



PENENTUAN SUHU DAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM AKTIVITAS LIPASE AMOBIL DARI *Mucor miehei*

TUGAS AKHIR

Oleh :

CATUR WIDIASTUTIK. S
0110920010-92



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

SER
KIP
2006
3

00242
07 FEB 2006

COPY No : 1

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2006



M L I K
PERPUSTAKAAN
Universitas Brawijaya



**PENENTUAN SUHU DAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM
AKTIVITAS LIPASE AMOBIL DARI *Mucor miehei***

TUGAS AKHIR

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

Oleh :

CATUR WIDIASTUTIK. S

0110920010-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2006



**LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR****PENENTUAN SUHU DAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM
AKTIVITAS LIPASE AMOBIL DARI *Mucor miehei***

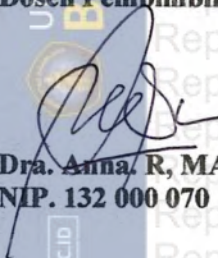
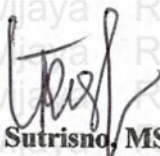
REPOSITORY.UB.AC.ID

Oleh:

CATUR WIDIASTUTIK. S**0110920010-92**Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal **28 JAN 2005**dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang Kimia

Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,


Dra. Anna R, MApp, Sc
NIP. 132 000 070
Drs. Sutrisno, MSi.
NIP. 131 879 407

REPOSITORY.UB.AC.ID

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA
Universitas BrawijayaM. Farid Rahman, SSi, MSi.
NIP. 132 158 726MILIK
PERPUSTAKAAN
Universitas Brawijaya

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

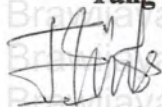
Nama : Catur Widiastutik Santoso
NIM : 0110920010-92
Jurusan : Kimia
Penulis Tugas Akhir berjudul : Penentuan Suhu dan Waktu
Inkubasi Optimum Aktivitas Lipase Amobil Dari *Mucor miehei*

Dengan ini menyatakan:

1. Isi dari Tugas Akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam 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, Januari, 2006
Yang menyatakan,



(Catur Widiastutik Santoso)

PENENTUAN SUHU DAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM AKTIVITAS LIPASE AMOBIL DARI *Mucor miehei*

ABSTRAK

Ester gula merupakan surfaktan non-ionik yang dapat digunakan sebagai emulsifier dalam industri detergent, kosmetik, farmasetik dan lain sebagainya. Ester gula dapat disintesis dari glukosa dan asam oleat secara reaksi enzimatik. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh kondisi kerja optimum dari lipase amobil sebagai katalis reaksi esterifikasi glukosa dan asam oleat. Lipase yang digunakan sebagai katalis diisolasi dari *Mucor miehei* yang diamobilisasi dengan Na-alginat. Aktivitas lipase amobil dapat ditentukan berdasarkan jumlah asam lemak sisa hasil esterifikasi selama reaksi enzimatik secara titrasi asam basa menggunakan NaOH 0,203 M dengan indikator pp 1%. Karakter lipase amobil dapat dipelajari dengan menentukan kondisi kerja optimum yang meliputi suhu, dan waktu inkubasi dalam proses esterifikasi. Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimum lipase amobil dicapai pada suhu 50 °C dan waktu inkubasi 24 jam, dengan aktivitas sebesar 8,417 unit. Adanya ester gula dapat diidentifikasi dengan spektrofotometri Inframerah

UN BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

DETERMINATION THE OPTIMUM TEMPERATURE AND INCUBATION TIME OF ACTIVITY IMMOBILIZED LIPASE FROM *Mucor miehei*

ABSTRACT

Sugar ester is non ionic surfactant used as emulsifier, detergent in cosmetic, and pharmaceutical industries. Glucocyl oleic could be synthesized from glucose and oleic acid by enzymatic reaction. This research was done to obtain optimum condition of immobilized lipase activity as catalyst of glucose and oleic acid esterification reaction. The lipase enzyme which use as catalyst isolated from *Mucor miehei* and immobilized by using Na-Alginat. Lipase enzyme activity could be determined based on calculation of fatty acid from esterification reaction done by acid base titration using NaOH 0,2030 M with pp indicator 1 %. Characteristic of immobilized lipase were studied by determining the optimum activity involved temperature and incubation time during esterification reaction. The result of researched have shown that optimum condition of immobilized lipase at 50 °C and incubation time 24 hours, with activity 8,417 units. The presence glucocyl oleic could be identified by using spectronic Infrared.



KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT, karena atas segala limpahan rahmat dan ridhoNya, penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul **“PENENTUAN SUHU DAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM AKTIVITAS LIPASE AMOBIL DARI *Mucor miehei*”**.

Penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu sebagai wujud rasa syukur atas kesempatan dan kepercayaan yang telah diberikan, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dra. Anna. R, M.App.Sc., dan Drs. Sutrisno, MSi., selaku Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II yang telah memberikan petunjuk, nasihat, saran, dan masukan-masukan yang sangat berharga sejak penulisan proposal hingga selesainya penyusunan tugas akhir ini.
2. Drs. Sasangka, MSi., selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan, nasihat, dan saran yang berguna selama penulis kuliah.
3. Dra Tutik Setianingsih M.Si., Dr Atikah Apt, M.Si., Ir Bambang Poerwadi MS., dan Masruri S.Si., M.Si, selaku dosen penguji yang memberikan arahan dalam perbaikan tugas akhir.
4. M. Farid Rahman S.Si M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya dan Semua staf pengajaran jurusan kimia dan para laboran yang telah mendukung terfasilitasinya pelaksanaan tugas akhir.
5. Keluarga yang senantiasa mendo'akan, memberikan semangat, perhatian dan kasih sayang yang melimpah.
6. Semua pihak yang telah turut membantu pelaksanaan maupun penyusunan tugas akhir.

Penulis sadar akan keterbatasan yang dimiliki, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan penelitian ini.

Malang, Januari 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
ABSTRAK	iii
ABTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	2
1.5 Manfaat Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Enzim	3
2.2 <i>Mucor miehei</i>	8
2.2.1 Lipase	10
2.3 Amobilisasi Enzim	10
2.3.1 Amobilisasi Enzim Dengan Na-Alginat	12
2.4 Ester Gula dari Glukosa Dan Asam Oleat	13
2.4.1 Ester Gula	13
2.4.2 Asam Oleat	15
2.4.3 Glukosa	15
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2 Sampel Penelitian	17
3.3 Bahan Penelitian	17
3.4 Alat-alat Penelitian	17
3.5 Metode Percobaan	17
3.6 Cara Kerja	18
3.6.1 Pembuatan Media Padat	18
3.6.2 Penanaman Biakan Murni	18

3.6.3	Pembuatan Media Cair Untuk produksi lipase.....	18
3.6.4	Pembuatan Inokulum	19
3.6.5	Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	19
3.6.6	Produksi Enzim	19
3.6.7	Isolasi Ekstrak Kasar Lipase	19
3.6.8	Pemurnian Ekstrak Kasar Lipase	20
3.6.9	Amobilisasi Lipase.....	20
3.6.10	Penentuan Kadar Protein.....	21
3.6.10.1	Penentuan Kadar Protein Lipase Bebas	21
3.6.10.2	Penentuan Kadar Protein Lipase Amobil.....	21
3.6.11	Uji Aktivitas Lipase Amobil.....	21
3.6.12	Penentuan Kondisi Optimum Lipase Amobil Dengan Variasi : Suhu, dan Waktu inkubasi	22
3.6.13	Identifikasi Ester Gula (data pendukung)	22
3.6.14	Analisis Data.....	23

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Amobilisasi Lipase Dalam Ca-Alginat.....	26
4.2	Penentuan Kondisi Optimum Lipase Amobil.....	27
4.2.1	Penentuan Suhu Optimum	27
4.2.2	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	29
4.3	Identifikasi Spektrofotometri Inframerah (data pendukung). 30	

BAB V KESIMPULAN

5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran	32

DAFTAR PUSTAKA	33
-----------------------------	----

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Teks	Hal
2.1	Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim	3
2.2	Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim	4
2.3	Pengaruh konsentrasi enzim dan jumlah substrat terhadap lama reaksi	5
2.4	Hubungan antara konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi	5
2.5	Hubungan antara waktu dan logaritmit jumlah sel	9
2.7	Tipe kisi dan tipe mikrokapsul	11
2.8	Struktur Na-alginat	12
2.9	Reaksi Pembentukan Gel Ca-alginat	13
2.10	Reaksi Esterifikasi Glukosa dan Asam lemak	14
2.11	Struktur Asam Oleat	15
2.12	Struktur Glukosa	16
4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Mucor miehei</i>	26
4.2	Grafik Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase amobil	27
4.3	Struktur Lipase	28
4.4	Grafik Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas lipase amobil	30
L.8.1	IR Ester dari asam oleat dan glukosa	50
L.8.2	IR Asam oleat	51
L.8.3	IR Glukosa	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Teks	Hal
L.1.1	Massa dari <i>Mucor</i> miehei.....	36
L.2.1	Penentuan panjang gelombang maksimum Bovin Serum Albumin (BSA).....	37
L.3.1	Pembuatan Kurva Standar.....	38
L.4.1	Standarisasi NaOH 0,02 M dengan asam oksalat 0,05 M	39
L.4.2	Aktivitas lipase bebas.....	40
L.5.1	Serapan protein lipase tidak terjebak.....	41
L.5.2	Serapan protein lipase bebas.....	42
L.6.1	Aktivitas dan Aktivitas spesifik lipase amobil pada berbagai suhu dan waktu inkubasi 16 jam.....	43
L.6.2	Aktivitas dan Aktivitas spesifik lipase amobil pada berbagai waktu inkubasi dan kondisi suhu optimum.....	44
L.7.1	Penentuan F_{hitung} pada variasi suhu.....	45
L.7.2	Uji BNT 5% pada variasi suhu.....	47
L.7.3	Penentuan F_{hitung} pada variasi waktu inkubasi.....	48
L.7.4	Uji BNT 5% pada variasi waktu inkubasi.....	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Teks

