

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM AMOBILISASI  
LIPASE *Rhizopus Oryzae* DALAM MATRIKS  
Ca - ALGINAT – KITOSAN**

**SKRIPSI**

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

**Oleh :**

**ARIE ENGGAR FITRI**

**0410920010-92**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
200**

# LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM AMOBILISASI LIPASE  
*Rhizopus oryzae* DALAM MATRIKS Ca-ALGINAT-KITOSAN**

oleh:

**ARIE ENGGAR FITRI**

**0410920010-92**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada tanggal.....

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

**Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

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

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

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

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

# LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : ARIE ENGGAR FITRI  
NIM : 0410920010-92  
Jurusan : Kimia  
Penulis tugas akhir berjudul:  
Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Lipase *Rhizopus oryzae* dalam Matriks Ca-Alginat-Kitosan

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Malang,  
Yang menyatakan,

(Arie Enggar Fitri)  
NIM. 0410920010-92

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM AMOBILISASI  
LIPASE *Rhizopus Oryzae* DALAM MATRIKS  
Ca - ALGINAT – KITOSAN**

**ABSTRAK**

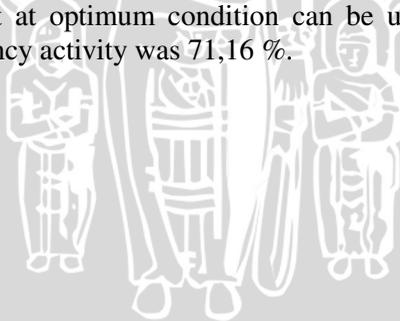
Ekstrak kasar lipase dari *Rhizopus oryzae* dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi antara laktosa dengan asam oleat. Ekstrak kasar lipase diamobilisasi dalam kapsul Ca-alginat-kitosan membentuk struktur bilayer. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi kitosan optimum yang akan digunakan dalam amobilisasi ekstrak kasar lipase. Keaktifan optimum ekstrak kasar lipase amobil dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi dapat ditentukan melalui kondisi optimum (temperatur dan waktu inkubasi) dan efisiensi pemakaian ulang. Pengukuran aktivitas lipase dapat ditentukan berdasarkan jumlah asam oleat yang bereaksi dengan laktosa dalam membentuk laktosil oleat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan optimum untuk amobilisasi ekstrak kasar lipase adalah 2%. Kondisi optimum ekstrak kasar lipase amobil dicapai pada temperatur 50 °C dan waktu inkubasi 24 jam dengan aktivitas sebesar 53,479 µg/g menit. Ekstrak kasar lipase amobil pada kondisi optimum masih layak digunakan untuk 3 kali pemakaian ulang dengan efisiensi sebesar 71,16 % pada pemakaian ketiga.



# DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITION FROM IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* LIPASE ON Ca-ALGINATES-CHITOSAN

## ABSTRACT

*Rhizopus oryzae* lipase crude extract can be used to catalyze esterification reaction between lactose and oleic acid. Lipase crude extract was immobilized in Ca-alginate-chitosan capsules to form double layer structure. This experiment was done to identify the optimum chitosan concentration in lipase crude extract immobilization. The optimization of immobilized lipase crude extract in esterification reaction was determined through optimum condition (temperatures and incubation time) and the efficiency of reused of immobilized lipase crude extract. The activity of immobilized lipase can be determined through the amount of oleic acid which react with lactosa to produce lactosyl oleate and it was determined by acid-base titration. The result of this experiment showed that the optimum chitosan concentration for lipase immobilization was 2%. The activity of the immobilized lipase crude extract was 53,479  $\mu\text{g/g}$  minutes in the optimum condition (temperatures 50  $^{\circ}\text{C}$ , 24 hours incubation time) .The immobilized lipase crude extract at optimum condition can be used until three times within efficiency activity was 71,16 %.



## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **"Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Lipase *Rhizopus oryzae* dalam Matriks Ca-Alginat-kitosan"**, sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia MIPA Universitas Brawijaya.

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.kes dan Dra. Anna Roosdiana, M.App. Sc selaku dosen pembimbing I dan II, atas bimbingan, pengarahan, kesabaran dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Rurini Retnowati, M.Si selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan kasih sayang, pengarahan, bimbingan dan semangat serta masukan kepada penulis selama masa studi.
3. Ulfa Andayani, S.Si., M.Si., Dr. Diah Mardiana, MS., Drs.M.Misbah Khunur, M.Si., dan Drs.Warsito, MS., selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran kepada penulis dalam perbaikan skripsi ini.
4. Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, semua dosen, staf pengajar serta semua karyawan Jurusan Kimia yang telah membantu penulis selama masa studi.
5. Bapak, Ibu dan keluarga penulis yang selalu memberikan semangat, pengarahan, doa, kasih sayang serta dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
6. Semua teman-teman di Jurusan Kimia, terutama angkatan 2004 yang telah memberikan semangat, persahabatan dan perhatian selama ini.

Akhirnya penulis menyadari dengan keterbatasan pengetahuan yang dimiliki penulis, maka skripsi ini masih jauh dari sempurna. Dengan segala kerendahan hati, penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca untuk kesempurnaan skripsi dan perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Juni 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Peneliitian.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim Lipase.....	4
2.2 <i>Rhizopus oryzae</i> .....	5
2.3 Isolasi Enzim Lipase.....	5
2.4 Amobilisasi Enzim.....	5
2.4.1 Metode Amobilisasi Enzim.....	5
2.4.2 Media Amobilisasi.....	7
2.4.2.1 Alginat.....	7
2.4.2.2 Kitosan.....	8
2.4.3 Amobilisasi dengan Ca-Alginat-kitosan.....	9
2.5 Penentuan Aktivitas Lipase.....	11
2.6 Hipotesis.....	12
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	13
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	13
3.2.1 Bahan Penelitian.....	13
3.2.2 Bahan Kimia.....	13
3.2.3 Alat Kimia.....	13

3.3 Tahapan Penelitian.....	14
3.4 Cara Kerja	
3.4.1 Pembuatan Media Padat Miring.....	14
3.4.2 Peremajaan Biakan.....	15
3.4.3 Pembuatan Media Cair.....	15
3.4.4 Produksi dan Isolasi Enzim.....	15
3.4.5 Penentuan Kadar Protein	
3.4.5.1 Pembuatan Kurva Baku Kasein..	16
3.4.5.2 Penentuan Kadar Protein Lipase.	16
3.4.6 Penentuan Aktivitas Lipase.....	16
3.4.7 Amobilisasi Lipase dalam Kapsul	
Ca-alginat-kitosan.....	17
3.4.8 Penentuan Aktivitas Lipase Amobil.....	18
3.4.9 Penentuan Kadar Protein Lipase Amobil...	18
3.4.10 Penentuan Kodisi Optimum Aktivitas	
Lipase Amobil.....	18
3.4.11 Efisiensi Pemakaian Ulang Lipase Amobil.	19
3.5 Analisa Data.....	19
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Pengaruh Amobilisasi Terhadap Aktivitas Ekstrak	
Kasar Lipase.....	20
4.2 Pengaruh Variasi Konsentrasi Kitosan terhadap	
Jumlah Ekstrak Kasar Lipase yang Terikat pada	
Kapsul dan Aktivasnya.....	24
4.3 Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Ekstrak Kasar	
Lipase Amobil	
4.3.1 Penentuan Temperatur Optimum .....	27
4.3.2 Penentuan Waktu Inkubai Optimum.....	28
4.4 Efisiensi Pemakaian Ulang Ekstrak Kasar Lipase Amobil.	30
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	32
5.2 Saran.....	32
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	33
<b>LAMPIRAN.....</b>	37

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur sisi aktif lipase.....	4
Gambar 2.2	Struktur alginat.....	8
Gambar 2.3	Pembentukan ikatan silang Ca-alginat.....	8
Gambar 2.4	Struktur kitosan.....	9
Gambar 2.5	Pembentukan kapsul Ca-alginat-kitosan dengan struktur bilayer.....	10
Gambar 2.6	Pembentukan kompleks ungu protein-Biuret.....	12
Gambar 4.1	Interaksi antara Ca-alginat dan kitosan membentuk struktur bilayer .....	21
Gambar 4.2	Mekanisme esterifikasi enzimatis oleh Lipase.....	22
Gambar 4.3	Pengaruh konsentrasi kitosan dalam amobilisasi terhadap jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam tiap 0,5 g (matriks + ekstrak kasar lipase).....	25
Gambar 4.4	Pengaruh konsentrasi kitosan dalam amobilisasi ekstrak kasar lipase terhadap aktivitas.....	26
Gambar 4.5	Penentuan temperatur optimum aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	27
Gambar 4.6	Penentuan waktu inkubasi optimum aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	29
Gambar 4.7	Pengaruh pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil terhadap aktivitas.....	31
Gambar L.5.1	Kurva serapan larutan kasein.....	53
Gambar L.6.1	Kurva baku kasein.....	54

## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	Aktivitas ekstrak kasar lipase bebas dan ekstrak kasar lipase yang diamobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan.....	23
Tabel 4.2	Pengaruh pemakaian ulang terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	30
Tabel L.5.1	Absorbansi Larutan Kasein 833,333 ppm.	53
Tabel L.6.1	Data Absorbansi Larutan Kasein pada Panjang Gelombang 540 nm.....	54
Tabel L.7.1	Pembakuan KOH 0,2 M dengan Asam Oksalat 0,1 M.....	55
Tabel L.8.1	Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase bebas.....	56
Tabel L.8.2	Volume titrasi untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase bebas.....	56
Tabel L.9.1.1	Kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi.....	57
Tabel L.9.2.1	Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi.....	58
Tabel L.10.1	Volume larutan ekstrak kasar lipase setelah pencucian setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan.....	59
Tabel L.10.2.	Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul setelah amobilisasi dalam Ca-alginat.....	60
Tabel L.10.3	Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan (Na-tripolifosfat 3% 15 menit).....	60
Tabel L.10.4	Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan (Na-tripolifosfat 1% 90 menit).....	61
Tabel L.11.1	Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul Ca-alginat.....	62
Tabel L.11.2	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada Kapsul Ca-alginat-kitosan .....	63

Tabel L.11.3	Massa mikro kapsul (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase).....	64
Tabel L.11.4	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam tiap g (matriks Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase).....	64
Tabel L.11.5	Jumlah ekstrak kasar lipase amobil dalam 0,5 g (matriks Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase).....	65
Tabel L.12.1.1	Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	66
Tabel L.12.1.2	Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam berbagai variasi konsentrasi kitosan.....	67
Tabel L.12.2.1	Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....	68
Tabel L.12.2.2	Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam variasi temperatur untuk penentuan temperatur.....	68
Tabel L.12.3.1	Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....	69
Tabel L.12.3.2	Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam variasi waktu inkubasi untuk penentuan waktu inkubasi optimum .....	70
Tabel L.13.1	Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....	72
Tabel L.13.2	Volume titrasi untuk penentuan pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil .....	72
Tabel L.13.3	Pengaruh pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil terhadap efisiensi aktivitas .....	72
Tabel L.14.1	Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....	73
Tabel L.14.2	Hasil uji BNT 5% pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil... ..	75
Tabel L.14.3	Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah ekstrak kasar lipase amobil yang terjebak .....	76
Tabel L.14.4	Hasil uji BNT 5% Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah ekstrak kasar lipase amobil yang terjebak .....	76
Tabel L.14.5	Pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....	77

- Tabel L.14.6 Hasil uji BNT 5% pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....77
- Tabel L.14.7 Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....78
- Tabel L.14.8 Hasil uji BNT 5% pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil .....78
- Tabel L.14.9 Pengaruh pemakaian ulang terhadap efisiensi aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....79
- Tabel L.14.10 Pengaruh pemakaian ulang terhadap efisiensi aktivitas ekstrak kasar lipase amobil.....79



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Alur Penelitian ..... 37
Lampiran 2	Diagram Kerja Penelitian..... 38
Lampiran 3	Preparasi Larutan..... 48
Lampiran 4	Perhitungan Preparasi Larutan..... 51
Lampiran 5	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein ..... 53
Lampiran 6	Pembuatan kurva baku kasein..... 54
Lampiran 7	Pembakuan Larutan KOH..... 55
Lampiran 8	Penentuan Aktivitas Lipase Bebas..... 56
Lampiran 9	Penentuan Jumlah Lipase Awal..... 57
Lampiran 10	Penentuan Jumlah Lipase yang Terlepas dalam Amobilisasi Ca-alginat-kitosan..... 59
Lampiran 11	Penentuan Jumlah Lipase yang Terjebak dalam Ca-alginat-kitosan..... 62
Lampiran 12	Perhitungan Aktivitas lipase amobil dan Penentuan Kondisi Optimum Lipase Amobil..... 66
Lampiran 13	Efisiensi Pemakaian Ulang Lipase Amobil.. 71
Lampiran 14	Uji Statistik terhadap Aktivitas Lipase Amobil..... 73

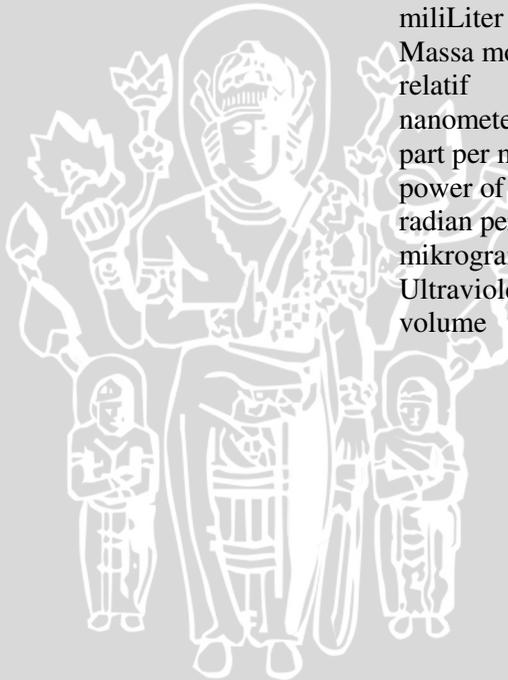
## DAFTAR ISTILAH

### Simbol/singkatan

$\alpha$   
 $\beta$   
C  
g  
L  
M  
mg  
mg/g  
mg/mmol  
mL  
Mr  
nm  
ppm  
pH  
rpm  
 $\mu$ g  
Uv-vis  
Vol.

### Keterangan

alpha  
beta  
celsius  
gram  
Liter  
Molar  
miligram  
miligram/gram  
miligram/milimol  
miliLiter  
Massa molekul  
relatif  
nanometer  
part per million  
power of hydrogen  
radian per minut  
mikrogram  
Ultraviolet/visibel  
volume



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim adalah biokatalisator yang berperan dalam mengkatalisis reaksi yang spesifik dalam sel hidup (Lehninger, 1992). Salah satu jenis enzim adalah lipase. Lipase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi dan transesterifikasi (Lee, dkk., 2006). Lipase banyak digunakan dalam berbagai industri diantaranya industri makanan, detergen, kosmetika, farmasi dan agrokimia (Putranto dkk., 2006).

Lipase dapat dihasilkan dari *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Monilia sitophila*, *R. delemar*, *R. nivers*, *R. oryzae* dan *R. javanicus* (Putranto dkk., 2006). Substrat alami dari lipase adalah asam lemak jenuh atau tak jenuh seperti asam oleat, asam palmitat dan minyak zaitun. Lipase dari *Rhizopus sp.* mampu mengkatalisis reaksi esterifikasi laktosil oleat, yaitu ester gula yang berperan sebagai biosurfaktan (Julitera, 2008).

