. Data uji BNT 5% terhadap variasi lama pengocokan

Lama pengocokan (Jam)	Lama pengocokan (Jam)	1	2	3	4	5	Notasi
	rataan	0,823	1,676	1,610	1,581	1,559	
1	0,823	0					a
2	1,676	0,853	0				b
3	1,610	0,787	0,066	0			b
4	1,581	0,758	0,095	0,029	0		b
5	1,559	0,736	0,117	0,051	0,022	0	b

Notasi: a = tidak berbeda nyata

b = berbeda nyata

c = sangat berbeda nyata

B.2. Pada variasi konsentrasi larutan enzim

Tabel L.13.7. Analisis pengaruh konsentrasi larutan enzim terhadap jumlah lipase teradsorpsi PP

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Jumlah lipase teradsorpsi 0,1 g PP (mg)			Total	Rataan
	I	II	III		
0,694	1,699	1,629	1,629	4,957	1,652
1,388	4,237	4,237	4,237	12,711	4,237
2,082	6,873	6,873	6,808	20,554	6,851
2,776	7,440	7,500	7,440	22,380	7,460
3,470	7,902	7,902	7,902	23,706	7,902

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$
$$= \frac{(4,957 + \dots + 23,706)^2}{3 \times 5}$$
$$= 473,856$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

$$a. JK_{\text{total}} = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$
$$= (1,699^2 + \dots + 7,902^2) - 473,856$$
$$= 83,302$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. JK}_{\text{perlakuan}} (\text{JK}_p) &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - \text{FK} \\
 &= \frac{(4,957^2 + \dots + 23,706^2)}{3} - 473,856 \\
 &= 83,293
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{a. JK}_{\text{galat percobaan}} (\text{JK}_G) &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\
 &= 83,302 - 83,293 = 0,009
 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT}_{\text{perlakuan}} = \frac{\text{JK}_p}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} = \frac{83,293}{4} = 20,823$$

$$\text{b. KT}_{\text{galat percobaan}} = \frac{\text{JK}_G}{\text{db}_{\text{percobaan}}} = \frac{0,009}{10} = 0,001$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KT}_p}{\text{KT}_G} = \frac{20,823}{0,001} = 23136,667$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,48$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, artinya variasi konsentrasi lautan enzim berpengaruh terhadap jumlah lipase teradsorpsi pada PP. Untuk mengetahui variasi konsentrasi larutan enzim mana saja yang berpengaruh terhadap jumlah lipase teradsorpsi pada PP, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{db})} \times (2\text{KT}_g / n)^{0,5} \\
 &= t_{(0,05/2; 10)} \times (2 \times 0,001/3)^{0,5} \\
 &= 2,228 \times 0,025 \\
 &= 0,056
 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi konsentrasi larutan enzim yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	473,856
JK total	83,302
JK perlakuan	83,293
JK galat percobaan	0,009
KT perlakuan	20,823
KT galat percobaan	0,001
F hitung	23136,667
F tabel 5%	3,480
BNT 5%	0,056

Tabel L.13.8. Data analisa varian satu arah

Sebar keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	83,293	20,823	23136,667	3,480
Galat percobaan	10	0,009	0,001		
Total	14	83,302	20,824		

Tabel L.13.9. Data uji BNT 5% terhadap variasi konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim (mg/mL)	Konsentrasi enzim (mg/mL)	0,694	1,388	2,082	2,776	3,470	Notasi
	rataan	1,652	4,237	6,851	7,460	7,902	
0,694	1,652	0					a
1,388	4,237	2,585	0				b
2,082	6,851	5,199	2,614	0			c
2,776	7,460	5,808	3,223	0,609	0		c
3,470	7,902	6,250	3,665	1,051	0,442	0	c

Notasi: a = tidak berbeda nyata

b = berbeda nyata

c = sangat berbeda nyata