Hal

1. Pembuatan kurva pertumbuhan *Mucor miehei*..... 36
2. Penentuan panjang gelombang BovinSerum Albumin (BSA) 37
3. Pembuatan kurva standar..... 38
4. Pembakuan NaOH dan Penentuan aktivitas lipase bebas 39
5. Penentuan aktivitas dan aktivitas spesifik lipase amobil 41
6. Penentuan suhu dan waktu inkubasi optimum lipase amobil... 43
7. Analisa statistika..... 45
8. Spektra Inframerah..... 50
8. Pembuatan reaksi..... 53
9. Tahapan penelitian 55
10. Cara kerja..... 56

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan biokatalis yang mempunyai kespesifikan tertentu dalam mengkatalisis substrat menjadi produk. Ditinjau dari segi produksi, enzim dihasilkan dan diperoleh dari semua sel hidup tanaman, hewan, dan mikroba. Salah satu cara memproduksi enzim yang sering dilakukan dalam saat ini adalah dengan menggunakan mikroba, karena enzim mikroba diproduksi dengan biaya murah baik untuk pembiakan dan pemurniannya (Hari, 1996). Diantara mikroorganisme yang ada, ekstrak kasar lipase dapat diperoleh dari jamur seperti *Mucor*, *Rhizopus*, dan *Aspergillus* yang dapat digunakan untuk esterifikasi secara tidak langsung (Hui, 1989).

Lipase merupakan enzim yang bekerja dalam mengkatalisis suatu reaksi meliputi: esterifikasi, inesterifikasi, dan hidrolisis. Lipase banyak menarik perhatian pada akhir dekade ini karena aplikasinya yang sangat luas dalam berbagai bidang industri baik industri pangan maupun non pangan seperti industri minyak dan lemak, sabun farmasetik dan kosmetik. Salah satu produk esterifikasi yang sekarang ini lagi berkembang adalah ester gula. Ester gula merupakan surfaktan yang dapat digunakan sebagai emulsifier (Faber, 1995). Ester gula ini dapat diproduksi dari glukosa dan rantai panjang asam lemak yaitu asam oleat, dimana kedua bahan ini merupakan sumber yang dapat diperbarui, sehingga sifat ester gula dari kedua bahan ini mudah biodegradasi, ramah dengan lingkungan, non toksik, tidak berbau dan tidak berasa (Blecker, *et al.*, 2001).

Salah satu faktor penggunaan reaksi katalis lipase dalam skala industri adalah stabilitas dan efisiensi enzim, namun sebagai molekul bebas yang larut dalam air enzim tersebut sulit untuk dipisahkan dari substrat dan produknya. Nilai efisiensi reaksi dapat meningkat lebih besar dengan menggunakan *reuse lipase* (Compton *et al.*, 2000). Salah satu alternatif agar enzim dapat digunakan berulang adalah dengan menggunakan amobilisasi enzim.

Amobilisasi enzim merupakan perubahan enzim sebagai molekul bebas yang larut dalam air menjadi keadaan yang tak bergerak larut dalam air. Ada 3 metode dalam amobilisasi enzim yaitu metode ikatan pengemban, metode ikatan silang dan metode penjebakan. Metode ikatan pengemban dapat menyebabkan perubahan konformasi atau

destruksi aktif enzim, sedangkan metode ikatan silang sulit dilakukan pengendalian terhadap reaksi pembentukan ikatan silang sehingga sulit didapatkan agregat enzim yang besar dengan retensi aktivitas tinggi, selain itu kedua metode ini membutuhkan tenaga dan biaya yang mahal (Chibata, 1978).

Metode penjebakan merupakan metode yang paling umum digunakan karena tata caranya mudah dan dapat dilakukan dalam kondisi lunak. Pengemban yang sering digunakan pada metode penjebakan adalah Na-Alginat selain pati dan gelatin (Bernart dan Ventasubramanian, 1987).

Lipase yang telah diamobilkan dapat mengalami penurunan aktivitasnya dalam mengkatalisis substrat menjadi produk. Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas lipase diantaranya adalah suhu dan waktu inkubasi. Suhu yang terlalu besar bisa menyebabkan enzim mengalami kerusakan struktur atau denaturasi, sedangkan waktu yang terlalu besar akan menurunkan aktivitasnya, karena titik optimum enzim telah jenuh dengan produk atau produk yang dihasilkan tetap sementara waktu yang digunakan semakin besar (Cheetam and Bucke, 1979).

Berangkat dari pernyataan di atas maka dilakukan penelitian untuk menentuka kondisi kerja optimum yang meliputi faktor suhu dan waktu inkubasi lipase amobil dari *Mucor miehei* untuk esterifikasi glukosa dan asam oleat.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana kondisi kerja optimum lipase amobil yang diisolasi dari *Mucor miehei* untuk esterifikasi glukosa dan asam oleat?

1.3 Batasan masalah

Dalam penelitian ini masalah dibatasi pada penentuan kondisi optimum aktivitas lipase yang dimurnikan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraksi (0-60)% untuk esterifikasi glukosa dan asam oleat dengan variasi suhu (40,45,50,55, dan 60) $^{\circ}\text{C}$ dan waktu inkubasi (0,8,16,24,32, dan 40)jam.

1.3 Tujuan Penelitian

- Untuk mengetahui suhu dan waktu inkubasi optimum aktivitas lipase amobil hasil isolasi dari *Mucor miehei*.

1.4 Manfaat penelitian

Untuk memberikan informasi kondisi kerja optimum dari lipase amobil pada esterifikasi glukosa dan asam oleat yang diisolasi dari jamur *Mucor miehei*

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Semua reaksi kimia dapat mencapai suatu kesetimbangan, tetapi laju dari reaksi sering tiba-tiba menurun atau berjalan lebih lambat, untuk mempercepat jalannya reaksi ini sel mengandung substansi yang dinamakan dengan enzim. Enzim merupakan suatu protein yang bekerja pada reaksi kimia. Enzim digunakan sebagai agen katalitik dan kerja enzim spesifik untuk reaksi kimia tertentu tergantung dengan substratnya (Pelczar dan Chan, 1973).

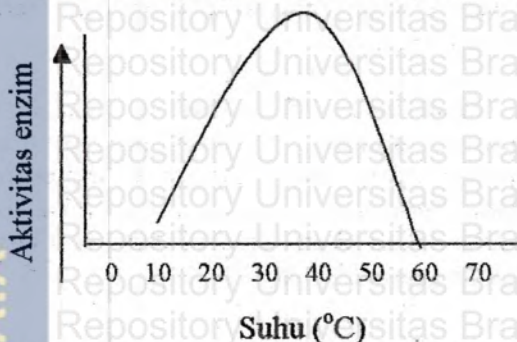
Enzim mempunyai beberapa karakteristik, yaitu (Taggart dan Starr, 1992)

- Enzim tidak ikut mengalami reaksi, tetapi dapat mempercepat reaksi.
- Molekul enzim bersifat tidak permanen dalam suatu reaksi
- Setiap enzim memiliki selektifitas terhadap substratnya.
- Enzim dapat dikenali dari reaktan dan produk yang dihasilkan dari suatu reaksi sebagai substratnya.

Enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor dalam mengkatalisa suatu reaksi, diantaranya adalah konsentrasi substrat dan enzim, suhu, pH, kekuatan ionik dan adanya inhibitor.

Pengaruh suhu.

Suhu dapat mempengaruhi suatu reaksi enzim sesuai dengan yang ditunjukkan dengan gambar berikut (Pelczar dan Chan, 1973):



Gambar 2.1 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim.

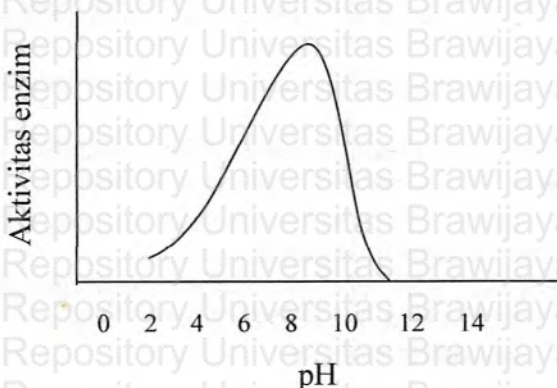




Aktivitas enzim meningkat dengan kenaikan suhu dan akhirnya enzim kehilangan semua aktivitas jika protein menjadi rusak akibat panas. Banyak enzim berfungsi optimal dalam batas-batas suhu antara 25-37 °C.

Pengaruh pH

Aktivitas enzim juga sangat dipengaruhi oleh pH, karena sifat ionik gugus karboksilat dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH ini menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim menjadi berubah, selain itu juga menyebabkan denaturasi enzim dan mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim, sebagaimana yang ada dalam gambar berikut (Pelczar dan Chan, 1973):



Gambar 2.2 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Enzim dapat dipelajari dengan mencari pH optimum terlebih dahulu dengan memakai buffer yang cocok.