Penggunaan lipase dalam industri selama ini tidak efisien karena lipase hanya digunakan untuk satu kali pemakaian saja. Hal ini terjadi karena lipase sulit dipisahkan dari produk sehingga tidak dapat dipergunakan kembali (Lee, dkk., 2006). Keterbatasan penggunaan lipase tersebut dapat diatasi dengan metode amobilisasi enzim. Amobilisasi enzim dapat meningkatkan stabilitas dan pemakaian ulang enzim serta kemudahan pemisahan enzim dari suatu reaksi campuran (Pereira, dkk., 2003).

Metode amobilisasi enzim diantaranya adalah metode adsorpsi, metode ikatan silang dan metode penjebakan enzim. Metode adsorpsi kurang efektif karena ikatan yang terbentuk antara enzim dengan *carrier* lemah sehingga enzim mudah terlepas. Sedangkan metode ikatan silang dapat menyebabkan perubahan konformasi pada pusat aktif enzim sehingga enzim kehilangan sisi katalitiknya (Norouzian, 2003). Amobilisasi enzim dengan metode penjebakan (mikrokapsul/matriks) memberikan luas permukaan yang besar sehingga kontak enzim dengan substrat menjadi lebih besar dan transfer massa terhadap produk juga meningkat (Taqquieddin, dkk., 2002).

Amobilisasi enzim dalam mikrokapsul dapat menggunakan alginat sebagai matriks. Matriks alginat umumnya dipilih sebagai kapsul karena bersifat aman, murah dan mudah dalam membentuk kapsul. Alginat dapat membentuk ikatan silang dengan  $\text{Ca}^{2+}$  menghasilkan kapsul Ca-alginat (Mortazavian, dkk., 2007). Kapsul alginat mudah retak dan kehilangan stabilitas mekaniknya. Simanjuntak, (2005), menyatakan bahwa lipase yang diamobilisasi dalam matriks Ca-alginat hanya layak digunakan sampai 3 kali pemakaian. Hal ini dimungkinkan karena terjadi kerusakan pori-pori kapsul alginat secara bertahap yang mengakibatkan enzim terlepas dari kapsul Ca-alginat pada setiap pemakaian ulang.

Peningkatan efisiensi pemakaian ulang lipase, dapat dilakukan dengan mengamobilisasikan lipase dengan struktur bilayer menggunakan Ca-alginat-kitosan. Pelapisan kapsul alginat dengan polimer kitosan ini dapat meningkatkan stabilitas kimia dan fisik dari kapsul (Mortazavian, dkk., 2007). Secara struktural kapsul yang dibentuk dari sistem bilayer Ca-alginat-kitosan dapat menghasilkan pori yang sangat rapi, rapat dan dapat mengurangi difusi enzim ke lingkungan (Le-Tien, dkk., 2004). Sifat polikationik dari kitosan dapat membentuk ikatan silang dengan Natrium tripolifosfat sehingga terbentuk pori yang bersifat permeabel terhadap substrat. Semakin banyak ikatan silang yang terbentuk maka pori yang terbentuk semakin rapat sehingga enzim akan sulit terlepas dari kapsul dan lebih tahan lama terhadap temperatur dari lingkungan (Taqieddin, dkk., 2002).

Keaktifan optimum lipase dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi tergantung pada pH, temperatur dan waktu inkubasi. Anugrawati, (2007), menyatakan lipase hasil isolasi dari *Rhizopus oryzae* dalam keadaan bebas bekerja pada temperatur 50 °C dan waktu inkubasi 24 jam pada substrat asam palmitat untuk esterifikasi laktosa. Karena kondisi optimum lipase penting dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi maka dilakukan penentuan kondisi optimum lipase yang diamobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan.

## 1.2 Perumusan Masalah

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

1. Bagaimana konsentrasi larutan kitosan yang optimum dalam amobilisasi ekstrak kasar lipase ?

2. Bagaimana kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar lipase amobil untuk esterifikasi asam oleat dan laktosa yang meliputi temperatur dan waktu inkubasi ?
3. Bagaimana efisiensi pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil dalam kapsul Ca-alginat-kitosan ?

### **1.3 Batasan Masalah**

Penelitian yang akan dilakukan ini dibatasi pada :

1. Enzim yang digunakan adalah ekstrak kasar lipase yang diisolasi dari kapang *Rhizopus oryzae*
2. Konsentrasi Na-alginat yang digunakan adalah 3 %
3. Konsentrasi larutan kitosan yang digunakan adalah (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5) %

### **1.4 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menentukan konsentrasi larutan kitosan optimum yang digunakan dalam amobilisasi ekstrak kasar lipase
2. Menentukan temperatur dan waktu inkubasi optimum aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam esterifikasi laktosil oleat
3. Menentukan efisiensi pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai konsentrasi kitosan optimum yang dapat digunakan untuk amobilisasi ekstrak kasar lipase dalam Ca-alginat-kitosan dan karakterisasi ekstrak kasar lipase amobil yang meliputi temperatur dan waktu inkubasi optimum untuk reaksi esterifikasi laktosil oleat.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

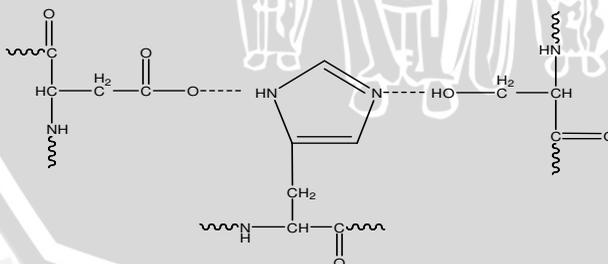
### 2.1 Enzim Lipase

Enzim adalah katalis protein yang dapat memediasi sintesis suatu senyawa organik. Enzim banyak diaplikasikan dalam bentuk teramobilisasi (Conn, dkk., 1987). Sifat istimewa enzim yang menonjol adalah kapasitas katalitik dan spesifitasnya yang sangat tinggi. Enzim mempunyai spesifitas yang tinggi dalam jenis reaksi maupun substratnya. Enzim dapat mempercepat laju reaksi paling sedikit 1 juta kali (Winarno, 1995).

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

Keaktifan lipase dapat diketahui dengan mengikuti hilangnya substrat atau timbulnya produk hidrolisis asam lemak bebas. Aktivitas optimum lipase tergantung pada pH dan suhu. Suhu optimal lipase pada umumnya berkisar antara 30<sup>0</sup> dan 40<sup>0</sup> C. Karena lipase hanya bekerja pada fase antara minyak dan air, maka substrat perlu dijadikan emulsi minyak/air lebih dahulu (Winarno, 1995).

Lipase mengandung 3 asam amino yang berperan penting 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. Menurut Wong, 1995, struktur dari lipase terlihat seperti Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur sisi aktif lipase

## 2.2 *Rhizopus oryzae*

Lipase dapat dihasilkan dari mikroba lokal, salah satunya kapang yaitu *Rhizopus oryzae* (Winarno, 1995). Klasifikasi dari *Rhizopus oryzae* adalah sebagai berikut (Ellis, 2007):

Kingdom	: Fungi
Filum	: Zygomycota
Kelas	: Zygomycetes
Sub Kelas	: Incertae sedis
Ordo	: Mucorales
Famili	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>Rhizopus oryzae</i>

Secara mikroskopik, morfologi dari *Rhizopus oryzae* memiliki sporangia berbentuk seperti bola dengan warna abu-abu kehitaman yang jumlahnya banyak dan *rhizoid* yang biasanya berada dalam 3 atau lebih kelompok. Tidak tumbuh pada 45 °C tetapi tumbuh baik pada 40 °C.

## 2.3 Isolasi Enzim Lipase

Enzim dapat diisolasi dari jaringan hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dengan metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi (Judoamidjojo, dkk., 1989). Keberhasilan isolasi enzim bergantung pada jenis dan kondisi sumber enzim, proses produksi dan cara ekstraksinya (Rahayu, 1996).

Teknik pemisahan enzim dalam sel dari komponen lain tergantung pada letak enzim. Lipase termasuk enzim ekstraseluler yang aktivitasnya berada diluar sel dan isolasinya dapat dilakukan dengan metode sentrifugasi. Pada ekstraksi dan isolasi yang dilakukan pada enzim lipase, tidak memerlukan pemecahan dinding sel sedangkan pada enzim intraseluler perlu dilakukan pemecahan membran dan dinding sel yang melekat kuat (Suhartono, 1989).

## 2.4 Amobilisasi Enzim

### 2.4.1 Metode amobilisasi

Amobilisasi enzim dapat diartikan suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak sehingga dapat dikendalikan atau diatur kapan enzim harus kontak dengan substrat. Cara fisik pada amobilisasi enzim ialah dengan cara tidak melibatkan pembentukan ikatan kovalen atau dengan perangkap dalam suatu gel yang dimasukkan dalam suatu kapsul mikro atau kapsul semipermeabel. Cara fisik ini pada umumnya bersifat *reversible*. Secara kimia amobilisasi enzim dengan ikatan kovalen membuat molekul bersifat *irreversible* (Winarno, 1995).

Enzim amobil dapat dihasilkan dari beberapa variasi metode diantaranya adalah metode adsorpsi, yang dilakukan dengan cara melekatkan enzim pada suatu carrier yang terikat secara kovalen berdasar adsorpsi fisik, tarikan muatan (*charge attraction*), pembentukan ikatan H dan atau dengan interaksi hidrofobik. Pembentukan ikatan kovalen pada suatu *carrier*, yang dalam hal ini berupa suatu matriks yang teraktivasi, biasanya banyak dipakai untuk ikatan peptida dalam protein. Yang pertama matriks diaktivasi kemudian enzim dipasangkan pada sisi reaktif dari matriks, biasanya dengan reaksi gugus amino bebas (Belitz dan Grosch, 1987).

Metode amobilisasi yang lain adalah metode penjebakan enzim. Dalam hal ini, sebuah enzim dijebak dalam sebuah pori dari sebuah jaringan polimer dengan polimerisasi dari monomer seperti acrilamida atau N,N'-metilen-bis-akrilamida dengan adanya enzim dan memudahkan berikatan dengan substrat melalui pori. Lebih jauh lagi, proses yang sesuai dapat membentuk suatu mikrokapsul dalam membran semipermeabel (Belitz dan Grosch, 1987).

Metode amobilisasi dengan pembentukan ikatan silang enzim dapat dilakukan dengan menggunakan reagen seperti glutaraldehid yang menghasilkan ikatan silang pada enzim dan membentuk kompleks tak larut dengan sisi aktif katalitik yang besar. Sifat dari enzim amobil biasanya dipengaruhi oleh matriks dan metode amobilisasinya. (Belitz dan Grosch, 1987)

Metode penjebakan enzim memberikan fungsi katalitik dan struktur enzim yang tidak berubah. Metode ini menempatkan enzim ke dalam kisi-kisi suatu matriks polimer melingkupi enzim dengan suatu membran semipermeabel. *Carrier*/ membran yang banyak digunakan adalah alginat dan karagenan. Mekanisme penjebakan enzim dapat terjadi dengan dua cara yaitu dengan membenamkan molekul enzim ke dalam jaringan polimer bahan pendukung (tipe

kisi). Pada tipe ini, enzim dijebak dalam matriks gel berikatan silang. Gel penjebak yang digunakan merupakan suatu jalinan polimer yang dibentuk dari *precursor* monomer, oligomer, atau polimer itu sendiri dengan mengubah pelarut, suhu, kekuatan ion dan pH lingkungan pereaksi sehingga terbentuk reaksi ikatan silang pada *precursor*. Penggunaan alginat sebagai *carrier* mempunyai keuntungan yaitu enzim teramobil memiliki ukuran yang seragam dimana enzim dijebak dalam ruangan antar polimer. Bentuk enzim amobil ada 4 tipe, diantaranya adalah manik (partikel), membrane (film, plat), pipa dan serat (Chibata, dkk., 1978) .

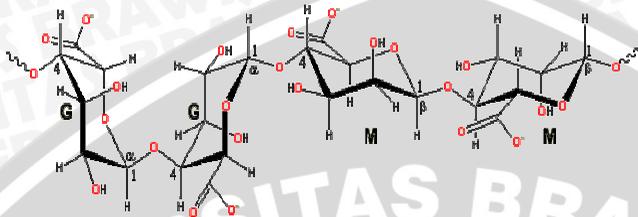
Cara lain yang dilakukan adalah dengan menahan molekul enzim dala suatu membran yang *permeable* terhadap substrat dan produk (tipe mikrokapsul). Pada tipe ini, enzim dibuat amobil dalam bentuk kapsul berukuran mikro dari bahan polimer organik. Membran kapsul bersifat *semipermeabel* terhadap substrat ataupun produk sehingga kontak antara enzim dengan substrat lebih baik (Chibata, dkk., 1978).

Adapun keuntungan dari penggunaan enzim yang diamobilisasi diantaranya adalah mudah dipisahkan dari reaksi campuran, dapat mengontrol reaksi dan dapat meminimalisasi banyaknya enzim yang hilang dalam produk. Selain itu, enzim amobil juga dapat digunakan kembali dalam banyak reaksi dan menurunkan total biaya untuk produksi enzim (Rohmhaas, 2006).

## 2.4.2 Media Amobilisasi

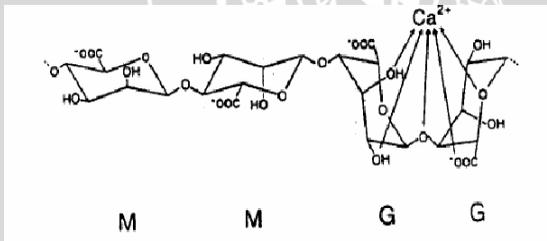
### 2.4.2.1 Alginat

Alginat ( $C_6H_8O_6$ ) adalah sebuah polimer linear yang tidak bercabang yang mengandung  $\beta$ -(1,4) yang berikatan dengan asam-D-mannuronat (M) dan residu  $\alpha$ -(1,4) yang berikatan dengan asam-L-guluronat (G). Alginat secara komersial tersedia dalam bentuk asam alginat dan garam sodium (Na-alginat) yang secara normal diisolasi dari alga. Komponen skeletal dari alga yang kuat dan bersifat fleksibel dan polimernya yang bersifat anion menyebabkan kation polivalen dapat berikatan silang dengan kedua molekul polimer yang berbeda dan dengan rantai polimer yang sama (Wang, 2006). Struktur dari alginat dapat dinyatakan dalam Gambar 2.2 (Chaplin, 2007).



Gambar 2.2 Struktur alginat

Polimer alginat umumnya dibuat dari ikatan silang dari gugus karboksil pada asam L-guluronat dengan larutan kationik pembentuk ikatan silang seperti  $\text{CaCl}_2$  (Vimal, dkk., 2007).). Pembentukan ikatan silang antara  $\text{Ca}^{2+}$  dengan gugus karboksil dari alginat seperti Gambar 2.3 (Burak, 2007).

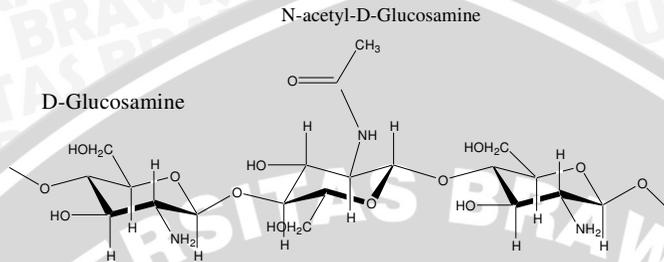


Gambar 2.3 Pembentukan ikatan silang Ca-alginat

Matriks Ca-alginat yang terbentuk dapat berupa suatu kapsul yang memiliki diameter 1-3  $\mu\text{m}$  dan ukuran pori yang dibentuk pada permukaan manik-manik alginat yang tidak lebih dari 7 nm (Mortazavian, dkk., 2007).