Pengaruh konsentrasi substrat dan enzim

Kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai katalisator dalam reaksi itu. Grafik pada Gambar 2.1 terlihat hubungan antara konsentrasi enzim dengan kecepatan reaksi apabila konsentrasi substrat berlebihan, sehingga dapat dilihat bahwa banyaknya substrat ditransformasikan sesuai dengan tingginya konsentrasi enzim yang digunakan (Girindra, 1989):

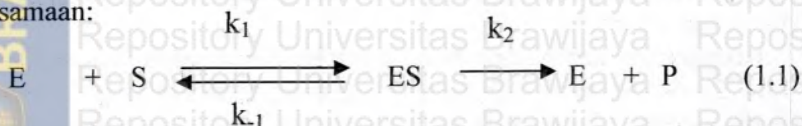
Michaelis menyatakan bahwa reaksi yang dikatalisis oleh enzim pada berbagai konsentrasi substrat mengalami 2 fase, yaitu (1) jika konsentrasi substrat masih rendah, daerah yang aktif pada enzim tidak semuanya terikat dengan substrat dan (2) jika jumlah molekul substrat meningkat maka daerah yang aktif terikat seluruhnya oleh substrat, dan pada saat itu enzim tetap bekerja dengan kapasitas penuh. Dalam pernyataan Michaelis –Menten menyatakan (Campbell, 1994):

$$v = \frac{V_{maks}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

v = kecepatan reaksi enzim dengan kadar substrat $[S]$
 K_m = tetapan Michaelis Menten (mol per liter)
 V_{maks} = kecepatan maksimum enzim

Persamaan diatas dapat diperoleh dengan penjabaran sebagai berikut (Pelchzar dan Chan, 1963):

Pertama, mekanisme reaksi enzim katalis dapat ditulis dengan persamaan:



Persamaan di atas, K_1 adalah konstanta laju reaksi untuk pembentukan kompleks enzim-substrat ES, dari enzim E, dan substrat S, K_{-1} adalah konstanta laju reaksi untuk reaksi penguraian dari ES kompleks menjadi enzim bebas dan substrat, dan K_2 adalah konstanta laju reaksi dari ES kompleks untuk pembentukan produk dan enzim kembali.

Ketika konsentrasi substrat pada proses reaksi adalah $\frac{1}{2}$ dari kecepatan maksimumnya, hal ini disimbolkan dengan K_M , yang dapat diukur dari afinitas enzim terhadap substrat. Laju pembentukan kompleks enzim substrat ES, dapat dituliskan:

$$\text{Laju pembentukan} = \frac{\Delta[ES]}{\Delta t} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (1.2)$$

Dimana $\Delta [ES]/ \Delta t$ maksudnya adalah perubahan konsentrasi kompleks $[ES]$ selama waktu Δt dan K_1 adalah konstanta untuk pembentukan kompleks.

Kompleks ES terurai dalam 2 reaksi, yang pertama adalah terbentuknya kembali enzim dan substrat dan yang kedua adalah terbentuknya produk dan melepasnya enzim kembali. Hal ini dapat dituliskan dengan persamaan:

$$\text{Laju} = -\frac{\Delta[ES]}{\Delta t} = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (1.3)$$

Tanda negatif menunjukkan menurunnya konsentrasi kompleks sebagai kompleks yang terurai.

Menurut teori steady state, laju dari pembentukan kompleks dapat ditulis:

$$\frac{\Delta[E]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[ES]}{\Delta t} \quad (1.4)$$

dan

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (1.5)$$

Jika jumlah konsentrasi enzim total atau $[E]_t$, dianggap sebagai jumlah enzim yang bebas $[E]$ dan yang bergabung dengan substrat $[ES]$, maka konsentrasi substrat:

$$[E] = [E]_t - [ES] \quad (1.6)$$

substitusi untuk konsentrasi enzim bebas $[E]$ ke persamaan 1.5

$$k_1([E]_t - [ES]) \cdot [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (1.7)$$

$$\frac{([E]_t - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad (1.8)$$

dimana K_M adalah konstanta Michaelis. Kemudian dari persamaan 1.8 dapat dicari besarnya konsentrasi kompleks enzim- substrat $[ES]$:

$$\frac{[E]_t \cdot [S] - [ES] \cdot [S]}{[ES]} = K_M$$

$$[E]_t \cdot [S] - [ES] \cdot [S] = K_M \cdot [ES]$$

$$[E]_t \cdot [S] = [ES] \cdot (K_M + [S])$$

atau

$$[ES] = \frac{[E]_t \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1.9)$$

Jika laju untuk terurainya enzim-kompleks ES menjadi enzim yang tidak terjebak dan produk dituliskan:

$$v = k_2 \cdot [ES] \quad (1.10)$$

Disubstitusikan ke persamaan (1.9), maka:

$$V = \frac{k_2 \cdot [E] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1.11)$$

kemudian jika konsentrasi substrat tinggi dan mengalami titik jenuh terhadap enzim ($[E]_t = [ES]$), maka proses reaksi maksimum (V_{maks}) dan disubstitusikan ke persamaan (1.10) menjadi:

$$v = V_{maks} = k_2 \cdot [E]_t \quad (1.12)$$

dimana konsentrasi enzim dalam keadaan konstan

$$V_{maks} = \text{konstan}$$
$$\text{Laju} = k \cdot [E]^0 = k$$

Dan disubstitusikan ke persamaan (1.11), maka hasilnya:

$$V = \frac{V_{maks} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

2.2 *Mucor miehei*

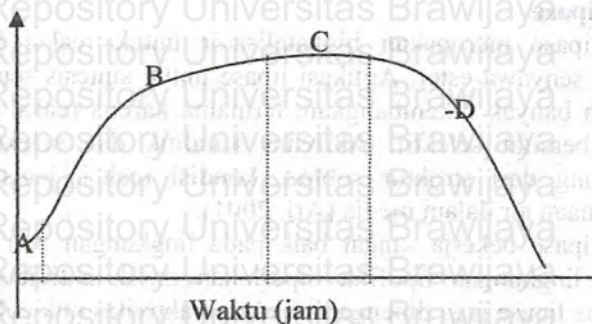
Lipase esterase merupakan enzim turunan dari jamur *Mucor miehei* dengan metode fermentasi, yang sering digunakan dalam makanan. Adapun klasifikasi dari *Mucor miehei* adalah sebagai berikut:

Kelas	:	Phycomycetes
Sub kelas	:	Zygomycetes
Ordo	:	Mucorales
Famili	:	Mucoraceae
Genus	:	Mucor
Spesies	:	<i>miehei</i>

Mucor miehei ini bersifat non patogenik dan non toksik pada manusia dan hewan. Enzim diproduksi dengan proses yang lengkap dari *Mucor miehei* melalui banyak metode antara lain fermentasi, sentrifugasi dan lain-lain (Anonymous, 1983).

Bakteri/jamur dapat diisolasi, dengan mengetahui terlebih dahulu fase pertumbuhan dari bakteri/jamur itu sendiri, karena dengan mengetahui fase pertumbuhan bakteri kita akan tahu kapan bakteri/jamur itu mulai diambil, dimana ada suatu titik tertentu bakteri/jamur memproduksi banyak. Fase pertumbuhan bakteri/jamur memiliki beberapa tahapan, hal ini dapat dilihat pada kurva pertumbuhan berikut ini (Volk, 1988):

Logaritma jumlah sel



Gambar 2.5 Hubungan antara waktu terhadap logaritmik jumlah sel

Keterangan :

- Fase tenggang sel mulai mensintesis enzim-enzim yang dapat dirangsang dan menggunakan cadangan makanan
- Fase pertumbuhan logaritma
- Fase stasioner
- Fase kematian

Fase pertumbuhan logaritma. Fase ini adalah periode pembiakan cepat dan merupakan periode yang didalamnya biasanya teramati ciri khas sel-sel yang aktif. Selama fase inilah waktu generasi tetap tidak berubah bagi setiap jenis. Jika dibuat proyeksi logaritma jumlah organisme terhadap waktu, fase log ini muncul sebagai garis lurus.

Fase stasioner. Sementara biakan menjadi tua dan mendekati populasi bakteri maksimum yang dapat ditunjang medium, laju pembiakan berkurang dan beberapa sel mati. Apabila laju pembiakan sama dengan laju kematian, jumlah keseluruhan bakteri akan tetap.

Fase kematian. Apabila laju kematian melampaui laju pembiakan, maka banyaknya bakteri yang sebenarnya akan menurun dan fase pembiakan ini biasanya bakteri berhenti. Pada jenis-jenis tertentu hal ini mungkin memerlukan waktu berminggu-minggu, berbulan-bulan bahkan mungkin lebih lama lagi sebelum sampai pada fase ini.

2.2.1 Lipase

Lipase merupakan biokatalisator untuk reaksi hidrolisis dan sintesis senyawa ester. Aplikasi lipase untuk sintesis senyawa organik semakin banyak dikembangkan, terutama karena reaksi menggunakan enzim bersifat selektif. Aktivitas katalitik dan selektivitas enzim, tergantung dari struktur substrat, kondisi reaksi, jenis pelarut, dan penggunaan air dalam media (Ari, 2001).

Lipase bekerja sangat baik pada lingkungan non polar, karena sebuah lingkungan lipofilik diperlukan untuk aktivitas katalitiknya. Aktivitas lipase juga dipengaruhi adanya aktivitas nukleofilik H₂O yang memungkinkan terjadinya esterifikasi, trans-esterifikasi, dan reaksi-reaksi pembentukan ikatan amida.

Lipase dapat diperoleh melalui distribusi semua sel hidup bakteri, mikroorganisme eukariotik, tumbuhan tingkat tinggi dan rendah, dan hewan. Lipase mikroba dihasilkan oleh *Mucor termofilik* yaitu spesies *Mucor miehei* yang merupakan produsen 1,3 lipase dengan biaya murah. Salah satu metode isolasi dan amobilisasi lipase *Mucor miehei* adalah dengan kromatografi penukar ion. Pembawa inert yang digunakan yaitu alumina dan resin anion lemah berupa dietil aminetil (DEAE) dan didapatkan kondisi lipase yang optimum pada pH 4-7, suhu (20-80) °C, untuk berikatan dengan resin (Fidelman, 1987). Kebanyakan lipase mempunyai pH optimum alkali antara 8-9. Beberapa lipase mikroba memilih lebih banyak ion hidrogen yang mempunyai pH optimum 5-6. Temperatur optimumnya adalah (30-40) °C, tetapi kebanyakan enzim menghentikan katalisis pada -10°C karena substrat-substrat cair menjadi padatan es.

Lipase mempunyai sisi kenal antar permukaan yang menyebabkan terjadinya pengikatan pada permukaan substrat. Apabila terdapat muatan-muatan sterik pada substrat, terjadilah muatan konformasi pada lipase untuk mentimulasi sisi aktif. Lipase berperan sebagai esterase-estrase karboksilat sederhana yang mempunyai titik ikat khusus yang memungkinkan untuk mengikat lemak dan kemudian terpasang pada sisi aktif.

2.3 Amobilisasi Enzim

Penggunaan enzim mikrobiologi telah digunakan secara besar-besaran mengikuti perkembangan dari teknologi amobilisasi enzim, dalam hal ini enzim diikat atau diamobilis dalam sebuah material seperti paper, wood chip, gel, dan resin penukar ion. Sebuah larutan

dari substrat untuk enzim ketika diikatkan melalui material, enzim amobil mengkatalisis dari substrat untuk menghasilkan produk yang diinginkan. Teknologi enzim ini memiliki beberapa keuntungan diantaranya (Krieg, 1993) :

1. Enzim dapat digunakan secara kontinu, sejak enzim dalam solid material.
2. Produk akhir dari hasil reaksi biasanya lebih baik dan murni karena tidak mengandung enzim.

Ada beberapa metode dalam amobilisasi enzim, diantaranya adalah metode ikatan carrier, metode ikatan kovalen, metode penjebaran (Chibata, 1978). Pada percobaan ini digunakan metode penjebaran karena metode ini lebih mudah dan murah. Metode penjebaran adalah suatu teknik yang secara ekstensif digunakan oleh Bernfeld dan Wan awal 1963 dengan menggunakan carrier poliakrilamid (Bernart dan Ventasubramanian, 1987).

Metode penjebaran terdapat 2 tipe yaitu tipe kisi dan tipe mikro kapsul (Chibata, 1978):



Gambar 2.7 Tipe kisi dan tipe mikro kapsul

Tipe Kisi

Enzim dijebak dalam matrik gel berikatan silang. Gel penjebak yang digunakan merupakan suatu jalinan polimer yang dibentuk dari prekursor monomer, oligomer, atau polimer itu sendiri dengan mengubah pelarut, suhu, kekuatan ion, dan pH lingkungan reaksi sehingga terbentuk reaksi ikatan silang pada prekursor (Kennedy, 1985).

Tipe Mikro kapsul

Enzim dibuat amobil dalam bentuk kapsul berukuran mikro yang dibuat dari polimer organik. Membran kapsul dibuat semipermeabel terhadap substrat maupun produk. Metode ini terbatas pada enzim yang

substratnya berukuran relatif kecil sehingga dapat berdifusi melalui membran kapsul (Suhartono, 1989).

Carrier yang digunakan umumnya adalah alginat dan poliakrilamid selain pati, kolagen, dan karet silikon. Penjebakan dengan Na-Alginat merupakan metode yang paling sederhana untuk amobilisasi dan telah digunakan secara luas dalam laboratorium dan proyek-proyek studi yang melibatkan konstruksi reaktor untuk degradasi limbah (Chetaam dan Bucke, 1979).

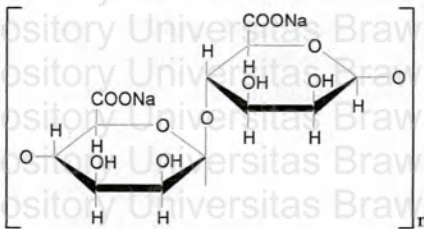
Amobilisasi dilakukan dengan meneteskan larutan enzim dan Na-alginat pada larutan CaCl_2 sehingga diperoleh enzim yang terjebak dalam Ca-alginat. Tingkat porositas dan efektifitas metode amobilisasi enzim bergantung pada konsentrasi polimer, ion logam penangkap dan konsentrasi enzim sendiri. Kekuatan gel akan meningkat dengan kenaikan konsentrasi Na-alginat dan CaCl_2 (Suhartono, 1989).

Bentuk enzim amobil diklasifikasikan menjadi 4 tipe yaitu manik (partikel), membran (film, plat), pipa dan serat, namun kebanyakan dibuat dalam bentuk manik dengan pertimbangan mudah ditangani. Carrier yang cocok untuk amobilisasi secara komersial umumnya tersedia dalam bentuk manik lebih besar dan efisiensi kerja lebih tinggi (Chibata, et al., 1978).

2.3.1 Amobilisasi enzim dengan Na-alginat

Alginat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) merupakan salah satu dari gum yaitu senyawa yang tergolong dalam polisakarida atau senyawa turunannya yang dapat terhidrasi dalam air panas atau air dingin membentuk larutan viskous atau dispersi. Alginat tersusun dari asam D-manuronat dan asam L-guluronat (Othmer, 1987).

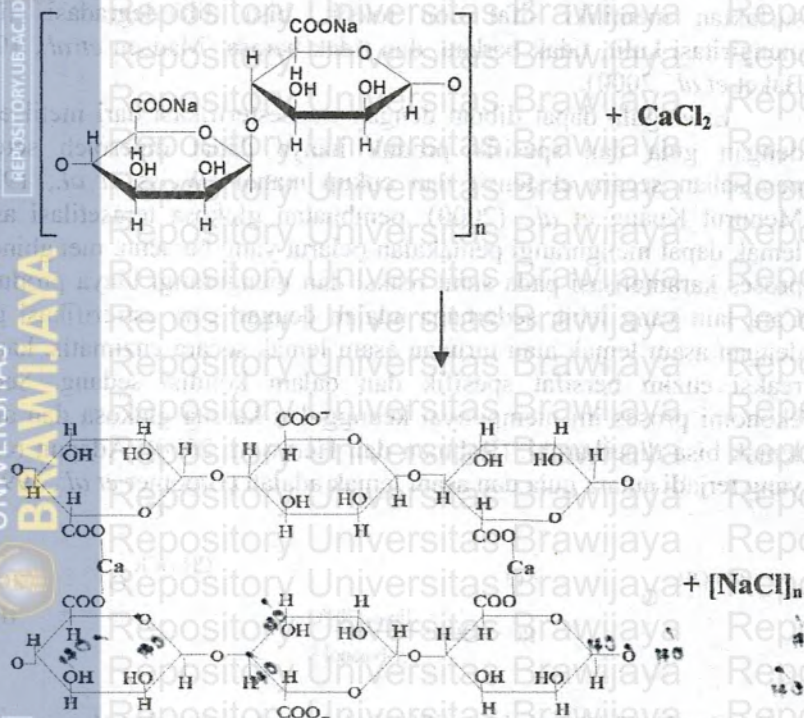
Struktur molekul alginat adalah sebagai berikut (Buckingham, 1983) :



Gambar 2.8 Struktur Na-alginat



Gel Ca-alginat akan terbentuk oleh kation kalsium dari CaCl_2 bereaksi dengan monovalen anion karboksilat alginat yang akan membentuk jaringan tiga dimensi menurut reaksi sebagai berikut (Glicsman, 1982) :



Gambar 2.9 Reaksi Pembentukan Gel Ca-Alginat

2.4 Ester Gula dari Glukosa Dan Asam Lemak

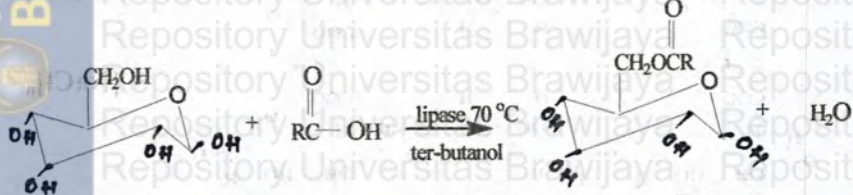
2.4.1 Ester Gula

Ester gula merupakan senyawa sintetik dan sangat jarang ditemui di alam. Gula yang diesterifikasi dengan asam lemak rantai panjang dapat berfungsi sebagai surfaktan (Kosaric, 1993). Surfaktan adalah kependekan dari *Surface active agent*, yang maksudnya adalah aktif pada permukaan. Surfaktan dibagi beberapa kelompok yaitu, anionik, kationik, non-ionik, dan zwitterions. Ester gula merupakan surfaktan tipe non-ionik, karena pada salah satu ujungnya mempunyai gugus poli hidroksil sebagai group polar. Group polar ini merupakan gugusan dari

golongan karbohidrat (monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida) (Anonymous, 1987).

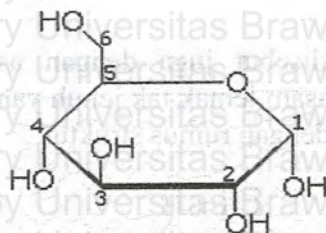
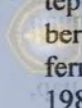
Karbohidrat jumlahnya sangat melimpah di alam, dapat diperbarui, dan sifat dasar produknya dimana salah satunya adalah surfaktan memiliki sifat non toksik, bisa diiodegradasi, tidak mengiritasi kulit, tidak berbau, dan tidak berasa (Madsen *et al.*, 1996; Baket *et al.*, 2000).