#### 2.4.2.2 Kitosan

Kitosan adalah polisakarida alami yang diperoleh melalui N-deasetilasi dari kitin yang umumnya ditemukan dari kulit kerang, kutikula serangga dan dinding sel dari jamur. Kitosan mudah diperoleh, murah dan bersifat antifungal dan bakteriostatik sehingga mudah didegradasi (Tayebah, dkk., 2006). Struktur dari kitosan terlihat pada Gambar 2.4 (Tayebah, dkk., 2006)



Gambar 2.4 Struktur Kitosan

Kitosan terdiri dari rantai glukosamin dan N-asetilglukosamin yang memiliki sifat polikation yang unik. Karena pKa dari residu d-glukosamin berada disekitar 6,5, maka kitosan hanya larut dalam asam asetat atau asam lemah. Sifat alami dari polikationik kitosan dapat menghasilkan interaksi elektrostatis yang kuat dimana muatan negatif dari alginat yaitu gugus karboksil dari alginat akan bereaksi dengan gugus amina dari kitosan menghasilkan membran yang cukup kuat (Vimal, dkk., 2007).

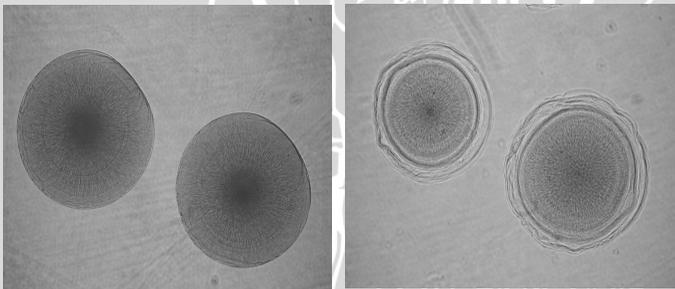
Molekul-molekul yang bermuatan negatif yang dapat membentuk ikatan silang dengan kitosan diantaranya adalah glutaraldehid, glioxal dan etilen glikol diglisidil eter. Molekul tersebut merupakan pereaksi ikatan silang yang baik namun tidak cukup aman digunakan karena sifatnya yang beracun dan membran yang terbentuk mudah rusak (Devika dan Varsha, 2006). Natrium tripolifosfat dapat digunakan sebagai pereaksi ikatan silang karena memiliki sifat yang tidak beracun, membran yang terbentuk fleksibel, dapat meningkatkan stabilitas kimia dari membran dan mudah mengontrol ikatan silang yang dibentuknya (Liu, dkk., 2006).

### 2.4.3 Amobilisasi dengan Ca-Alginat-Kitosan

Amobilisasi dengan menggunakan Na-alginat yang bersifat polianion merupakan salah satu metode yang paling banyak dilakukan, karena murah dan mudah dalam membentuk kapsul. Amobilisasi dilakukan pada suhu kamar dengan menggunakan  $\text{CaCl}_2$  (Wang, 2007).

Terbentuknya gel Ca-Alginat disebabkan oleh kation kalsium bivalen dari  $\text{CaCl}_2$  bereaksi dengan monovalen anion karboksilat alginat yang akan membentuk jaringan tiga dimensi (Glicsman, 1982).

Untuk mengurangi porositas dan meningkatkan kestabilan, mikropartikel dari kapsul Ca-alginat dilapisi dengan kitosan berdasar gaya elektrostatis (Catarina M., dkk., 2006). Sistem bilayer dengan Ca-alginat-kitosan dapat meningkatkan kekuatan mekanik dan densitas dari mikrokapsul. Struktur ini juga dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengatasi adanya ligan pengkhelat yang dapat berinteraksi dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Mortazavian, dkk., 2007). Penggunaan kitosan sebagai membran kedua juga dapat membentuk suatu membran yang kuat yang tahan terhadap tekanan osmotik dari kapsul (Vimal, dkk., 2007). Membran yang dibentuk oleh kitosan yang berikatan silang dengan Natrium tripolifosfat merupakan membran berpori yang bersifat permeabel terhadap substrat dan produk yang dihasilkan. Ikatan silang yang dibentuk oleh Natrium tripolifosfat akan meningkatkan kemampuan tahan terhadap asam dari membran kitosan (Liu dkk., 2006). Pembentukan struktur bilayer pada kapsul Ca-alginat-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan dapat dilihat pada Gambar 2.5 (Taqieddin, dkk., 2002).



Gambar 2.5 Pembentukan kapsul Ca-alginat-kitosan dengan struktur bilayer (a). lapisan sempurna (b). lapisan tidak sempurna

Na-tripolifosfat dapat digunakan sebagai mediator terbentuknya ikatan antara alginat dan kitosan. Muatan negatif dari tripolifosfat dapat bereaksi dengan gugus amina dari kitosan untuk membentuk ikatan silang ionik. Penambahan tripolifosfat juga akan

berdifusi kedalam kalsium alginat dan membentuk khelat dengan ion kalsium dan melunakkan inti. Pelunakan alginat pada bagian dalam dari lapisan kitosan berperan penting untuk meningkatkan transfer massa dari substrat dan produk. Penggunaan Na-tripolifosfat mampu mereduksi kandungan air dari membran sampai 80%. Semakin banyak gugus amino dari kitosan yang berikatan dengan Natrium tripolifosfat juga akan semakin meningkatkan kerapatan struktur dari membran yang terbentuk (Taqieddin, dkk., 2002). Amobilisasi dengan sistem bilayer menggunakan Ca-alginat-kitosan, akan meningkatkan stabilitas enzim terhadap perubahan lingkungan (temperatur, pH, kekuatan ionik).

### **2.3.1 Penentuan Aktivitas Lipase**

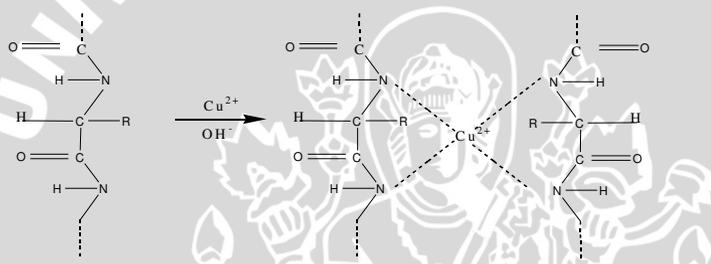
Aktivitas enzim dapat ditentukan dari jumlah substrat yang hilang per unit waktu. Aktivitas enzim didefinisikan jumlah enzim yang menyebabkan hilangnya 1 mol substrat per detik pada kondisi tertentu (Palmer,1991). Aktivitas lipase dalam mengkatalisis pembentukan ester gula dapat ditentukan melalui titrasi asam basa yaitu berdasarkan pada jumlah asam lemak dari sisa hasil esterifikasi (Sakeroglu,dkk., 2004). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, temperatur dan waktu inkubasi (Winarno, 1995).

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 optimum dan mempunyai aktivitas yang maksimal. Sedangkan untuk 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 bisa diabaikan. Sebaliknya pada temperatur tinggi, laju inaktivasi enzim semakin cepat sehingga reaksi enzimatik praktis berhenti sama sekali (Winarno, 1995).

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 produk yang terbentuk semakin banyak

pula. Apabila enzim sudah jenuh dengan substrat, maka lamanya waktu inkubasi sudah tak berpengaruh lagi (Winarno, 1995).

Kadar protein dapat ditentukan dengan metode Biuret yang didasarkan pada pembentukan kompleks warna ungu yang diukur pada  $\lambda$  530-550 nm. Kompleks ungu ini terbentuk apabila suatu protein yang mempunyai empat atom N dari asam amino berikatan dengan  $\text{Cu}^{2+}$  dari  $\text{CuSO}_4$ . Dengan mengetahui kadar protein dari suatu enzim maka dapat diketahui pula aktivitas spesifik dari enzim tersebut (Wiseman, 1985). Pembentukan antara kompleks Cu dan atom N dapat digambarkan seperti pada Gambar 2.6 (West, 1996).



Gambar 2.6 Pembentukan kompleks ungu protein-Biuret

## 2.6 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Variasi konsentrasi kitosan berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase dalam amobilisasi
2. Ekstrak kasar lipase amobil memiliki kondisi optimum yang meliputi suhu dan waktu inkubasi optimum yang berbeda dengan keadaan bebasnya
3. Ekstrak kasar lipase amobil mempunyai efisiensi pemakaian ulang yang tinggi dalam beberapa kali pemakaian

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

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

### **3.2 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.2.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan sebagai sumber enzim adalah kultur murni dari kapang *Rhizopus oryzae* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang.

#### **3.2.2 Bahan Kimia**

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah dekstrosa, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ , KOH, fenofalein,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , NaOH,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , dan  $\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Semua bahan di atas memiliki derajat kemurnian pro analisis (p.a) kecuali ekstrak yeast, kitosan, agar, pepton, kertas saring, kentang, akuadest, Na-alginat, dan kasein.

#### **3.2.3 Alat Kimia**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas, neraca analitik Mettler (merek Toledo AL 204), pembakar spiritus, jarum ose, autoklave (model No.25X), inkubator (merek Heracus tipe B 50 -42 and memmert), shaker (merek Edmund Buhler SM25), sentrifuse (Fisher Scientific Centrifuge), pH meter (merek Schott Gerate CG 820), lemari pendingin, penangas air (merek Memmert NR 900660), pengaduk magnet (Heidloph MR 2002),

oven pemanas, waterbath (merek Karl Kolb tipe4 psI I), Spektrofotometer UV-Visible 1601 (merek Shimadzu).

### **3.3 Tahapan Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan di laboratorium yang berupa isolasi lipase dari kapang dan amobilisasi lipase serta karakterisasi lipase yang diamobilkan dalam Ca-alginat-kitosan yang diaplikasikan dalam reaksi esterifikasi antara asam oleat dan laktosa. Tahapan penelitian terdiri dari :

1. Penyiapan media
2. Peremajaan biakan murni
3. Produksi dan isolasi lipase
4. Penentuan kurva baku kasein
5. Penentuan kadar protein lipase
6. Penentuan aktivitas lipase bebas
7. Amobilisasi lipase dengan Ca-alginat-kitosan
8. Penentuan kadar protein lipase amobil
9. Penentuan aktivitas lipase amobil
10. Karakterisasi lipase amobil yang meliputi penentuan kondisi optimum lipase amobil dan efisiensi pemakaian ulang lipase amobil

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) sederhana dengan tahap-tahap penelitian sebagai berikut:

- a) penentuan konsentrasi kitosan optimum:(0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5) % w/v
- b) penentuan temperatur optimum: (30; 40; 50; 60; dan 70) °C
- c) penentuan waktu inkubasi optimum: (8; 16; 24; 32; dan 48) jam
- d) efisiensi pemakaian ulang lipase amobil

### **3.4 Cara Kerja**

#### **3.4.1 Pembuatan Media Padat Miring**

Sebanyak 50 g kentang dikupas kulitnya, dibersihkan dan dipotong kecil-kecil, kemudian dididihkan dalam 200 mL akuades selama 1 jam dan disaring dengan kertas saring. Filtrat ditambah dengan 5 g dekstrosa. Kemudian didinginkan dan ditambah dengan

20 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5. Setelah itu larutan ditambah 3 g tepung agar dan dididihkan hingga larut. Larutan di atas selanjutnya dipipet 5 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas dan disterilkan pada autoklave 121 °C, 15 psi selama 15 menit dan dibiarkan memadat selama 24 jam pada temperatur kamar sambil dimiringkan.

### **3.4.2 Peremajaan Biakan**

Kapang dari biakan *Rhizopus oryzae* digoreskan pada media padat dengan ujung jarum ose aseptik yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum ose dan dilakukan pada keadaan steril, ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 2 hari dalam inkubator.

### **3.4.3 Pembuatan Media Cair**

Media pertumbuhan *Rhizopus oryzae* untuk menghasilkan lipase terdiri atas: pepton 0,75 g, ekstrak yeast 2,5 g, NaCl 2,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,7 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,4 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g dan larutan aktivator 0,5 mL dilarutkan dalam 350 mL aquades kemudian ditambah larutan asam sitrat hingga pH 5, ditambah larutan buffer sitrat fosfat hingga volumenya menjadi 400 mL dan dituang tiap 200 mL larutan ke dalam erlenmeyer 500 mL. Ditambahkan 15 mL asam oleat sebagai inducer ke dalam masing-masing erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit.

Laktosa 5 g dan dekstrosa 5 g dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian tiap 50 mL larutan dituang ke dalam erlenmeyer 250 mL, ditutup kapas dan kertas dan disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit. Setelah itu larutan didinginkan pada suhu ruang dan masing-masing larutan dipindahkan ke dalam larutan yang berada dalam erlenmeyer 500 mL.

### **3.4.4 Produksi dan Isolasi Enzim**

Kapang yang telah berumur 2 hari dan tumbuh dalam media padat, disuspensi dengan 20 mL akuades steril secara aseptis pada tiap tabung reaksi kemudian dikocok dan dipindahkan ke dalam 250 mL media cair kemudian diinkubasi pada inkubator goyang (shaker) pada kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar sampai setengah fase log yaitu 48 jam (Dwianika, 2007). Suspensi ditambah larutan

buffer sitrat fosfat pH 5 sebanyak 25 mL kemudian disentrifugasi pada temperatur 4 °C selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Endapan dan supernatan yang merupakan ekstrak kasar lipase dipisahkan kemudian supernatan disimpan dalam lemari pendingin.

### **3.4.5 Penentuan Kadar Protein**

#### **3.4.5.1 Pembuatan Kurva Baku Kasein**

Sebanyak 1,0000 g kasein dilarutkan dengan larutan NaOH 0,1 M dalam gelas kimia hingga larut kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm. Dipipet larutan kasein 10000 ppm masing-masing sebanyak (1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; dan 9,00)mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000) ppm. Tiap konsentrasi larutan kasein diambil 2,00 mL, dimasukkan pada tabung reaksi yang berbeda lalu ditambah 8,00 mL reagen Biuret dan 2,00 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5 kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Sebelum mengukur absorbansi larutan standar, ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya pada konsentrasi 833,333 ppm. Larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein (540 nm). Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linear sehingga dihasilkan kurva baku kasein.

#### **3.4.5.2 Penentuan Kadar Protein Lipase**

Kadar protein ekstrak kasar lipase dapat ditentukan dengan metode Biuret, dengan cara sebanyak 2,00 mL larutan ekstrak kasar lipase ditambah 8,00 mL reagen Biuret dan ditambah 2,00 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 50<sup>0</sup> C. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai blanko dipipet 2,00 mL aquades, 8,00 mL reagen Biuret dan 2,00 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5 selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas.

### **3.4.6 Penentuan Aktivitas Lipase**

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (0,0360 g; 0,2774 g) dicampur dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan larutan n-butanol ke dalam larutan campuran sebanyak 5 mL dan larutan ekstrak kasar lipase 2 mL. Campuran diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 50 °C. Kemudian ditambahkan indikator fenolftalein sebanyak 3 tetes dan dititrasi dengan larutan KOH 0,2055 M hingga terjadi perubahan dari larutan tidak berwarna menjadi larutan berwarna merah muda yang tidak hilang dengan pengocokan selama 30 detik. Untuk blanko, dipipet 0,2774 g asam oleat, 5 mL larutan n-butanol, 0,0360 g laktosa dan 2 mL larutan lipase bebas yang dititrasi dengan larutan KOH 0,2055 M pada jam ke nol. Rumus yang digunakan untuk menghitung aktivitas ekstrak kasar lipase yaitu :

$$\text{Aktivitas} = \frac{M_{\text{KOH}} \times (V_{\text{KOH blanko}} - V_{\text{KOH sampel}})}{W_E \times t} \times Mr_{\text{asam oleat}}$$

- Keterangan :
- M KOH : Konsentrasi KOH
  - $W_E$  : Berat enzim
  - $V_{\text{KOH}_{\text{sampel}}}$  : Volume larutan KOH yang digunakan untuk sampel
  - T : Waktu inkubasi
  - $V_{\text{KOH}_{\text{blanko}}}$  : Volume KOH yang digunakan untuk blanko

### 3.4.7 Amobilisasi Lipase dalam Kapsul Ca-Alginat-Kitosan

Amobilisasi ekstrak kasar lipase dilakukan dengan menggunakan konsentrasi Na-alginat 3% w/v. Sebanyak 20 mL larutan Na-Alginat 3 % w/v dicampur dengan 15 mL larutan ekstrak kasar lipase dan diaduk dengan menggunakan magnetik stirer. Campuran ekstrak kasar lipase dan larutan Na-alginat diambil dengan pipet tetes dan diteteskan satu per satu kedalam beaker glass 250 mL yang berisi 50 mL larutan  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Mikrokapsul yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  0,1 M selama 1 jam sampai mikrokapsul tersebut mengeras. Mikrokapsul kemudian dipisahkan dari larutan dengan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak kasar lipase amobil dan filtrat yang merupakan campuran  $\text{CaCl}_2$  yang mengandung ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul Ca-alginat. Kemudian mikrokapsul hasil filtrasi disuspensikan ke dalam larutan kitosan dengan variasi konsentrasi (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 %) w/v. Selanjutnya mikrokapsul yang

telah tersuspensi dalam larutan kitosan diambil satu per satu dengan pipet plastik yang telah dimodifikasi dan diteteskan ke dalam larutan Na-tripolifosfat 3 % w/v dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian mikrokapsul dari larutan Na-tripolifosfat disaring dengan kertas saring dan dicuci mikrokapsul dengan aquades. Filtratnya merupakan larutan campuran Na-tripolifosfat 3 % yang mengandung ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan. Mikrokapsul hasil filtrasi kemudian dimasukkan ke dalam larutan Na-tripolifosfat 1 % w/v dan dibiarkan terendam selama 90 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dan pencucian mikrokapsul dengan aquades, sehingga didapatkan ekstrak kasar lipase yang terikat dalam kapsul Ca-alginat-kitosan dan filtrat yang mengandung ekstrak kasar lipase yang tidak terjebak dalam kapsul Ca-alginat-kitosan.

#### **3.4.8 Penentuan Aktivitas Lipase Amobil**

Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase yang teramobilkan dalam Ca-alginat-kitosan dilakukan seperti pada 3.4.6 hanya saja enzim yang digunakan adalah ekstrak kasar lipase amobil dalam matriks Ca-alginat-kitosan. Massa enzim amobil yang digunakan adalah  $W_E$  ( $W_E = \text{massa enzim} + \text{matriks Ca-alginat-kitosan}$ ).

#### **3.4.9 Penentuan Kadar Protein Lipase Amobil**

Kadar protein lipase amobil ditentukan dengan metode Biuret. Penentuan kadar protein lipase amobil ditentukan dari kadar protein lipase awal dikurangi kadar protein tidak terikat pada kapsul. Untuk menentukan kadar protein lipase yang tidak terikat, maka sebanyak 2,00 mL dari masing-masing filtrat dari lipase amobil setelah penyaringan dan pencucian ditambah dengan 2,00 mL larutan kasein 5000 ppm dan 8,00 mL reagen Biuret, kemudian dikocok dan dinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50 °C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai blanko digunakan campuran 2,00 mL akuades ditambah dengan 2,00 mL buffer sitrat fosfat pH 5 dan 8,00 mL reagen Biuret. Kadar protein lipase ditentukan dengan memplotkan nilai absorbansi enzim terhadap kurva standar.

#### **3.4.10 Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Lipase Amobil**

Kondisi optimum lipase yang akan ditentukan adalah temperatur dan waktu inkubasi. Temperatur optimum dapat ditentukan dengan mengukur aktivitas lipase amobil (3.4.8) dengan variasi temperatur (30; 40; 50; 60 dan 70) °C dengan waktu inkubasi selama 24 jam. Aktivitas lipase dapat diketahui dengan menggambarkan hubungan unit aktivitas terhadap temperatur, aktivitas terbesar menunjukkan temperatur optimum. Untuk waktu inkubasi optimum dapat ditentukan dengan mengukur aktivitas lipase optimum pada variasi waktu inkubasi (8; 16; 24; 36 dan 48) jam pada temperatur optimumnya.

### 3.4.11 Efisiensi Pemakaian Ulang Lipase Amobil

Laktosa dan asam oleat dengan perbandingan mol 1:10 (0,0360 g; 0,2774 g) dicampur dan dimasukkan erlenmeyer. Ditambahkan 5 mL n-butanol kedalam larutan campuran dan 0,50 g ekstrak kasar lipase amobil (3.4.7). Campuran diinkubasi pada temperatur dan waktu inkubasi optimum yang telah ditentukan sebelumnya (3.4.10). Kemudian ditambahkan indikator fenolftalein sebanyak 3 tetes dan dititrasi dengan larutan KOH 0,2055 M sampai larutan berwarna merah muda yang tidak hilang dengan pengocokan selama 30 detik. Sebagai blanko, dilakukanlah titrasi campuran pada jam ke nol. Untuk pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil yang kedua, dilakukan penyaringan terhadap ekstrak kasar amobil. Ekstrak kasar lipase amobil digunakan kembali untuk esterifikasi laktosa dan asam oleat dengan perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan didapatkan aktivitas enzim lipase amobil kedua sampai keenam. Efisiensi pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil dapat ditentukan dengan mengasumsikan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian pertama sebesar 100%. Efisiensi pemakaian ulang ke-n dapat ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Efisiensi pemakaian ulang} = \frac{\text{Aktivitas ke-n}}{\text{Aktivitas ke-1}} \times 100\%$$

Dengan:

Aktivitas ke-n = aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian ulang ke-n

Aktivitas ke-1 = aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian ke-1

### 3.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari variasi konsentrasi kitosan, temperatur dan waktu inkubasi dianalisis dengan menggunakan analisis ragam pola rancangan acak lengkap sederhana (RAL), dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) 5% yang dapat dilihat pada lampiran.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

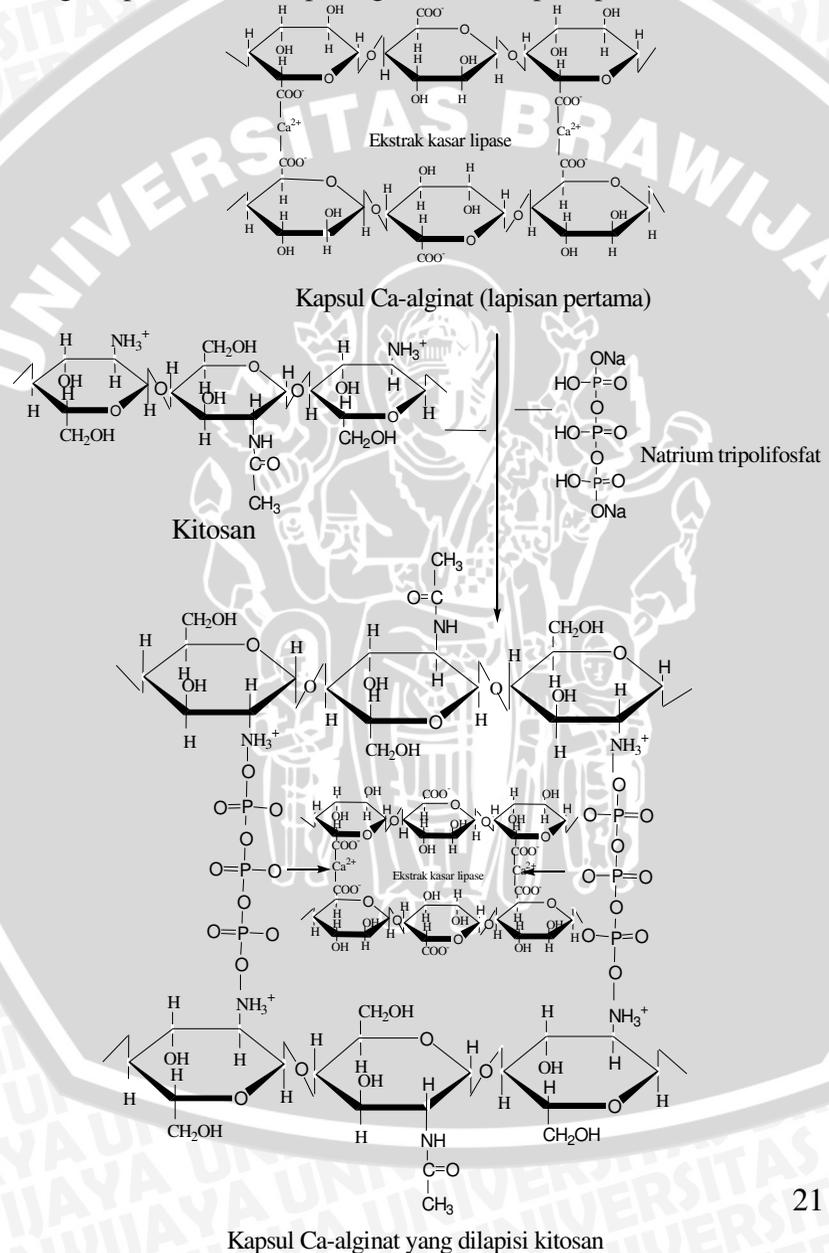
#### **4.1 Pengaruh Amobilisasi Terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase**

Amobilisasi ekstrak kasar lipase dapat dilakukan dengan menggunakan metode penjebakan dalam kapsul Ca-alginat-kitosan untuk membentuk struktur bilayer. Dalam hal ini, ekstrak kasar lipase yang diisolasi dari *Rhizopus oryzae* akan terikat pada kapsul Ca-alginat kemudian dilapisi dengan kitosan sebagai membran kedua.

Ketika ekstrak kasar lipase diamobilkan dalam kapsul Ca-alginat, tidak seluruh ekstrak kasar lipase bebas yang akan terikat pada kapsul Ca-alginat. Hal ini dimungkinkan karena kekuatan mekanik dan kerapatan pori kapsul Ca-alginat yang rendah. Struktur alginat terdiri atas asam manuronat dan asam guluronat. Pori pada kapsul Ca-alginat terbentuk melalui reaksi ikatan silang yang terjadi antara gugus karboksil dari asam guluronat dengan larutan  $\text{CaCl}_2$ . Semakin banyak asam guluronat yang ada dalam kapsul alginat maka jumlah ikatan silang yang terbentuk antara alginat dan  $\text{CaCl}_2$  akan semakin banyak sehingga kekuatan kapsul Ca-alginat meningkat.

Taqquiedin dkk., (2002), menyatakan bahwa pada saat kapsul Ca-alginat disuspensikan dalam larutan kitosan kemudian diteteskan ke dalam larutan Na-tripolifosfat, maka kapsul Ca-alginat akan diselubungi secara seragam oleh kitosan yang berikatan silang dengan larutan Na-tripolifosfat. Ikatan silang yang terbentuk antara kitosan dan Na-tripolifosfat ini terjadi melalui reaksi antara gugus  $-\text{NH}_3^+$  yang ada pada kitosan dengan muatan negatif dari Na-tripolifosfat. Peningkatan jumlah ikatan silang akan menyebabkan peningkatan kerapatan pori kapsul Ca-alginat-kitosan sehingga ekstrak kasar lipase menjadi sulit berdifusi ke larutan di sekitarnya. Kemudian ion-ion fosfat dari Na-tripolifosfat akan membentuk khelat dengan ion kalsium dari kapsul Ca-alginat dan melunakkan

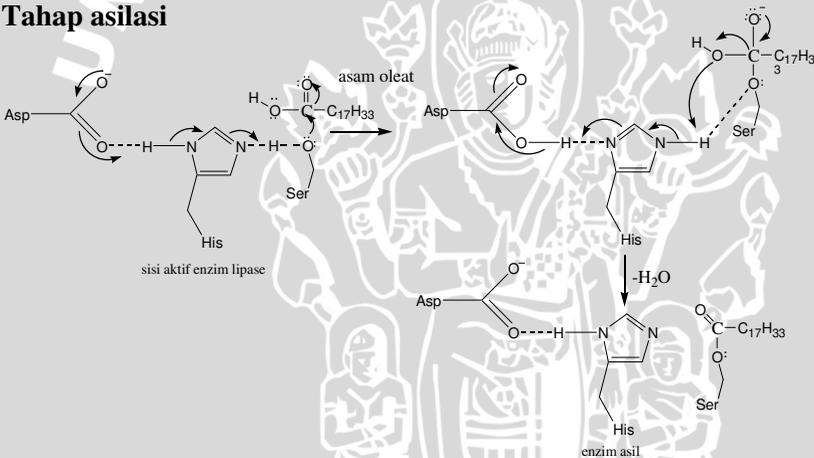
inti alginat sehingga terbentuk struktur bilayer. Menurut Devika dan Varsha, (2006), kemungkinan mekanisme pembentukan struktur bilayer dalam kapsul Ca-alginat-kitosan, yaitu ekstrak kasar lipase yang berada dalam kapsul Ca-alginat kemudian dilapisi kitosan sebagai lapisan kedua, dapat digambarkan seperti pada Gambar 4.1.



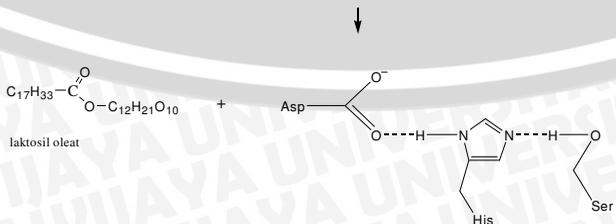
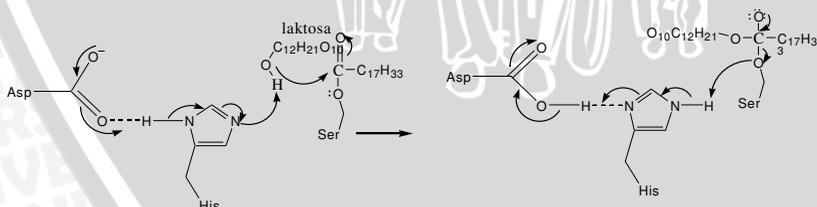
Gambar 4.1 Interaksi antara Ca-alginat dan kitosan membentuk struktur bilayer

Lipase mengkatalisis reaksi antara laktosa dan asam oleat membentuk laktosil oleat. Menurut Smith,dkk., (1992), pembentukan ester secara enzimatik dapat ditentukan dari aktivitas enzim tersebut dalam mengkatalisis reaksi. Hal ini karena enzim bekerja secara spesifik terhadap substrat yang dikatalisisnya. Mekanisme reaksi esterifikasi enzimatik oleh ekstrak kasar lipase dalam mengkatalisis laktosil oleat dapat dilihat pada Gambar 4.2.