Ester gula dapat dibuat dengan transesterifikasi dari metil ester dengan gula dan spesifik produk hanya dapat diperoleh setelah pemisahan secara ekstensif dan cukup mahal (Weiss *et al.*, 1972). Menurut Kuang *et al.*, (2000), pembuatan glukosa terasetilasi asam lemak dapat mengurangi pemakaian pelarut yang beracun, menghindari proses karamelisasi pada suhu reaksi dan mengurangi biaya produksi. Cara lain yang lebih sederhana adalah dengan cara esterifikasi gula dengan asam lemak atau turunan asam lemak secara enzimatik, karena reaksi enzim bersifat spesifik dan dalam kondisi sedang. Secara ekonomi proses ini mempunyai keunggulan karena glukosa dan asam lemak bisa diperbarui. (Rahman dan Herawan, 2000). Adapun reaksi yang terjadi antara gula dan asam lemak adalah (Bloomer *et al.*, 1992):



Gambar 2.10 reaksi esterifikasi glukosa dan asam lemak

Sifat fisiko-kimia dari surfaktan sangat penting untuk menentukan nilai ekonomi surfaktan. Salah satu karakteristik penting dari surfaktan adalah kemampuan dari surfaktan untuk mereduksi tegangan permukaan dan antar muka dari air dan minyak, sebagai pengukur digunakan metode Du-Nouy (Kosaric, 1993 ; Lin, 1996). Salah satunya yang secara luas digunakan untuk evaluasi aktivitas surfaktan adalah *Critical Micelle Consentration* (CMC). Nilai CMC merupakan konsentrasi terendah yang diperlukan untuk mencapai nilai tegangan permukaan atau antar muka terendah (Lin, 1996).



Gambar 2.12 Struktur Glukosa

Glukosa dengan berat molekul 180.18 adalah heksosa monosakarida yang mengandung enam atom karbon. Glukosa merupakan aldehyd (mengandung gugus CHO). Lima karbon dan satu oksigennya membentuk cincin yang disebut cincin piranosa, bentuk paling stabil untuk aldosa berkarbon enam. Dalam cincin ini tiap karbon terikat pada satu gugus hidroksil dan hidrogen kecuali cincin kelimanya yang terikat pada atom keenam diluar cincin membentuk suatu gugus CH_2OH . (Fessenden and Fessenden, 1999).

Glukosa adalah kristal berwarna atau bubuk putih, tidak berbau, rasanya manis, dengan densitas 1.544, mp 146 °C, larut dalam air dan sedikit larut dalam alkohol. Glukosa dapat diperoleh dengan hidrolisis tepung jagung dengan asam dan dari sari buah-buahan. Glukosa berguna dalam industri makanan dan minuman, sumber metan dengan fermentasi anaerobik, obat-obatan, dan industri makan bayi (Hawleys, 1989).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan April sampai dengan Juli 2005.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel jamur *Mucor miehei* diperoleh dari Laboratorium Pangan dan Gizi dari Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

3.3 Bahan-bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : kentang (perdagangan), dekstrosa, ekstrak yeast, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ZnSO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH, asam oleat, n-butanol, kloroform, fenolftalin 1 %, asam sitrat, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , glukosa, CaCl_2 , semua bahan di atas berkualitas p.a kecuali kertas saring, pepton (for biochemistry), nutrien agar (For biochemistry), dan alginat (for biochemistry).

3.4 Alat-alat Penelitian

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam percobaan ini adalah sebagai berikut: alat gelas, jarum ose, sentrifuge dengan merek Juam MR 1882, neraca analitik Mettler AE 25, pH meter merek Schott-Gerate tipe C6-820, pengaduk magnet, autoclave model no. 25x American, spektrometer IR, dan tensiometer Du-Nuoy.

3.5 Metode Percobaan

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa isolasi dan amobilisasi enzim lipase dari *Mucor miehei* dengan perlakuan variasi suhu : 40; 45; 50; 55 dan 60 °C, dan waktu inkubasi 8; 16; 24; 32 dan 40 jam. Rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiap perlakuan dilakukan 3 kali. Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan media padat
2. Penanaman biakan murni
3. Pembuatan media cair untuk produksi enzim
4. Pembuatan inokulum



MILIK
PERPUSTAKAAN
Universitas Brawijaya



5. Pembuatan kurva pertumbuhan
6. Produksi enzim
7. Isolasi ekstrak kasar lipase
8. Pemurnian
9. Amobilisasi lipase dengan carrier Na-Alginat
10. Penentuan Kadar Protein
11. Uji aktivitas lipase amobil
12. Karakterisasi lipase amobil dengan variasi suhu dan waktu inkubasi dimana masing-masing variasi dibuat grafik hubungan dengan aktivitas enzim.
13. Identifikasi glukosil oleat

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Pembuatan Media Padat

Media yang digunakan adalah agar dekstrosa kentang (PDA) dengan komposisi kentang 200 gr, dekstrosa 20 gr, Agar 15 gr, dan akuades 1000 mL.

Kentang yang sudah dipotong kecil-kecil direbus dalam akuades selama 1 jam kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat ditambah dekstrosa dibantu dengan pemanasan hingga larut. Larutan didinginkan dan ditambah asam sitrat 10 mL untuk mendapatkan pH 5, kemudian pH dikondisikan dengan menggunakan larutan buffer sitrat fosfat pH 5. Agar ditambahkan dalam larutan, sambil dipanaskan sampai mendidih. Larutan diatas dipipet 5 mL dimasukkan ke dalam tabung, disterilkan dalam autoclave pada 121°C, 15 psi selama 15 menit, selanjutnya dibiarkan memadat sambil dimiringkan (Erika, 2002).

3.6.2 Penanaman Biakan Murni

Kapang dari biakan dipindahkan secara aseptis sebanyak 1 mata ose ke dalam media padat steril (hasil percobaan 3.6.1) yang masih kosong. Selama perlakuan mulut tabung disterilkan di atas pembakar bunsen. Selanjutnya diletakkan dalam inkubator pada suhu 40°C selama 4 hari (Erika, 2002).

3.6.3 Pembuatan Media Cair untuk Produksi Lipase

Media pertumbuhan *Mucor miehei* untuk menghasilkan lipase terdiri atas : pepton 10 gr, ekstrak yeast 5 gr, NaCl 5 gr, dekstrosa 10 gr, KH₂PO₄ 13,40 gr, K₂HPO₄ 16,8 gr, MgSO₄.7H₂O 0,5gr, dilarutkan dalam 1 L akuades dengan larutan aktivator 1,00 mL dan asam oleat

dan asam oleat 10,00 mL. Kondisi pH diatur hingga 5 dengan memakai larutan asam sitrat/NaOH dan ditambah larutan buffer sitrat fosfat pH 5, kemudian disterilkan dalam autoclave pada 121°C, 15 psi selama 15 menit (Erika, 2002).

3.6.4 Pembuatan Inokulum

Kapang yang telah tumbuh dalam media padat miring (hasil percobaan 3.6.2) beumur 4 hari ditambahkan dengan akuades steril sebanyak 20 mL kemudian dikocok. Suspensi spora ini berfungsi sebagai inokulum (Erika, 2002).

3.6.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan hubungan antara logaritma berat kering miselium dan spora dengan waktu pertumbuhan (jam). Pertumbuhan sel diukur berdasarkan berat kering miselium dan spora yang berwarna coklat. Adapun perlakuan sebagai berikut: 16 tabung sentrifuge berisi larutan inokulum sebanyak 1 mL ditambah 10 mL media cair (percobaan 3.6.3) dan diletakkan diatas shaker pada suhu ruang dengan kecepatan ± 150 rpm. Pengamatan terhadap pertumbuhan *Mucor miehei* dilakukan dengan mengambil 1 tabung sentrifuge setiap 12 jam sampai hari kedua, setiap 4 jam sampai jam ke 96, dan dituang ke dalam loyang kemudian dikeringkan dalam oven pada 110 °C selama 8 jam hingga berat konstan. Pengamatan pertama dilakukan dengan mengambil miselium dari kultur sebelum ditempatkan pada shaker (Erika, 2002).

3.6.6 Produksi Enzim

Sebanyak 600 mL media cair dibagi 2 bagian dan masing-masing dituang ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian disterilkan dengan autoclave pada 121 °C, 15 psi selama 15 menit. Media didinginkan kemudian ditambah 30 mL larutan inokulum secara aseptis dan diinkubasai pada suhu kamar hingga pada jam ke-72 berdasarkan kurva pertumbuhan (lampiran 1).

3.6.7 Isolasi Ekstrak Kasar Enzim Lipase

Untuk isolasi enzim tiap erlenmeyer (hasil percobaan 3.6.6) ditambah larutan asam sitrat/NaOH untuk mengatur pH 5, kemudian ditambah 75 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5 sebagai pengekstrak, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4° C

selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar lipase (Erika, 2002).