### Tahap asilasi



### Tahap deasilasi



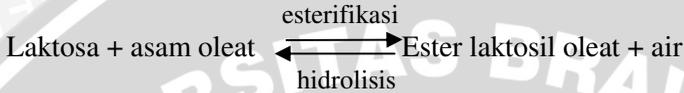
#### Gambar 4.2 Mekanisme esterifikasi enzimatis oleh lipase

Mekanisme esterifikasi enzimatis oleh lipase terjadi pada sisi aktif lipase yaitu pada residu asam amino asam aspartat, histidin dan serin. Mekanisme ini terjadi melalui dua tahap yaitu tahap asilasi dan tahap deasilasi. Pertama-tama, substrat memasuki pori kapsul pengamobil kemudian substrat akan berikatan dengan sisi aktif lipase lalu terjadi tahap asilasi kemudian tahap deasilasi. Pada tahap asilasi, residu asam amino histidin mende protonasi sebagian rantai samping hidroksi dari residu asam amino serin. Gugus hidroksi dari serin ini dapat menyerang gugus karbonil dari asam oleat sehingga terbentuk senyawa antara tetrahedral pertama. Lepasnya  $H_2O$  akan menghasilkan enzim asil dan serin. Selanjutnya, pada tahap deasilasi, gugus hidroksi dari laktosa yang diaktivasi oleh residu asam amino histidin akan menyerang atom karbon pada gugus karbonil dari senyawa antara asil enzim sehingga terbentuk senyawa tetrahedral kedua lalu terbentuk laktosil oleat dan didapatkan enzim lipase kembali. Tahap asilasi berjalan lambat sehingga menentukan laju reaksi. Semakin banyak enzim yang mengikat asam oleat, maka pada tahap deasilasi akan semakin banyak laktosa yang bereaksi dengan asam oleat. Hasil pengukuran aktivitas ekstrak kasar lipase bebas dan lipase yang diamobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan berdasarkan mekanisme esterifikasi enzimatis ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Aktivitas ekstrak kasar lipase bebas dan ekstrak kasar lipase yang diamobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan.

Ekstrak kasar lipase	Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)
Lipase bebas	72,828
Lipase amobil	89,758

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil berbeda dengan aktivitas ekstrak kasar lipase bebas. Adapun reaksi esterifikasi enzimatis oleh lipase adalah sebagai berikut :



Reaksi esterifikasi laktosil oleat menghasilkan air sebagai produk samping. Kelebihan air dapat berpengaruh pada kesetimbangan termodinamik karena peningkatan jumlah air akan menurunkan laju reaksi esterifikasi. Air yang dihasilkan selama esterifikasi berlangsung dapat menghidrolisis laktosil oleat sehingga produk laktosil oleat akan berkurang. Penggunaan membran kitosan dalam proses amobilisasi yang berikatan silang dengan Natrium tripolifosfat dalam kapsul Ca-alginat-kitosan dapat menyerap air yang terdapat dalam membran yang dihasilkan dari proses asilasi (Gambar 4.2). Taqqieddin dkk., (2002), menyatakan bahwa amobilisasi dalam kapsul Ca-alginat-kitosan dengan menggunakan kitosan dengan Na-tripolifosfat sebagai pembentuk ikatan silang dapat mereduksi kandungan air dari membran hingga 80% sehingga dapat meningkatkan aktivitas enzim.

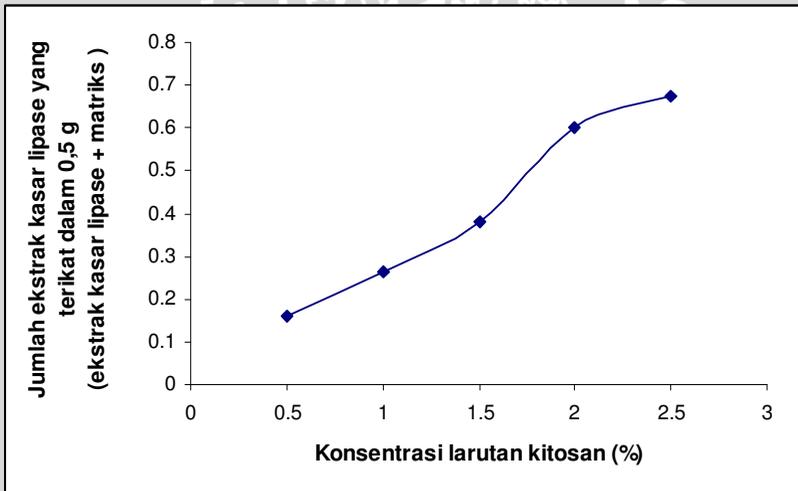
#### **4.2 Pengaruh Variasi Konsentrasi Kitosan Terhadap Jumlah Ekstrak Kasar Lipase yang Terikat pada Kapsul dan Aktivasnya**

Proses amobilisasi ekstrak kasar lipase dilakukan melalui pembentukan struktur bilayer menggunakan variasi larutan kitosan (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0% dan 2,5 %)w/v untuk mengetahui pengaruh konsentrasi larutan kitosan terhadap jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan selama proses amobilisasi dan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam esterifikasi laktosil oleat.

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi larutan kitosan yang digunakan dalam proses amobilisasi akan meningkatkan jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada

kapsul Ca-alginat-kitosan. Hal ini dapat dibuktikan dengan uji statistik yang menunjukkan bahwa  $F_{hitung} > F_{tabel}$  ( $\alpha=0,05$ ) yang berarti bahwa variasi konsentrasi larutan kitosan berpengaruh nyata terhadap jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan. Melalui uji BNT 5% (Tabel L.14.4) dapat diketahui bahwa konsentrasi larutan kitosan 0,5% tidak berbeda nyata dengan larutan kitosan 1% dan 1,5% tetapi berpengaruh nyata terhadap konsentrasi larutan kitosan 2,0% dan 2,5%.

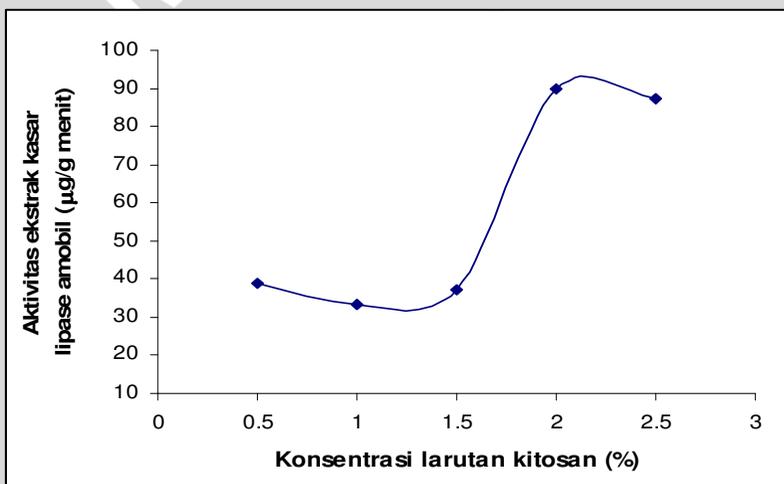
Semakin tinggi konsentrasi larutan kitosan yang digunakan dalam proses amobilisasi, maka jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan akan semakin banyak. Peningkatan konsentrasi larutan kitosan menyebabkan jumlah ikatan silang yang terjadi antara gugus  $-NH_3^+$  yang ada pada kitosan dengan Na-tripolifosfat akan semakin banyak sehingga pori kapsul Ca-alginat-kitosan yang terbentuk akan semakin rapat. Kerapatan pori kapsul Ca-alginat-kitosan yang tinggi dapat menghalangi difusi ekstrak kasar lipase ke lingkungan selama proses amobilisasi.



Gambar 4.3 Pengaruh konsentrasi kitosan dalam amobilisasi terhadap jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam tiap 0,5 g (matriks + ekstrak kasar lipase)

Peningkatan jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan sesuai dengan peningkatan konsentrasi larutan kitosan yang digunakan dalam proses amobilisasi (Gambar

4.3), ternyata tidak diiringi dengan peningkatan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil (Gambar 4.4). Gambar 4.4. menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil cenderung meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi larutan kitosan yang digunakan untuk proses amobilisasi dan aktivitasnya tetap setelah penggunaan konsentrasi larutan kitosan 2,0% w/v. Hal ini dibuktikan melalui uji BNT 5% (Tabel L.14.2), yang menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada larutan kitosan 2,0% tidak berbeda nyata dengan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada konsentrasi larutan kitosan 2,5%. Aktivitas optimum ekstrak kasar lipase amobil terjadi pada saat ekstrak kasar lipase diamobilisasikan dalam larutan kitosan 2% dengan aktivitas sebesar 89,758  $\mu\text{g/g}$  menit.



Gambar 4.4 Pengaruh konsentrasi kitosan dalam amobilisasi ekstrak kasar lipase terhadap aktivitas

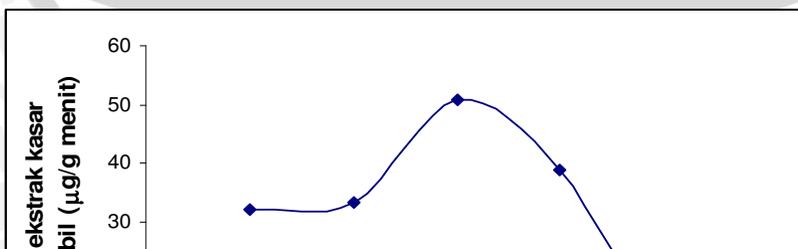
Semakin banyak ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan akan menyebabkan interaksi yang terjadi antara substrat dengan ekstrak kasar lipase akan semakin optimal sehingga laktosil oleat yang dihasilkan meningkat. Peningkatan laktosil oleat menunjukkan peningkatan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil. Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada konsentrasi kitosan 0,5% lebih besar dibandingkan konsentrasi kitosan 1% karena pada konsentrasi kitosan 0,5% kapsul Ca-alginat-kitosan yang terbentuk belum sempurna. Penggunaan konsentrasi kitosan yang terlalu rendah pada proses amobilisasi akan menyebabkan pembentukan ikatan silang yang terjadi antara kitosan dengan Na-tripolifosfat sedikit sehingga pori kapsul yang terbentuk kurang rapat dan difusi substrat ke dalam kapsul lebih mudah terjadi. Namun sebaliknya, penggunaan konsentrasi larutan kitosan yang terlalu tinggi dalam proses amobilisasi menyebabkan kerapatan pori kapsul Ca-alginat-kitosan akan semakin tinggi pula. Peningkatan kerapatan pori kapsul Ca-alginat-kitosan yang terlalu tinggi dapat menghambat difusi substrat ke dalam kapsul. Hal ini terlihat pada Gambar 4.4 yang menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil menurun pada konsentrasi larutan kitosan 2,5% w/v.

#### 4.3. Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

##### 4.3.1 Penentuan Temperatur Optimum

Kemampuan katalitik enzim dipengaruhi oleh temperatur. Semakin tinggi temperatur maka tumbukan yang terjadi antara enzim dengan substrat akan semakin sering terjadi sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk semakin banyak dan produk yang dihasilkan juga lebih banyak.

Temperatur optimum lipase adalah temperatur yang sesuai untuk lipase dalam meningkatkan kemampuan katalisisnya sehingga aktivitasnya akan menjadi semakin besar. Penentuan temperatur optimum lipase amobil dilakukan pada variasi temperatur (30, 40, 50, 60 dan 70) °C pada konsentrasi kitosan 2%. Hasil pengukuran aktivitas ekstrak kasar lipase amobil untuk penentuan temperatur optimum dapat dilihat pada Gambar 4.5.



#### Gambar 4.5 Penentuan temperatur optimum aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa aktivitas optimum dari ekstrak kasar lipase amobil terjadi pada temperatur 50 °C, dengan aktivitas sebesar 38,698 µg/g menit. Berdasar analisa uji statistik, didapatkan bahwa  $F_{hitung} > F_{tabel}$  (pada taraf nyata  $\alpha = 0,05$ ) yang berarti bahwa variasi temperatur berpengaruh nyata terhadap aktivitas lipase amobil. Uji BNT (5%) (Tabel L.14.6) juga memperlihatkan bahwa temperatur 50 °C memberikan pengaruh beda nyata terhadap temperatur 30 °C, 40 °C, 60 °C dan 70 °C.

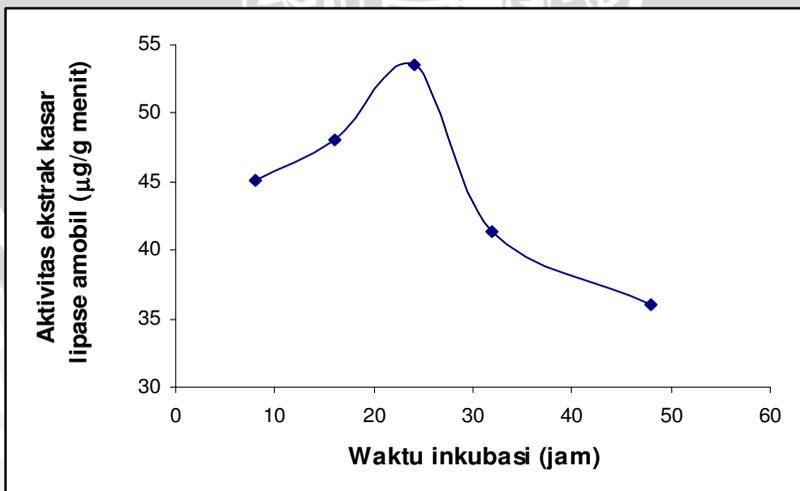
Kenaikan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dari temperatur 30 °C sampai 50 °C terjadi karena mobilitas substrat menuju enzim semakin besar sehingga terjadi peningkatan jumlah tumbukan antara enzim dengan substrat dan kompleks enzim-substrat yang terbentuk juga semakin banyak. Peningkatan kompleks enzim-substrat akan mengkatalisis pembentukan ester yang lebih banyak dan lebih stabil. Penurunan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil terjadi setelah temperatur 50 °C. Hal ini terjadi karena enzim adalah protein dimana semakin tinggi temperatur maka enzim akan terdenaturasi secara parsial. Denaturasi ekstrak kasar lipase menyebabkan putusannya ikatan sekunder, tersier dan kuaterner, dan putusannya ikatan ini menimbulkan perubahan bentuk (konformasi lipase) sehingga ekstrak kasar lipase kehilangan sisi aktifnya dan sulit untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi. Temperatur optimum ekstrak kasar lipase amobil adalah 50 °C. Temperatur ini sama dengan temperatur

optimum ekstrak kasar lipase bebas dari *Rhizopus oryzae* dari penelitian (Anugrawati, 2007).

### 4.3.2 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum ekstrak kasar lipase amobil dilakukan pada kondisi optimum yang telah didapatkan dari penelitian yaitu pada konsentrasi larutan kitosan 2%, temperatur 50 °C dengan variasi waktu inkubasi (8, 16, 24, 32 dan 48) jam. Waktu inkubasi diperlukan untuk proses pembentukan kompleks enzim substrat dimana kompleks ini diperlukan dalam reaksi esterifikasi untuk pembentukan laktosil oleat. Hasil penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase ditampilkan pada Gambar 4.6.

Gambar 4.6 memperlihatkan terjadinya peningkatan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada waktu inkubasi 8 jam sampai 24 jam dan terjadi penurunan aktivitas setelah jam ke-24. Waktu inkubasi optimum terjadi pada jam ke-24 dengan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil sebesar 53,479  $\mu\text{g/g}$  menit. Berdasarkan hasil uji analisa statistik yang telah dilakukan, diperoleh nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  (taraf nyata  $\alpha = 0,05$ ), yang menunjukkan bahwa variasi waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil. Uji BNT (5%) (Tabel L.14.8) juga memperlihatkan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase pada waktu inkubasi 24 jam memberikan pengaruh beda nyata terhadap waktu inkubasi (8; 16; 32 dan 48) jam.



#### Gambar 4.6 Penentuan waktu inkubasi optimum aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Peningkatan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada waktu inkubasi 8 jam sampai 24 jam terjadi karena peningkatan waktu kontak antara permukaan (sisi aktif) lipase dengan substrat semakin maksimal sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk juga akan semakin banyak. Jika kompleks enzim-substrat yang terbentuk banyak, maka jumlah laktosil oleat yang dihasilkan selama proses esterifikasi akan meningkat. Setelah waktu inkubasi 24 jam terjadi penurunan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil. Hal ini dimungkinkan karena sisi aktif lipase telah jenuh, dimana pada saat waktu inkubasi optimum seluruh sisi aktif ekstrak kasar lipase telah berikatan dengan substrat. Apabila sisi aktif ekstrak kasar lipase telah jenuh dengan substrat maka lamanya waktu inkubasi sudah tidak berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Hal ini menyebabkan penurunan kemampuan ekstrak kasar lipase dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi sehingga laktosil oleat yang dihasilkan juga lebih sedikit. Waktu inkubasi optimum ekstrak kasar lipase amobil pada konsentrasi kitosan 2% dan temperatur 50 °C ini sesuai dengan hasil penelitian Anugrawati, (2007), yang menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum aktivitas ekstrak kasar lipase *Rhizopus oryzae* bebas adalah pada jam ke-24.

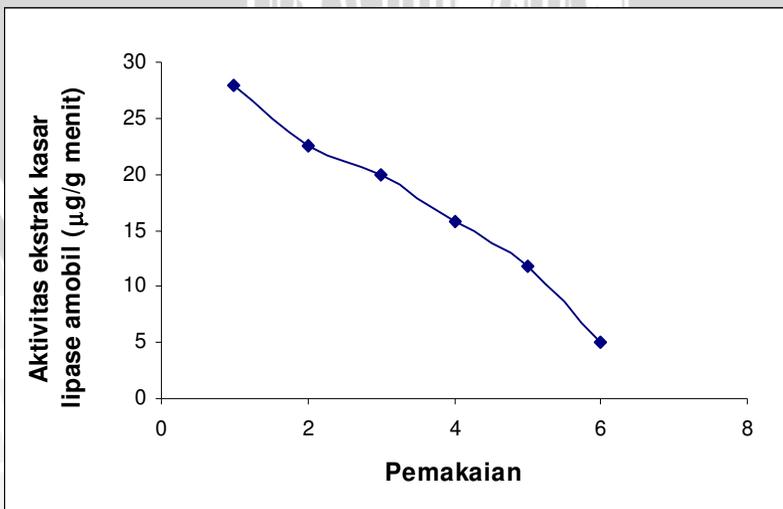
#### 4.4. Efisiensi Pemakaian Ulang Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Penentuan efisiensi pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil dilakukan pada kondisi optimum yang telah didapatkan, yaitu pada konsentrasi larutan kitosan 2%, temperatur 50 °C dan waktu inkubasi 24 jam. Dengan mengetahui efisiensi pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil, maka dapat diketahui kelayakan penggunaan ulang ekstrak kasar lipase amobil dalam reaksi esterifikasi. Dalam hal ini, aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian pertama diasumsikan sebesar 100%.

#### Tabel 4.2 Pengaruh pemakaian ulang terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Pemakaian Ulang	Aktivitas Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)	Efisiensi (%)
I	27,947	100
II	22,573	80,77
III	19,887	71,16
IV	15,856	56,74
V	11,824	42,31
VI	5,105	18,27

Berdasarkan Tabel 4.3 dan Gambar 4.7 dapat diketahui bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil menurun setelah beberapa kali pemakaian ulang sehingga efisiensi pemakaian ulangnya juga menurun. Uji analisa statistik menunjukkan bahwa  $F_{hitung} > F_{tabel}$  (pada taraf nyata  $\alpha = 0,05$ ), ini berarti bahwa pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil berpengaruh nyata terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil. Uji BNT (5%) (Tabel L.14.10) memperlihatkan bahwa aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian I berbeda nyata dengan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian II. Aktivitas ekstrak kasar lipase pada pemakaian II tidak berbeda nyata dengan pemakaian III tetapi berbeda nyata dengan pemakaian IV, V dan VI. Berdasarkan hasil uji BNT (5%) ini dapat diasumsikan bahwa ekstrak kasar lipase amobil masih layak untuk digunakan hingga pemakaian ketiga dengan efisiensi sebesar 71,16 %.



Gambar 4.7 Pengaruh pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil terhadap aktivitas

Penurunan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil untuk efisiensi pemakaian ulang setelah pemakaian lipase amobil yang pertama, kemungkinan disebabkan kekuatan kapsul Ca-alginat-kitosan yang makin lemah dan terjadi kerusakan pori pada kapsul. Penggunaan ekstrak kasar lipase amobil secara berulang-ulang kemungkinan dapat melemahkan ikatan silang yang terbentuk, karena adanya deprotonasi dari gugus  $-NH_3^+$  sehingga ekstrak kasar lipase mudah terlepas dari kapsul.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi larutan kitosan optimum yang digunakan untuk proses amobilisasi adalah 2% dengan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil sebesar 89,578  $\mu\text{g/g}$  menit.

2. Ekstrak kasar lipase amobil memiliki kondisi optimum yaitu temperatur optimum 50 °C dan waktu inkubasi optimum 24 jam.
3. Ekstrak kasar lipase yang diamobilisasi dalam kapsul Ca-alginat-kitosan dapat digunakan 3 kali pemakaian dengan efisiensi pemakaian ketiga adalah 71,16 %.

## 5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya, sebaiknya juga dipelajari optimasi lama waktu perendaman kapsul Ca-alginat-kitosan dalam Natripolifosfat untuk mengetahui efisiensi pembentukan ikatan silang sehingga kapsul Ca-alginat-kitosan lebih kuat dan penggunaan ekstrak kasar lipase *Rhizopus oryzae* amobil pada substrat asam lemak yang lain untuk reaksi esterifikasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anugrawati R., 2007, **Penentuan Suhu dan Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Lipase dari *Rhizopus Oryzae* untuk Pembuatan Ester Laktosa**, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
- Belitz, H. D dan Grosch W., 1987, **Food Chemistry**, Springer Verlag, Berlin, pp 118-119

Burak, E., 2004, **Cells Encapsulation Into Porous Alginates Fibers**, Project M04-C113, National Textile Center Annual Report, Clemson University, pp 4-5

Catarina M. S., Antonio J. R., Figueiredo M., Ferreira D, Veiga F., 2006, **Microencapsulation of Hemoglobin in Chitosan-coated Alginate Microspheres Prepared by Emulsification/Internal Gelation**, *AAPS Journal*, (4)

Chaplin M., 2007, **Alginate**, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>, Diakses tanggal 8 November 2007

Chibata I., Horitsu H., Adachi S., dan Takasiho Y., 1978, **Immobilized Enzymes**, John Wiley and sons inc., New York, pp 213-219

Conn, E. E., Paul K. S., George B. dan Roy H. D., 1987, **Outlines Of Biochemistry**, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 115-116

Dandavate, V. dan Datta M., 2005, **Reusability of Surfactan-coated *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Gelatin Microemulsion-based Organel for Ethyl Isovalerate Synthesis**: *Journal of Microbial and Biotechnology*, 1-6

Devika, R.B dan Varsha D.R., 2006, **Studies on Effect of pH on Cross-Linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note**, *AAPS PharmSciTech*, 7(2):1-10

Dwianika, C.F., 2007, **Pemurnian Enzim Lipase dari *Rhizopus oryzae* dengan Menggunakan Metode Pengendapan Bertingkat Menggunakan Amonium Sulfat**, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

Ellis D., 2007, ***Rhizopus Oryzae***, [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions), Diakses tanggal 11 November 2007

- Glicsman, M., 1982, *Food Hydrocolloid*, CRC Press Inc., Florida, pp.13-14
- Judoamidjojo, R.M., Said G.E dan Hartoto G., 1989, **Biokonversi**, Depdikbud, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Pusat Universitas, IPB, Bogor, hal.35, 37.
- Julitera, M., 2008, **Optimasi Produksi Enzim Lipase dari *Rhizopus Oryzae* untuk Esterifikasi Laktosa dengan Asam Oleat**, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
- Klinkeberg, G., Lystad K.Q dan Levine D.W., 2006, **Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis ssp. Lactis* in Chitosan and Alginate Coated Beads**, *J. Dairy Science*, 84:1118-1127
- Le-Tien, C., Millette M., Mircea A. dan Monique L., 2004, **Modified Alginate and Chitosan for Lactid Acid Bacteria Immobilization**, *Biotechnol.Appl.Biochem.*, 39:347-354
- Lee Dong H., Jung Mo K., Hyun Yong S., dan Seung Wook K., 2006, **Optimization of Lipase Preatment Prior to Lipase Immobilization to Prevent Loss of Activity**, *J.Microbial.Biotechnol*, 17(4), 650-654
- Lehninger, A. L., 1992, **Dasar – dasar Biokimia**, Alih Bahasa: Thenawijaya, Erlangga, Jakarta, hal.313-324
- Liu, C., Bai R dan Nan L., 2007, **Sodium Tripolyphosphate (TPP) Crosslinked Chitosan Membranes and Application in Humic Acid Removal**, Department of Chemical and Enviromental Engineering, National University of Singapore, Singapura
- Mortazavian, A., Seyed H. R., Mohammad R. E., dan Sara S., 2007, **Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganism**, *Iriani Journal of Biotechnology*, Vol.5, No.1, 2007
- Palmer, T., 1991, **Undersatanding Enzymes**, Ellis Harwood Limited, England, pp 81-83
- Pereira, E. B., Zanin G. M., dan Castro H. F., 2003, **Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for**

- Esterification Reactions**, 2003, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 4: 1-15
- Putranto R. A., Djoko S., Tri panji, Suharyanto & Asmini B., 2006, **Karakterisasi Gen Penyandi Lipase dari Kapang *Rhizopus Oryzae* dan *Absidia corymbifera***, *Menara Perkebunan*, 2006, 74(1), 23-32
- Rohmhaas, 2006, **Immobilized Enzyme**, <http://www.rohmhaas.com/ionexchange/Pharmaceuticals/enzymes.htm>, Diakses tanggal 11 November 2007
- Sakeroglu, G., Fadiloglu S., dan Ibanoglu E., **Production and Characterization of Isopropyl Laurate Using Immobilized Lipase**, *J.Eng.Env.Sci.Turkish.TURBITAK*, Diakses 24 November 2007, hal. 241-246
- Saxena, R. K., Kumar G. P., dan Rani Gupta, 2005, **Microbial of Lipase**, <http://www.ias.ac.in/curresci/jur10/article8.html>, Diakses tanggal 11 November 2007
- Simanjuntak R., 2005, **Karakterisasi Lipase *Bacillus megaterium* yang Diamobilisasi dalam Ca-alginat**, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
- Suhartono, 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, P.A.U Bioteknologi, IPB, Bogor, hal.112-114
- Taqieddin, E., Carolyn L. dan Mansoor, A., 2002, **Perm-Selective Chitosan Alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology**, *The official Journal of ISPE*, 22(6):1-3.
- Tayebbeh D. F., Ebrahim V. F., dan Hamid M., 2006, **Swelling Behaviour of Alginate-N,O-Carboxymethyl Chitosan Gel Beads Coated by Chitosan**, *Iranian Polymer Journal*, 15(5):405-406.
- Vimal K. M., dan Hemamalini K., 2007, **Comparative Studies On The Dissolution Profile of Flurbiprofen From Coated and Uncoated Alginate Microspheres**, *Pharmacologyonline 2*: 187-202 (2007)

Wang, Sun N., 2006, **Amobilisasi Enzim dengan Metode Penjebakan Gel**, <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab11.htm>, Diakses tanggal 11 November 2007

West, E. S., 1996, **Textbook of Biochemistry**, 4th edition, The Maxmillan Company, London, pp 324-327, 334-336

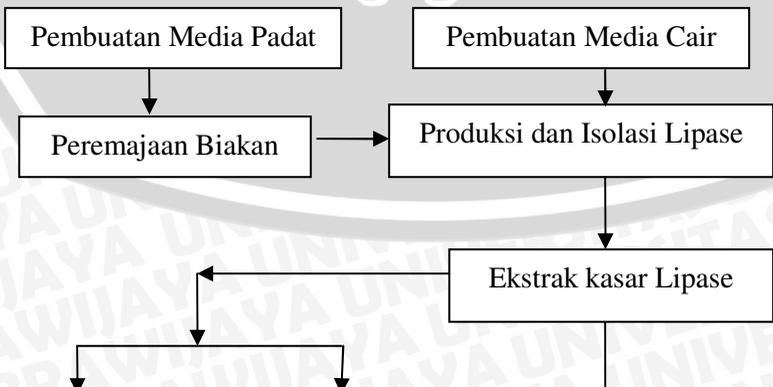
Winarno, F. G., 1995, **Enzim Pangan**, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal 55-56, 66-71

Wiseman, A., 1985, **Handbook of Enzym Biotechnology**, Ellis Horwood Limited, England, hal.149-191

Wong, D. W. S., 1995, **Food Enzim Structure and Mechanism**, Chapman & Hill, New York, hal. 104-107



### Lampiran 1. Alur Penelitian



# UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 2. Diagram Kerja Penelitian

### L.2.1 Pembuatan Media Padat

50 gram kentang

- dikupas kulitnya, dibersihkan
- dipotong kecil-kecil

- dididihkan dalam 200 mL akuades selama 1 jam
- disaring

Filtrat

- ditambahkan 5 g dekstrosa dan dipanaskan hingga larut
- didinginkan
- ditambah 20 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5
- ditambah 3 g agar dan dipanaskan hingga mendidih

Larutan

- dituang sebanyak 5 mL kedalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklave 121 °C, 15 psi
- diletakkan dalam posisi miring
- dibiarkan memadat selama 24 jam

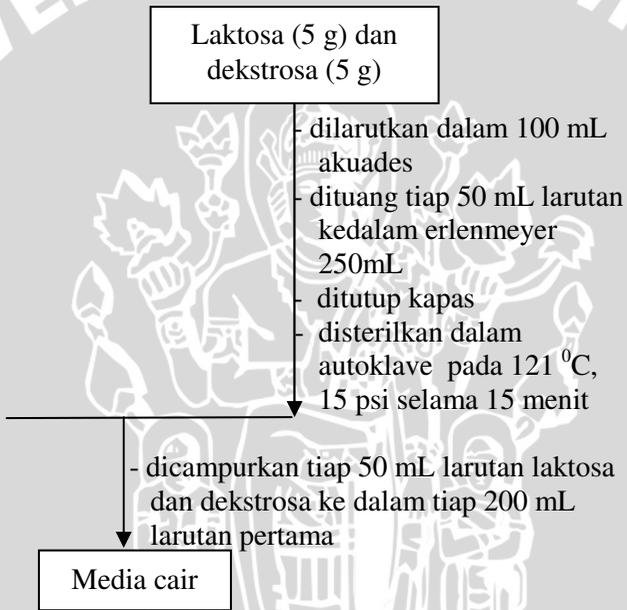
Media padat

## L.2.2 Pembuatan Media Cair

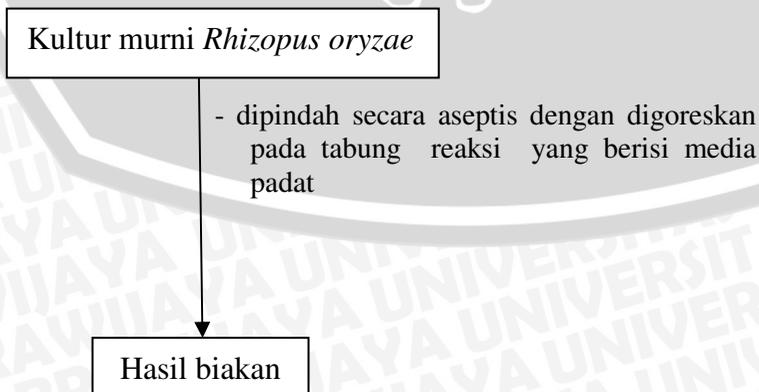
Pepton 0,75 g, ekstrak yeast 2,5 g, NaCl 2,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6,7 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8,4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25g, larutan aktivator 0,5 mL