3.6.8 Pemurnian Ekstrak Kasar Lipase

Ekstrak kasar enzim dimurnikan menggunakan ammonium sulfat dengan fraksi pengendapan 0-60 %. Caranya adalah sebanyak 78 gram ammonium sulfat dicampurkan dalam 200 mL larutan ekstrak kasar lipase lalu diaduk hingga ammonium sulfat larut semua. Selanjutnya disentrifuge pada 10.000 rpm, suhu 4 °C selama 20 menit. Semua endapan yang terbentuk dilakukan dialisis yaitu dengan menambahkan 25 mL buffer sitrat fosfat pH 5 dan dimasukkan dalam kantong selofan. Kemudian direndam dalam 500 mL buffer sitrat fosfat 0,07 M pH 5 dalam beaker glass 600 mL sambil diaduk menggunakan magnetik stirer dalam suasana dingin. Dialisis dilakukan selama 5 jam. Kemudian larutan buffer perendam diganti dengan buffer sitrat fosfat 0,03 M pH 5 sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan cara 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 mL HCL 0,1 M dan ditambah beberapa tetes BaCl₂ 0,1 M. Apabila tidak ada endapan dialisis dihentikan (Priyati, 1996)

3.6.9 Amobilisasi Lipase

Amobilisasi ekstrak kasar lipase dilakukan dengan kondisi kerja yaitu perbandingan enzim : Na-alginat (1:4) dalam larutan CaCl₂ 0,2 M dan Na-Alginat 2,5 % (Sundari,1996). Sebanyak 20 mL Na-Alginat ditambah 5 mL enzim dan diaduk dengan menggunakan magnetik stirer. Campuran enzim dan Na-Alginat ini diteteskan dengan syringe 10 mL pada gelas beaker 200 mL yang berisi 50 mL larutan CaCl₂ 0,1 M sambil diaduk dengan pengaduk magnet. Kemudian gel yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl₂ selama 1 jam untuk mengeraskan gel. Gel dipisahkan dari larutan dengan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh enzim amobil. Setelah itu dilakukan pencucian menggunakan akuades sebanyak 100 mL, dan filtrat merupakan campuran larutan CaCl₂ yang mengandung enzim yang tidak terjebak. Gel dapat disimpan dalam lemari es di dalam larutan buffer fosfat pH 5. Selanjutnya pada campuran larutan CaCl₂ (filtrat) dilakukan pengukuran jumlah enzim yang tidak terjebak dengan metode biuret seperti pada percobaan 3.6.10 (Priyati, 1996)

3.6.10 Penentuan Kadar Protein

3.6.10.1 Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase Bebas

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode biuret. Sebanyak 2 mL enzim ditambah 8 mL reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum BSA. Kadar protein enzim lipase diketahui dengan mengkalibrasikannya dengan kurva standar BSA (Priyati, 1996).

3.6.10.2 Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase Amobil

Untuk menentukan kadar protein enzim lipase hasil amobilisasi, maka yang ditentukan kadar proteinnya adalah filtrat dari enzim amobil setelah penyaringan. Jadi yang terukur adalah kadar protein enzim lipase yang tidak terjebak.

Filtrat yang telah diketahui volumenya, diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL BSA 10000 ppm dan 8 mL reagen biuret. Diukur serapannya pada panjang gelombang BSA. Kadar proteinnya diperoleh dengan mengkalibrasikannya pada kurva standar BSA, dan disebut sebagai C1. Sebagai pembanding, maka diambil 1 mL ditambah 1 mL air dan 8 mL reagen biuret. Dikocok dan didiamkan 30 menit dan diukur serapannya. Hasilnya dikalibrasikan pada kurva standar BSA, dan disebut C2. Blankonya berupa campuran 2 mL air dan ditambah 8 mL reagen biuret.

Kadar protein tidak terjebak dapat diketahui dengan mencari selisih C1 dan C2 (Priyati, 1996).

Kemudian kadar protein enzim lipase amobil ditentukan dengan rumus:

$$\text{KPEA} = \frac{(\text{vol enzim} \times \text{KPEB}) - (\text{vol pengenceran filtrat} \times \text{KPET})}{\text{berat gel}}$$

Dimana:

KPEA : Kadar protein enzim lipase amobil

KPEB : Kadar protein enzim lipase (bebas) hasil isolasi

KPET : Kadar protein enzim lipase enzim yang tidak terjebak
 $2(C1 \times C2)$

3.6.11 Uji aktivitas Enzim Lipase Amobil

Glukosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (Rahman dan Hermawan, 2000). Dicampurkan dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian ditambah dengan pelarutnya yaitu n-butanol sebanyak

larutan campuran tersebut. Larutan dikocok dalam shaker dengan kecepatan 125 rpm selama 16 jam, setelah itu larutan ditambah dengan 3 tetes indikator fenolftalin 1 % dan dititrasi dengan NaOH 0.203 M hingga terjadi perubahan warna dari putih menjadi merah jambu dan tak hilang selama 30 detik (Fadiloglu dan Soylemez, 1998).

3.6.12 Penentuan Kondisi Optimum Lipase Amobil dengan Variasi: suhu, dan waktu inkubasi

Penentuan suhu optimum.

Dari prosedur (3.6.11) dilakukan penentuan suhu optimum dengan metode yang sama dengan variasi suhu yaitu : 40; 45; 50; 55 dan 60 °C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm sehingga diperoleh suhu optimum.

Penentuan waktu inkubasi optimum.

Dari prosedur (3.6.11) dilakukan penentuan waktu inkubasi optimum dengan metode yang sama dan dibedakan pada variasi waktu inkubasi yaitu: 8; 16; 24; 32 dan 40 jam pada suhu optimum dengan kecepatan 150 rpm sehingga diperoleh waktu inkubasi maksimum.

3.6.13 Identifikasi ester gula (data pendukung)

Glukosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 dicampurkan dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian ditambah dengan pelarutnya yaitu n-butanol sebanyak 50 % dari larutan substrat dan ditambah lipase amobil 10 % dari larutan. Lalu dishaker dengan kecepatan 150 rpm pada kondisi optimum. Pada akhir reaksi enzim dipisahkan dengan cara filtrasi dan pelarutnya dievaporasi.

Asam oleat yang tidak bereaksi dan produk dilarutkan dengan kloroform. Gula yang tidak bereaksi difiltrasi. Kemudian dimurnikan dengan menambahkan silika gel 60 sebanyak 20 gr pada campuran asam oleat yang tidak bereaksi dan produk esterifikasi yang larut dalam kloroform. Kloroform kemudian diuapkan dalam evaporator vakum.

Silika gel yang mengandung asam oleat dan produk dielusi dengan kloroform untuk memisahkan asam lemak dari produk., kemudian dielusi dengan kloroform/metanol/air 64/10/1 (v/v/v) untuk mendapatkan ester glukosa dari silika gel. Terakhir pelarut diuapkan dibawah tekanan untuk memperoleh produk. Produk dikristalisasi dengan menambahkan aseton hangat (40 °C) dan dibiarkan semalam dalam refrigerator (Rahman dan Hermawan, 2000). Untuk mengetahui adanya ester diukur dengan Spektrofotometer Inframerah.

dalam refrigerator (Rahman dan Hermawan, 2000). Untuk mengetahui adanya ester diukur dengan Spektrofotometer Inframerah.

3.6. 15 Analisa Data

Data pengaruh pH, temperatur dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim lipase amobil dianalisis dengan menggunakan analisis ragam satu arah yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana.

Tabel 1. Tabel Analisa Data

Perlakuan	Ulangan			Total
X1	Y1.1	Y1.2	Y1.3	$\sum_{j=1}^n Y_{ij} = Y_1$
X2	Y2.1	Y2.2	Y2.3	$\sum_{j=1}^n Y_{ij} = Y_2$
X3	Y3.1	Y3.2	Y3.3	$\sum_{j=1}^n Y_{ij} = Y_3$

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p}$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat

A. Jumlah Kuadrat total (JK_T)

$$= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$

B. Jumlah Kuadrat perlakuan (JK_p)

$$= \left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right] - FK$$

C. Jumlah Kuadrat galat percobaan (JK_G) = JK_T - JK_p

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$A. \text{ Kuadrat Tengah}_{\text{perlakuan}} (KT_P) = \frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}}$$

$$B. \text{ Kuadrat Tengah}_{\text{galat percobaan}} (KT_G) = \frac{JK_{GP}}{db_{\text{percobaan}}}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KT_P}{KT_G}$$

Setelah jumlah kuadrat total, perlakuan, dan galat hitung diketahui, maka dapat dibuat tabel analisis seperti yang diperlihatkan pada tabel 2.

Tabel 2. Tabel Analisis Ragam 1 Arah

No	Sumber keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}	
						5%	1%
1	Perlakuan	p-1	JK _P	KT _P	KT _P / KT _G		
2	Galat	p(n-1)	JK _G	KT _G			
3	Total	(pn)-1	JK _T				

Keterangan:

p = banyaknya perlakuan

n = banyaknya ulangan

dB = derajat bebas

Y_{ij} = aktivitas lipase

Untuk menghitung beda nyata tiap perlakuan, maka dibuat hipotesis nol, statistik (H₀) dan hipotesis statistik (H₁) sebagai berikut:

H₀: tidak ada pengaruh perlakuan terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan

H₁: minimal I pasang pengaruh menunjukkan perbedaan

Jika F_{hitung} > F_{tabel} maka H₀ ditolak, berarti ada perbedaan nyata antar perlakuan dan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT).



1. Menentukan BNT $t_{(\alpha/2; dB)}$

$$BNT_{\alpha} = t_{(\alpha/2; dB)} \times \sqrt{\frac{2KT_G}{n}}$$

2. Menghitung beda rata-rata antar perlakuan

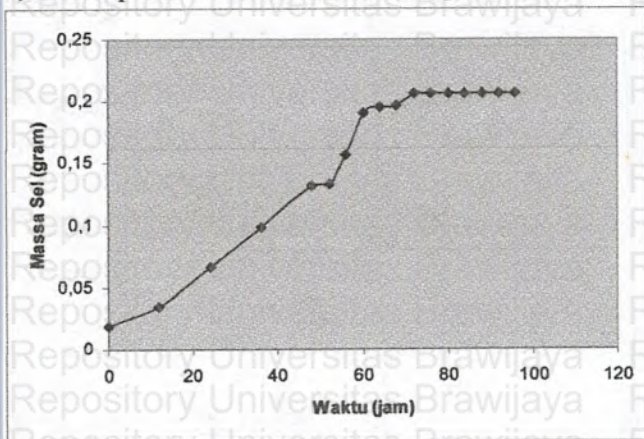
3. Menarik kesimpulan

- a. Jika $BNT(\alpha) > (XA - XB)$ berarti ada beda nyata
 b. Jika $BNT(\alpha) < (XA - XB)$ berarti tidak berbeda nyata

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Amobilisasi Lipase dalam Ca-Alginat

Lipase *Mucor miehei* diisolasi terlebih dahulu sebelum diamobilkan dalam Ca-Alginat. Lipase diisolasi pada awal fase stasioner yaitu pada jam ke 72, hal ini ditunjukkan pada Gambar 4.1, terlihat bahwa pertumbuhan *Mucor miehei* mencapai pertumbuhan yang cepat pada jam tersebut. Pada fase logaritmik ini sel-sel akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial sampai mencapai jumlah maksimal, karena persediaan nutrisi dan oksigen masih cukup tersedia.