- dilarutkan dalam 350 mL akuades
- ditambah larutan asam sitrat hingga pH 5

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

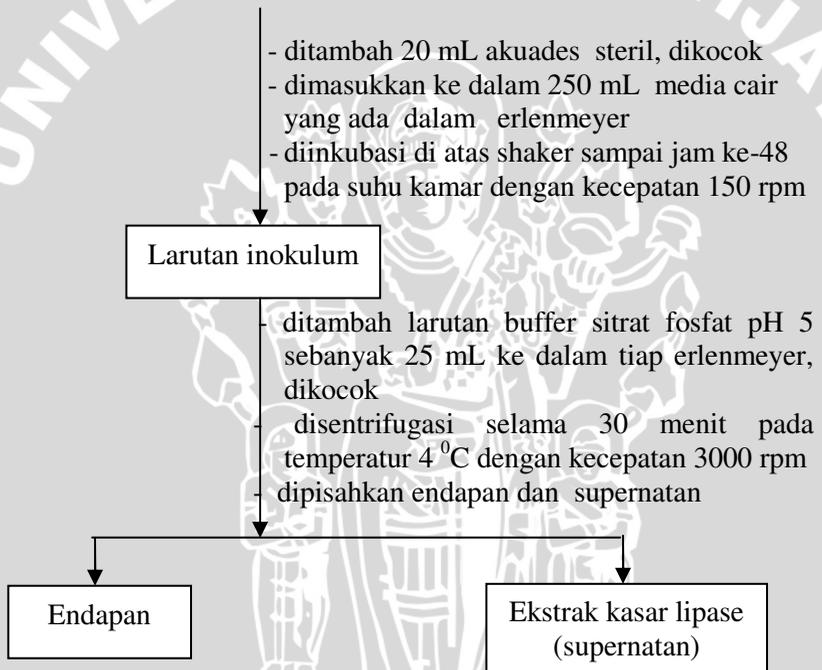


### L.2.3 Peremajaan Biakan murni *Rhizopus oryzae*



- dibakar mulut tabung dengan api dari bunsen, kemudian ditutup dengan kapas
- diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari

## L.2.4 Produksi dan Isolasi Enzim



## L.2.5 Pembuatan Kurva Baku Kasein

### L.2.5.1 Pembuatan Larutan Stok Kasein 10000 ppm

1,0000 g kasein

- dilarutkan dengan larutan NaOH 0,1 M dalam gelas kimia

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

Larutan stok kasein 10000 ppm

- dipipet sebanyak (1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00 dan 9,00) mL
- dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas
- dikocok sampai homogen

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

#### L.2.5.2 Penentuan $\lambda$ max. Kasein

2,00 mL larutan kasein 5000 ppm

- ditambah 8,00 mL reagen Biuret
- ditambah 2,00 mL larutan buffer sitrat fosfat pH5
- dikocok dan diinkubasi pada suhu 50 °C
- diukur absorbansi pada  $\lambda$  460-650 nm
- dicari  $\lambda$  max.nya

$\lambda$  max

#### L.2.5.3 Penentuan Kurva Baku Kasein

2,00 mL Larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm

- ditambah 8,00 mL reagen biuret

- ditambah 2,00 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 5
- dikocok
- diinkubasi selama 30 menit pada 50 °C
- diukur absorbansinya pada  $\lambda$  maksimum

Kurva baku kasein

### L.2.6 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Lipase

Larutan enzim

- dipipet sebanyak 2,00 mL
- ditambahkan 8,00 mL reagen biuret dan 2,00 mL larutan kasein 5000 ppm, dikocok
- didiamkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50 °C
- diukur serapannya pada  $\lambda$  max. kasein

Absorbansi

### L.2.7 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Bebas

Laktosa : asam oleat (1:10)  
(0,036 g; 0.2774 g)

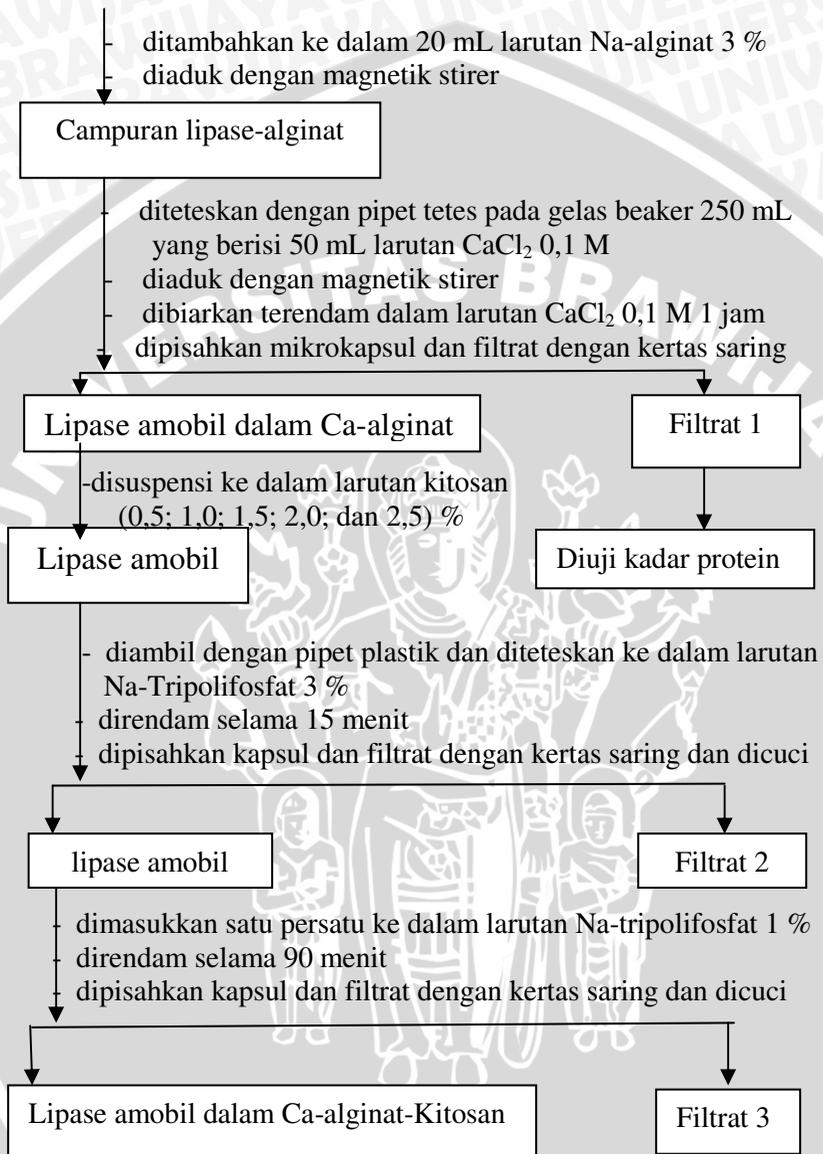
- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL larutan n-butanol
- ditambahkan 2 mL larutan ekstrak kasar lipase
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C
- ditambah 3 tetes fenolftalein
- dititrasi KOH 0,2055 M sampai berwarna merah muda

Aktivitas



### L.2.8 Amobilisasi Ekstrak Kasar Lipase dalam Kapsul Ca-Alginat-Kitosan

15 mL ekstrak kasar lipase



### L.2.9 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Laktosa : asam oleat (1:10)  
(0,036 g; 0,2774 g)

- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL larutan n-butanol
- ditambahkan 0,50 g ekstrak kasar lipase amobil
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C
- ditambah 3 tetes fenolftalein
- dititrasi dengan KOH 0,2055 M sampai berwarna merah muda

Aktivitas

### L.2.10 Penentuan Kadar Protein Lipase yang Tidak Terikat pada Kapsul Ca-alginat-kitosan

Filtrat

- dipipet sebanyak 2,00 mL
- ditambahkan 8,00 mL reagen biuret dan 2,00 mL larutan kasein 5000 ppm, dikocok
- didiamkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50 °C
- diukur serapannya pada  $\lambda$  max. kasein

Absorbansi

### L.2.11 Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

#### L.2.11.1 Temperatur Optimum

Lipase amobil

- ditentukan temperatur optimum dengan waktu inkubasi 24 jam dengan mengukur aktivitasnya pada variasi temperatur 30 °C; 40 °C; 50 °C; 60°C dan 70 °C

Temperatur optimum

### L.2.11.2 Waktu Inkubasi Optimum

Lipase amobil

- ditentukan waktu inkubasi optimum pada temperatur optimum dengan mengukur aktivitasnya pada variasi waktu inkubasi 8, 16, 24, 32 dan 48 jam.

Waktu inkubasi optimum

### L.2.12 Efisiensi Pemakaian Ulang Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Laktosa : asam oleat (1:10)  
(0,036 g; 0,2774 g)

- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan 5 mL larutan n-butanol
- ditambahkan 0,50 g ekstrak kasar lipase amobil
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50<sup>0</sup> C
- ditambah 3 tetes fenolftalein
- dititrasi dengan KOH 0,2055 M sampai berwarna merah muda
- disaring dan ditampung dalam erlenmeyer

Lipase amobil

Filtrat

- digunakan kembali untuk reaksi esterifikasi antara asam oleat dan laktosa
- perlakuan diulang sebanyak 5 kali

Aktivitas lipase ke-2 sampai ke-6

### Lampiran 3. Preparasi Larutan

#### 3.1 Pembuatan Larutan Stok Kasein

Ditimbang 1,0000 g kasein, dilarutkan dengan NaOH 0,1 M, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

### **3.2. Pembuatan Larutan Kasein Standar**

Disiapkan 9 buah labu ukur 10 mL, masing-masing diisi dengan larutan stok kasein 10000 ppm sebanyak 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; dan 9,00 mL, kemudian diencerkan sampai tanda batas dengan akuades sehingga diperoleh larutan kasein standar 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 dan 9000 ppm.

### **3.3. Pembuatan Larutan Na-alginat 3% (w/v)**

Ditimbang 3,0000 g Na-alginat dan dilarutkan ke dalam 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai larutan homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas (larutan Na-alginat 3% w/v).

### **3.4. Pembuatan larutan Natrium tripolifosfat**

Ditimbang 3,0000 g Natrium tripolifosfat dan dilarutkan ke dalam 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian diencerkan dalam labu ukur 100 mL dengan akuades sampai tanda batas (untuk membuat larutan Natrium tripolifosfat 3% w/v).

### **3.5. Pembuatan Larutan Kitosan**

Larutan kitosan disiapkan dengan cara melarutkan polimer kitosan sebanyak 1 g kedalam 100 mL asam asetat 0,1 M sambil diaduk dengan menggunakan pengaduk magnet (untuk membuat larutan kitosan 1% w/v)

### **3.6. Pembuatan Larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1 M**

Ditimbang 1,4700 g CaCl<sub>2</sub>, dilarutkan dalam 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

### **3.7. Pembuatan Larutan Indikator fenolftalein 0,1%**

Ditimbang 0,1000 g fenolftalein kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL etanol 70%.

### **3.8. Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,1 M (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)**

Ditimbang 4,8000 g asam sitrat, lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam beaker gelas 100 mL. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

### **3.9. Pembuatan larutan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M**

Ditimbang 2,8400 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

### **3.10. Larutan Buffer Sitrat fosfat pH 5**

Sebanyak 100 mL larutan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M dan 50 mL larutan asam sitrat 0,1 M dimasukkan kedalam gelas kimia, lalu ke dalamnya dimasukkan pengaduk magnetik. Elektroda pHmeter dipasang dan dicelupkan pada larutan. Dilakukan penambahan asam sitrat sedikit demi sedikit ke dalam larutan kemudian diukur pH larutan hingga akhirnya tercapai pH 5.

### **3.11. Pembuatan Reagen Biuret**

Ditimbang 0,3750 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan 1,8000 g Natrium Kalium Tartrat (NaKC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O) dan dilarutkan dengan 100 mL akuades lalu dipindah ke dalam labu ukur 250 mL. Setelah itu, ditambahkan 75 mL larutan NaOH 10% w/v sambil dikocok dan diencerkan sampai tanda batas.

### **3.12. Pembuatan Larutan NaOH 10% (w/v)**

Ditimbang 10,0000 g NaOH dan dilarutkan ke dalam 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, diaduk hingga larut dan didinginkan kemudian diencerkan dalam labu ukur 100 mL dengan akuades sampai tanda batas (larutan NaOH 10% w/v).

### **3.13. Pembuatan Larutan KOH 0,2 M**

Mr KOH = 56 g/mol. Untuk mendapatkan KOH 0,2 M dilarutkan 2,8000 g KOH dengan etanol 70% dalam gelas ukur 50

mL kemudian dituangkan ke dalam labu ukur 250 mL dan ditandabatkan dengan etanol 70%.

### 3.14. Pembakuan KOH 0,2 M

Ditimbang 1,2600 g asam oksalat dihidrat dan dilarutkan dalam gelas beaker 50 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Dipipet 10,00 mL larutan asam oksalat dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, setelah itu ditambahkan 2-3 tetes indikator pp, dititrasi dengan KOH 0,2 M sampai larutan berwarna merah muda dan dicatat volume KOH yang digunakan. Dilakukan titrasi sebanyak 3 kali.

### 3.15. Pembuatan Larutan Aktivator

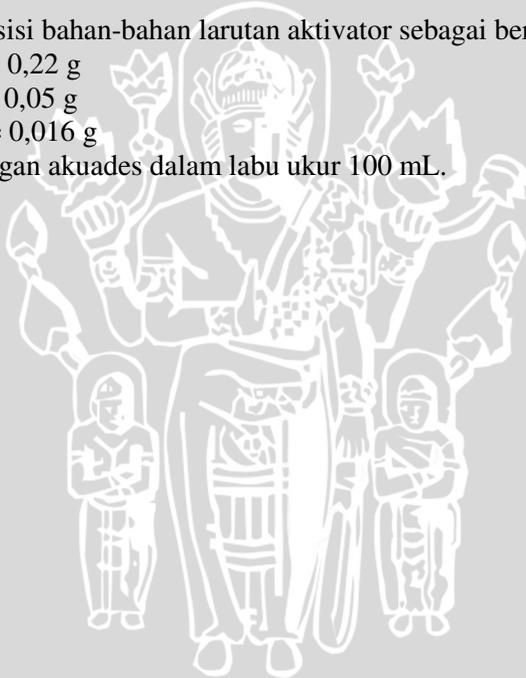
Komposisi bahan-bahan larutan aktivator sebagai berikut :

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

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

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

Dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL.