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *Mucor miehei*

Lipase *Mucor miehei* diisolasi dengan menggunakan buffer sitrat fosfat pH 5 sebanyak 10 % media cair yang berfungsi sebagai penstabil enzim, dimana menurut Reed, 1975 menyatakan kestabilan lipase yang berasal dari kapang yaitu pada kisaran pH 2,2-10.

Isolasi enzim dilakukan pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pemakaian sentrifuse dingin untuk menghindari kerusakan enzim karena panas selama proses isolasi. Ekstrak kasar lipase merupakan ekstraseluler enzim yang terdispersi pada supernatannya.

Lipase yang diperoleh, kemudian diamobilisasi dengan Ca-alginat menggunakan metode penjebakan. Metode penjebakan ini terjadi antara enzim dan permukaan matriks dari Ca-alginat karena enzim terjebak dalam kisi-kisi ikatan silang penjebakannya.

Menurut Goel, (1994), pada saat enzim diamobilisasi oleh sebuah permukaan kemungkinan menurunnya aktivitas enzim pasti akan terjadi, hal ini disebabkan lingkungan enzim amobil secara drastis berbeda dengan lingkungan enzim dalam keadaan bebas. Berdasarkan perhitungan besarnya aktivitas spesifik enzim bebas sebesar 1082,081 unit/g, sedangkan besarnya aktivitas lipase amobil adalah 793,125 unit/g.

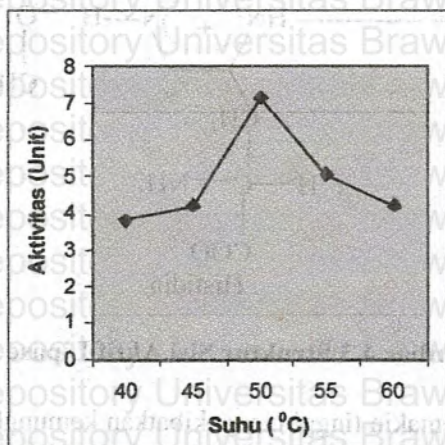
Kekuatan gel akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi Na-alginat. Berdasarkan penelitian dari (Priyati,1996), aktivitas enzim terbesar adalah pada perbandingan antara enzim dan Na-alginat 1:4, sehingga pada penelitian ini digunakan 10 mL enzim murni dengan 40 mL larutan Na-alginat 2,5 %.

4.2 Penentuan Kondisi Optimum Lipase Amobil

Untuk mengetahui kondisi kerja optimum lipase amobil dilakukan dengan cara pengukuran aktivitas lipase amobil pada variasi suhu dan waktu inkubasi.

4.2.1 Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum lipase amobil dilakukan dengan variasi suhu 40; 45; 50; 55; dan 60 °C. Menurut (Arcos, *et al*, 1998) lipase untuk esterifikasi jika lebih dari 60 °C akan mengalami deaktivasi suhu.

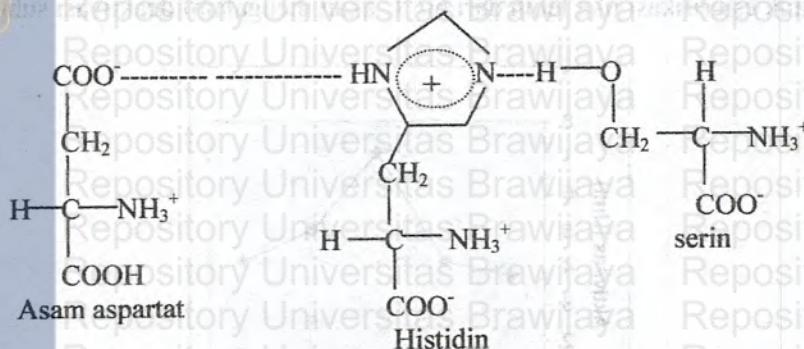


Gambar 4.2 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Lipase Amobil

Aktivitas lipase meningkat seiring dengan kenaikan suhu disebabkan karena tumbukan antara enzim dan substrat makin besar, sehingga kompleks enzim substrat yang terbentuk semakin banyak pula (Murray, 1997). Kenaikan ini dapat dilihat pada Gambar 4.3, dimana dari suhu (40-50) °C suhu semakin naik.

Berdasarkan grafik pada Gambar 4.3 dan analisis ragam (lampiran 7), tampak bahwa pada suhu 50 °C aktivitas lipase amobil mencapai titik optimum dengan aktivitas lipase sebesar 7,154 unit dan dengan uji BNT 5% (lampiran 7) menunjukkan bahwa variasi suhu memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas lipase amobil. Pada suhu optimum yaitu suhu 50 °C, energi yang dihasilkan cukup untuk mempercepat gerak molekul-molekul enzim berinteraksi dengan molekul-molekul substrat sehingga mampu membawa kompleks enzim-substrat pada keadaan transisi yang memiliki energi lebih tinggi daripada keadaan sebelumnya (Montngomery, 1970).

Aktivitas lipase diatas suhu 50 °C mulai menurun. Struktur protein mempengaruhi aktivitas enzim, jika struktur ini terganggu aktivitas akan berubah. Lipase memiliki tiga jenis asam amino pada gugus aktifnya yang berperan dalam proses katalitiknya, yaitu asam aspartat, serin dan histidin. Adapun gambar struktur lipase adalah sebagai berikut (Wong, 1995):



Gambar 4.3 Struktur Sisi Aktif Lipase

Suhu yang semakin tinggi mengakibatkan kemungkinan rusaknya sebagian struktur sekunder dan tersier dari enzim. Ikatan yang membentuk ikatan sekunder adalah ikatan hidrogen antara oksigen karbonil dengan hidrogen dari amida dari rantai polipeptida. Ikatan

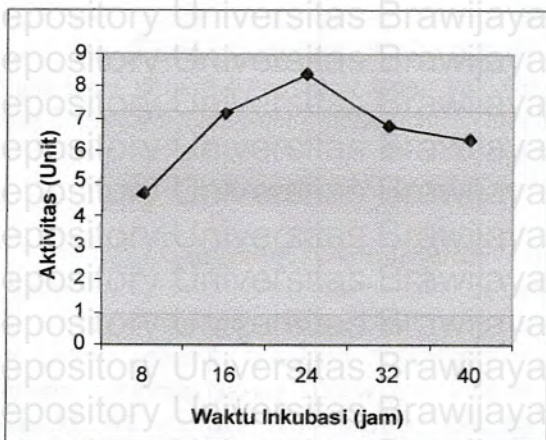
yang membentuk struktur tersier adalah ikatan elektrostatik, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi hidrofilik dan ikatan sulfida. Ikatan - ikatan tersebut dapat terputus oleh suhu yang semakin besar dan seluruh molekul protein akan membuka (denaturasi protein) yang menyebabkan pusat aktif enzim berubah bentuk menjadi tidak aktif untuk mengkatalisis substrat (Montgomery, 1970).

4.2.2 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Dalam mengkatalisis suatu reaksi enzim juga dipengaruhi oleh waktu reaksi enzimatis. Waktu reaksi enzimatis adalah waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat membentuk produk. Untuk menentukan waktu reaksi enzimatis optimum enzim lipase amobil digunakan variasi waktu 8, 16, 24, 32, dan 40 jam. Variasi waktu ini didasarkan pada penelitian (Rahman dan Hermawan, 2000), dimana diperoleh waktu inkubasi optimumnya adalah 24 jam.

Penelitian pada enzim lipase amobil didapatkan waktu inkubasi optimum sebesar 24 jam seperti terlihat pada Gambar 4.4. Waktu kurang dari 24 jam aktivitas enzim belum maksimal karena reaksi antara enzim dengan substrat belum optimum sehingga produk yang dihasilkan masih sedikit. Semakin lama waktu reaksi enzimatis makin banyak produk ester yang terbentuk, yang juga semakin besar aktivitas enzim. Pada jam ke 24 enzim lipase amobil mencapai kondisi optimum, hampir seluruh substrat dapat bereaksi dengan enzim lipase yang berada dalam kisi-kisi matriks alginat, membentuk kompleks enzim-substrat dan menghasilkan produk yang maksimal. Namun setelah jam ke 24 aktivitas enzim menurun. Penurunan aktivitas enzim ini disebabkan karena enzim lipase amobil dimungkinkan telah jenuh dengan produk, sehingga tidak ada lagi reaksi antara substrat dengan enzim (Edwards, 1987). Sebagaimana ditunjukkan pada Tabel L.6.2 Lampiran 6 dimana pada jam ke 32 dan 40 selisih NaOH yang didapatkan relatif konstan dengan waktu yang semakin besar maka aktivitas enzim menurun (rumus aktivitas Lampiran 5).





Gambar 4.4 Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Lipase Amobil

Berdasarkan hasil uji statistik dengan metode Rancangan Acak Lengkap (lampiran 5) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang sangat nyata dari perlakuan variasi waktu inkubasi, karena F_{hitung} lebih besar daripada F_{tabel} . Uji beda nyata terkecil (BNT) juga menunjukkan bahwa pengaruh 24 jam berbeda nyata terhadap pengaruh waktu 40, 32, 16, dan 8 jam. Sehingga dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi optimum untuk pembentukan ester ini adalah 24 jam.

4.3 Identifikasi Ester Gula (data pendukung)

Untuk mendukung keberadaan ester yang terbentuk dilakukan analisis dengan menggunakan spektrofotometer Inframerah. Analisis spektrofotometri inframerah dilakukan dengan membandingkan spektra dari asam oleat dan glukosa dengan ester hasil reaksi antara keduanya yang diukur dengan spektrofotometer inframerah yang sama. Berdasarkan spektra tersebut menunjukkan bahwa pada senyawa hasil esterifikasi muncul beberapa puncak yang khas sesuai dengan gugus fungsi yang ada pada ester gula seperti yang ditunjukkan pada Gambar L.8.1 lampiran 8.

Tabel 4.1 spektra inframerah (Jones, 1997)

Gugus fungsional	Asam Oleat	Glukosa	Glukosil oleat
C=O	1720,19 cm ⁻¹	-	1727,91 cm ⁻¹
C-O-C		1018,23 cm ⁻¹	1095,37 cm ⁻¹
OH	3247,54 cm ⁻¹ (lebar, medium)	3394,10 cm ⁻¹ (lebar, tajam)	3424,96 cm ⁻¹ (lebar, tajam)
C-C	1450,21 cm ⁻¹ (panjang)	1450,21 cm ⁻¹ (panjang)	1450,21 cm ⁻¹ (pendek)
	1535,06 cm ⁻¹ (pendek)	1535,06 cm ⁻¹ (pendek)	1535,06 cm ⁻¹ (panjang)
C=C	941,8 cm ⁻¹		809,9 cm ⁻¹
CH ₂	2954,41 cm ⁻¹ (medium)	2892,70 cm ⁻¹ (medium)	2923,56 cm ⁻¹ (tajam)

Sesuai dengan Tabel diatas dapat dinyatakan bahwa glukosil oleat yang terbentuk dicirikan oleh pita serapan pada bilangan gelombang 1727,91 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi C=O dengan intensitas tajam, jika dilihat dari Gambar 4.5 vibrasi C=O dari asam oleat adalah sekitar 1720,19 cm⁻¹ sehingga terdapat pergeseran panjang gelombang dari C=O asam oleat ke ester. Munculnya pita serapan pada 1095,37 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi stretching tak simetris C-O-C mendukung keberadaan gugus ester pada senyawa ini. Pita-pita kuat di sekitar 2923,56 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus metil (CH₂).

Pita serapan pada panjang gelombang 3424,96 cm⁻¹ merupakan serapan gugus OH dari glukosa dengan bentuk lebar dan intensitas sedang, sementara itu sebelum diesterifikasi nampak pada Gambar 4.6 gugus OH memiliki pita serapan 3393,10 cm⁻¹ dengan bentuk cukup lebar dan intensitas kuat.



BAB V SARAN DAN KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

Kondisi kerja optimum lipase amobil yang diisolasi dari *Mucor miehei* adalah suhu 50 °C dan waktu inkubasi 24 jam dengan aktivitas sebesar 8,417 unit. Untuk mengetahui ester yang terbentuk didukung dengan adanya spektra Inframerah.

5.2 Saran

Untuk mengetahui efisiensi lipase amobil perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang stabilitas enzim amobil setelah sekian kali berulang dan bisa juga dilakukan penelitian untuk karakterisasi ester gula yang terbentuk.

DAFTAR PUSTAKA

- Ari, Asnani, 2001, **lipase**, Departemen Kimia dan Biokimia Universitas Guelph, Ontario, Canada
- Adanson, Arthur W., 1990, **Physical Chemistry of Surface**, 5th ed., John Willey dan Sons Inc, Toronto, pp. 4-6
- Anonymous, 1983, **Esterase-Lipase dari *Mucor miehei***. **Resources: Secondary Direct Food Additives Permitted in Food For Human Consumption**, BioMatnet Item; 21 CFR173. 140
- Arcos, J.A, Bernabe, M., dan Otero, C., 1998, **Quantitative Enzymatic Production of 1,6 Acylglucose Esters**, *Enzyme Microb. Technol.*, pp 22
- Bernart, F. R. dan Ventasubramanian, 1987, **Method of Immobilization**, American Society for Microbiology, New York, pp. 230-240
- Blecker, C., Graille, G., and Renard, J., 2001, **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, 5: 209
- Bloomer, D., Bistline, D., dan Graille, G., 1992, **Synthesis of Acyl Donor and Use in Lipase-Catalyzed Inesterification**, *J.Am.Oil Chem Soc*, 69(10): 966-973
- Borrow, Gordon M, 1988, **Physical Chemistry**, 5th edition, Mc Graw Hill Book Co., Singapore, pp 389-390
- Bucke, S dan Chetaam, 1979, **Immobilization of Microbiology cells and Their Use in Waste Water Treatment**, Academic Press Mc, New York, pp. 219-213
- Buckingham, 1983, **Dictionary of Organic Compounds**, 5th edition, Marck Printing Company Easton Pennsylvania, p.11
- Campbell, Mary. K., 1994, **Biochemistry**, second edition, Saunders College Publishing, USA, pp 145-148
- Chibata, Ichiro, 1978, **Immobilized Enzymes Research and Development**, Kondansha Ltd, Tokyo, 126-128
- Compton, d.L., Laszlo, J.A., dan Berhow, M.A., 2000, **Lipase Catalyzed Synthesis of Ferulate Ester**, *J. Am Oil Chem. Soc.*, 77, 513-519
- Erika, F.P., 2002, **Isolasi Dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Lipase Dari *Mucor miehei***, Skripsi, Jurusan kimia, Universitas Brawijaya, Malang
- Edwards, S. West, 1970, **Text Books of Biochemistry**, fourth edition, The Macmillan Company Collier, Macmillan Limited, London

Faber, K., 1995, **Biotransformation in Organic Chemistry**, Springer, Berlin, pp 69-70

Fadiloglu, S., dan Soylemez, Z., 1998, **Production and Characterization of Isoprpyl Laurate Using Immobilized Lipase**, J.Eng.Env.Sci.Turkish. TURBITAK, pp 241-247

Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S., 1992, **Kimia Organik Jilid 1**, edisi ketiga, alih bahasa: A.H Pujaatmaka, Erlangga, Jakarta, hal 170-180

Gliscman, M., 1982, **Food Hydrocolloids**, CRC Press Inc., Florida, pp. 13-14

Girindra, A., 1993, **Biokimia 1**, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta Hal 91-99

Hari, P., **Rekayasa Paket Teknologi Produksi Starter Dan Enzim Mikroba Paket Aplikasinya Pada Pengolahan Susu**, UMM Press, Malang, Hal 12-40

Hawley's, G, 1987, **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**, 7th edition, van Nostrand Reinhold, New York

Hui, H. Y., 1989, **Encyclopedia of Food Science and Tecnology**, Vol 2, John Willey dan Sons, New York, p 745

Jones, M., 1970 **Organic Chemistry**, third edition, Norand, London, pp 762-780

Kennedy, J.F., 1985, **Principles of Immobilized Enzymes**, Ellis Horwood Limited Chichester, England, pp 118

Kosaric, N., 1993, **Biosurfactant in Industry**, Pure Appl. Chem, 64, pp 1731-1737

Kuang, D., Obaje, O.J., And Ali, A.M., 1993, **Synthesis and Characterization of Acetylated Glicose' Fatty Ester from Palm and Palm kernel Oil Fatty Methyl Esters**, J. Oil Palm Res. 12 (2) 117-122

Lin, S.C., 1996, **Biosurfactant; Recent Advances**, J.Chem. Tech Biotech 66 :109-120

Montgomery, **Biokimia Jilid 1 Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus**, UGM Press, hal 96-98

Othmer, K., 1987, **Encyclopedia of Chemical Technology**, Vol 8, John Wiley and Sons Inc, New York, pp 516-517

Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S, 1973, **Microbiology**, McGraw Hill Book Company, Inc, New York, pp 79-83

- Priyati, 1996, **Amobilisasi Ekstrak Kasar Enzim Inulinase Dari *Aspergillus niger* Dengan Metode Penjebakan Menggunakan Carrier Na-Alginat**, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang
- Rahman dan Herawan, 2000, **Properties of Biosurfactant Enzymatically Prepared From Fructose and Palm Oil Fatty Acid**, J. Oil Palm Res. 12 (1) 14-19
- Sastrohamidjojo, H., 1991, **Spektroskopi**, edisi kedua, Penerbit Liberty, Yogyakarta, hal 163-166
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., dan Morijil, T.C., 1986, **Penyidikan Spektrofotometrik Senyawa Organik**, edisi keempat, Alih bahasa: A.J. Hartono, dkk, Erlangga, Jakarta, hal 104
- Suhartono, T.M., 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor, hal 40-43
- Taggart, R dan Starr, C, 1992, **Biology The Unity and Diversity of Life**, sixth edition, Wadsworth Publishing Company Belmont, California
- Wong, D.W., 1995, **Food Enzyme**, Chapman and Hall, New York, USA



Lampiran 1

Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Mucor miehei*Tabel L1.1 Massa dari *Mucor mehei*

jam ke	Massa sel (gram)		
	ulangan 1	ulangan 2	rata-rata
0	0,0200	0,0185	0,0192
12	0,0347	0,0345	0,0346
24	0,0669	0,0668	0,0668
36	0,0983	0,0980	0,0981
48	0,1311	0,1310	0,1310
52	0,1325	0,1325	0,1325
56	0,1561	0,1560	0,1560
60	0,1902	0,1902	0,1902
64	0,1953	0,1954	0,1953
68	0,1968	0,1968	0,1968
72	0,2068	0,2067	0,2067
76	0,2065	0,2065	0,2065
80	0,2064	0,2064	0,2064
84	0,2064	0,2065	0,2064
88	0,2066	0,2065	0,2065
92	0,2065	0,2066	0,2065
96	0,2066	0,2066	0,2066