## Lampiran 4. Perhitungan Preparasi Larutan

### 4.1. Pembuatan Larutan $\text{CaCl}_2$ 0,1 M

Larutan  $\text{CaCl}_2$  0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (BM = 147 g/mol)

$$\begin{aligned}\text{Mol CaCl}_2 &= [\text{CaCl}_2] \times \text{Vol.larutan} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol}\end{aligned}$$

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

Jadi,  $\text{CaCl}_2$  yang harus ditimbang untuk membuat larutan  $\text{CaCl}_2$  0,1M adalah 1,47 g

#### 4.2 Pembuatan Larutan asam sitrat 0,1 M ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )

Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat sebanyak 250 mL (BM = 192 g/mol)

$$\begin{aligned}\text{Mol asam sitrat} &= [\text{asam sitrat}] \times \text{Vol.larutan} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \\ &= 0,025 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{g asam sitrat} &= \text{mol asam sitrat} \times \text{BM asam sitrat} \\ &= 0,025 \text{ mol} \times 192 \text{ g/mol} \\ &= 4,80 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, asam sitrat yang harus ditimbang untuk membuat larutan asam sitrat 0,1 M adalah 4,80 g

#### 4.3 Pembuatan Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M

Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM=142 g/mol)

$$\begin{aligned}\text{Mol Na}_2\text{HPO}_4 &= [\text{Na}_2\text{HPO}_4] \times \text{Vol.larutan} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{g Na}_2\text{HPO}_4 &= \text{mol Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{BM Na}_2\text{HPO}_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol} \\ &= 2,84 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  yang harus ditimbang untuk membuat larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M adalah 2,84 g

#### 4.4 Pembuatan Larutan Buffer sitrat fosfat pH 5

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan dibuat dengan mencampur larutan asam sitrat 0,1 M dan larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M berdasarkan persamaan dibawah ini:

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

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

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

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

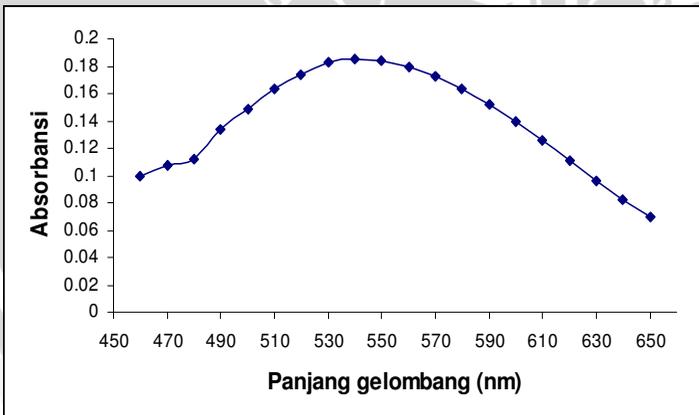
$$2,399 = \frac{20}{0,1V}$$

$$V = 83,37$$

## Lampiran 5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

Tabel L.5.1 Absorbansi Larutan Standar Kasein 833,333 ppm

Panjang gelombang (nm)	A1	A2	A rerata
650	0,069	0,070	0,070
640	0,081	0,082	0,082
630	0,096	0,096	0,096
620	0,111	0,110	0,111
610	0,126	0,125	0,126
600	0,140	0,138	0,139
590	0,153	0,151	0,152
580	0,164	0,162	0,163
570	0,174	0,171	0,173
560	0,181	0,178	0,180
550	0,185	0,182	0,184
540	0,186	0,183	0,185
530	0,183	0,180	0,183
520	0,175	0,172	0,174
510	0,164	0,161	0,163
500	0,150	0,147	0,149
490	0,135	0,132	0,134
480	0,121	0,119	0,112
470	0,109	0,107	0,108
460	0,100	0,097	0,099

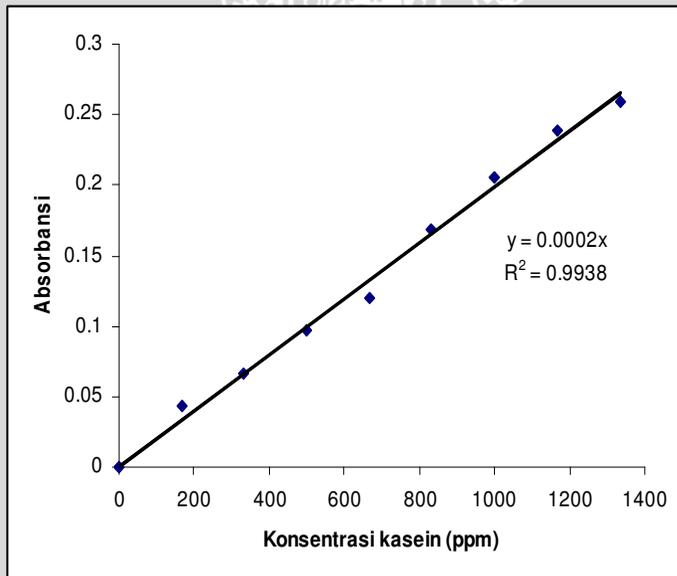


Gambar L.5.1 Kurva serapan larutan kasein

**Lampiran 6. Pembuatan Kurva Baku Kasein**

Tabel L.6.1 Data Absorbansi Larutan Kasein pada Panjang Gelombang 540 nm

Kasein (ppm)	A1	A2	A3	A rerata
0	0	0	0	0
166,667	0,042	0,042	0,045	0,043
333,333	0,067	0,063	0,069	0,066
500,000	0,098	0,093	0,100	0,097
666,667	0,123	0,120	0,116	0,120
833,333	0,180	0,174	0,176	0,168
1000,000	0,206	0,196	0,200	0,206
1166,667	0,237	0,241	0,239	0,239
1333,333	0,308	0,310	0,310	0,259



Gambar L.6.1 Kurva standar kasein

## Lampiran 7. Pembakuan Larutan KOH

Tabel L.7.1 Pembakuan larutan KOH 0,2 M dengan Asam Oksalat 0,1 M

Volume Asam Oksalat (mL)	Volume KOH (mL)			Total (mL)	Volume KOH rata-rata (mL)
	1	2	3		
10	9,70	9,70	9,80	29,20	9,73

Contoh perhitungan :

$$\text{Vol. As. oksalat rerata} = \frac{(9,70 + 9,70 + 9,80) \text{ mL}}{3} = 9,73 \text{ mL}$$

Konsentrasi Asam oksalat :

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

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

Reaksi antara asam oksalat dengan KOH :



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

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

$$= \frac{2 \times 10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ M}}{9,73} = 0,2055 \text{ M}$$

## Lampiran 8. Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Bebas

Aktivitas ekstrak kasar lipase bebas adalah  $\mu\text{g}$  asam oleat yang bereaksi dengan laktosa oleh lipase amobil (kapsul Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase) dalam setiap menit.

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

Contoh perhitungan :

Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dengan volume titrasi 6,70 mL dan volume titrasi blanko 7,62 mL adalah :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{0,92 \text{ mL} \times 0,2055 \text{ M} \times 282,47 \text{ mg/mmol}}{500 \text{ mg} \times 1440 \text{ menit}} \\ &= 74,172 \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

Tabel L.8.1 Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase bebas

Volume KOH (mL)			Vol.Total (mL)	Volume KOH rerata (mL)
Vol.1	Vol.2	Vol.3		
7,60	7,65	7,60	22,85	7,62

Contoh perhitungan :

$$\text{Vol. KOH rerata} = \frac{(7,60 + 7,65 + 7,60) \text{ mL}}{3} = 7,62 \text{ mL}$$

Tabel L.8.2 Volume titrasi untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase bebas

Protein	Vol. titrasi (mL)			Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)			Aktivitas Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)
	V.1	V.2	V.3	1	2	3	
Ekstrak kasar Lipase	6,70	6,70	6,75	74,172	74,172	70,141	72,828

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas rerata} &= \frac{(74,172 + 74,172 + 70,141) \mu\text{g/g menit}}{3} \\ &= 72,828 \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

### Lampiran 9. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Lipase Awal

## Lampiran 9.1 Penentuan Kadar Protein Lipase Sebelum Amobilisasi

Kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi ditentukan dari konversi nilai absorbansi ekstrak kasar lipase pada persamaan kurva baku kasein yaitu :

$$Y = 0,0002 x$$

Dengan :

Kadar protein ekstrak kasar lipase yang diukur absorbansinya :

Volume ekstrak kasar lipase yang digunakan : 2,00 mL

Volume larutan biuret yang digunakan : 8,00 mL

Volume larutan kasein yang ditambahkan : 2,00 mL

Volume total yang diukur absorbansinya 12,00 mL

Kadar protein ekstrak kasar lipase dapat diukur dari nilai absorbansi dengan cara:

Bila kadar protein ekstrak kasar lipase yang dihitung nilai absorbansinya 0,474 adalah :

$$y = 0,0002 x$$

$$0,474 = 0,0002 x$$

$$x = 2370 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm}$$

$$x = 1536,667 \text{ mg/L}$$

Sehingga, kadar proteinnya adalah

$$= 1536,667 \text{ mg/L} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} = 9220,002 \text{ mg/L} = 9,220 \text{ mg/mL}$$

Tabel L.9.1.1 Kadar protein ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Protein	Absorbansi			Protein (mg/mL)			Rerata (mg/mL)
	A1	A2	A3	1	2	3	
Ekstrak kasar lipase	0,474	0,473	0,474	9,220	9,190	9,220	9,210

Contoh perhitungan :

$$\text{Ekstrak kasar lipase rerata} = \frac{(9,220 + 9,190 + 9,220) \text{ mg/mL}}{3} = 9,210 \text{ mg/mL}$$

## Lampiran 9.2 Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Lipase Sebelum Amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah ekstrak kasar lipase bebas sebelum amobilisasi adalah 9,210 mg/mL lipase. Sehingga jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$W = 9,210 \text{ mg/mL lipase} \times V \text{ mL ekstrak kasar lipase}$$

Dimana :

V = volume ekstrak kasar lipase yang dicuplik = 15 mL

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

Maka, jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi adalah :

$$W = 9,210 \text{ mg/mL} \times 15 \text{ mL} = 138,150 \text{ mg}$$

Tabel L.9.2.1 Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi

Ekstrak kasar	Vol. lipase yang dicuplik (mL)			Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi (mg)			Rerata (mg)
	V.1	V.2	V.3	1	2	3	
Lipase	15	15	15	138,300	137,850	138,300	138,150

Contoh perhitungan :

Ekstrak kasar =  $\frac{(138,300 + 137,850 + 138,300) \text{ mg}}{3} = 138,150 \text{ mg}$   
lipase rerata  
sebelum amobilisasi

**Lampiran 10. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Lipase yang Tidak Terikat pada Kapsul Ca-alginat-kitosan dalam Amobilisasi**

Tabel L.10.1 Volume larutan ekstrak kasar lipase setelah pencucian setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

Kitosan (%)	Vol filtrat 1 (mL)			Rerata (mL)	Vol filtrat 2 (mL)			Rerata (mL)	Vol filtrat 3 (mL)			Rerata (mL)
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0,5	65	65	65	65	65	65	65	65	70	69	70	70
1,0	65	65	66	65	65	65	65	65	69	68	68	68
1,5	65	66	66	66	63	62	62	62	70	70	70	70
2,0	65	65	65	65	62	62	63	62	67	68	68	68
2,5	65	65	65	65	62	62	62	62	67	67	67	67

Volume filtrat yang digunakan untuk penentuan = 2,00 mL  
 Volume larutan kasein 5000 ppm yang ditambahkan = 2,00 mL  
 Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12,00 mL

Jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi lipase yang tidak terikat pada kapsul dengan persamaan regresi dari kurva baku kasein.

Untuk perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi pada konsentrasi kitosan 0,5% dengan volume filtrat setelah amobilisasi dalam Ca-alginat 65 mL dan nilai absorbansinya 0,202 adalah :

$$Y = 0,0002 x$$

$$0,202 = 0,0002 x$$

$$X = 1010 \text{ ppm}$$

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

Maka,

konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein yang ditambahkan  
 = 1010 ppm – 833,333 ppm  
 = 176,667 ppm atau 176,667 mg/L

Diketahui volume filtrat setelah pencucian dalam amobilisasi Ca-alginat adalah 65 mL sehingga jumlah ekstrak kasar lipase setelah amobilisasi:

$$= 176,667 \text{ mg/L} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 65 \text{ mL}$$

$$= 68900,130 \text{ } \mu\text{g} = 68,900 \text{ mg}$$

Tabel L.10.2. Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul (terlepas) setelah amobilisasi dalam Ca-alginat

Kitosan (%)	Absorbansi			Jumlah ekstrak kasar lipase (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	1	2	3	
0,5	0,202	0,200	0,199	68,900	65,000	63,050	65,650
1,0	0,201	0,201	0,202	66,950	66,950	66,960	66,953
1,5	0,201	0,200	0,200	64,890	66,000	66,000	65,630
2,0	0,199	0,202	0,201	63,050	68,900	66,950	66,300
2,5	0,201	0,202	0,201	66,950	68,900	66,950	67,600

Contoh perhitungan :

$$\text{Ekstrak kasar lipase rerata} = \frac{(68,900 + 65,000 + 63,050) \text{ mg}}{3} = 65,650 \text{ mg}$$

Tabel L.10.3 Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan (Na-tripolifosfat 3% selama 15 menit)

Kitosan (%)	Absorbansi			Jumlah ekstrak kasar lipase (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	1	2	3	
0,5	0,186	0,187	0,187	37,700	39,650	39,650	39,000
1,0	0,185	0,185	0,183	35,750	35,750	31,850	34,450
1,5	0,185	0,184	0,184	34,650	32,240	32,240	33,043
2,0	0,183	0,181	0,182	30,380	26,660	28,980	28,673
2,5	0,180	0,181	0,181	24,800	26,660	26,660	26,040

Contoh perhitungan :

$$\text{Ekstrak kasar lipase rerata} = \frac{(37,700 + 39,650 + 39,650) \text{ mg}}{3} = 39,000 \text{ mg}$$

Tabel L.10.4 Jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan (Na-tripolifosfat 1% selama 90 menit)

Kitosan (%)	Absorbansi			Jumlah ekstrak kasar lipase (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	1	2	3	
0,5	0,179	0,180	0,181	27,200	27,600	30,100	28,300
1,0	0,179	0,180	0,180	25,530	27,200	27,200	26,643
1,5	0,178	0,178	0,179	23,800	23,800	25,900	24,500
2,0	0,177	0,176	0,176	20,770	19,040	19,040	19,617
2,5	0,176	0,175	0,176	18,760	16,750	16,750	17,420

Contoh perhitungan :

$$\text{Ekstrak kasar} = \frac{(27,200 + 27,600 + 30,100)}{3} \text{ mg} = 28,300 \text{ mg}$$

lipase rerata



## Lampiran 11. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Lipase yang Terikat dalam Ca-alginat-kitosan

Untuk menentukan jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan dilakukan dengan mengurangkan jumlah ekstrak kasar lipase dalam Ca-alginat dengan jumlah ekstrak kasar lipase yang terlepas selama proses amobilisasi.

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

Dengan:

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

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

Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat ditentukan dengan mengurangkan jumlah ekstrak kasar lipase bebas sebelum amobilisasi dengan jumlah ekstrak kasar lipase yang tidak terikat pada kapsul Ca-alginat.

$$W = \sum \text{ekstrak kasar lipase bebas} - \sum \text{ekstrak kasar lipase yang lepas}$$

Dengan :

$W$  = Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam Ca-alginat

Tabel L.11.1 Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat

Jumlah ekstrak kasar lipase sebelum amobilisasi (mg)	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam Ca-alginat (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	
138,150	69,250	73,150	75,100	72,500
138,150	71,200	71,200	68,190	70,197
138,150	73,260	72,150	72,150	72,520
138,150	75,100	69,250	71,200	71,850
138,150	71,200	69,250	71,200	70,550

Contoh perhitungan :

$$\text{Rerata ekstrak kasar lipase dalam Ca-alginat} = \frac{(69,250 + 73,150 + 75,100) \text{ mg}}{3} = 72,500 \text{ mg}$$

Tabel L.11.2 Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan

Jumlah lipase sebelum amobilisasi (mg)	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada Ca-alginat-kitosan (Natripolifosfat 3 %) (mg)			Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat pada Ca-alginat-kitosan (Natripolifosfat 1 %) (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	1	2	3	
138,150	31,550	33,500	35,450	4,350	5,900	5,350	5,200
138,150	35,450	35,450	36,340	9,920	8,250	9,140	9,103
138,150	38,610	39,910	39,910	14,810	16,110	14,010	14,977
138,150	44,720	42,590	42,220	23,950	23,550	23,180	23,560
138,150	46,400	42,590	44,540	27,640	25,840	27,790	27,090

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

$$= \frac{W_{\text{terikat}}}{W_c}$$

Dimana :

$W_{\text{terikat}}$  = jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam Ca-alginat-kitosan

$W_c$  = massa mikrokapsul (matriks + ekstrak kasar lipase) setelah amobilisasi (g)

Contoh perhitungan :

Perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam setiap gram (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase) dengan

$$\begin{aligned} W_c &= 16,024 \text{ g} \\ &= \frac{4,350 \text{ mg}}{16,024 \text{ g}} \\ &= 0,272 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

Tabel L.11.3 Massa mikrokapsul (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase)

[Kitosan] %	Massa mikrokapsul Ca-alginat-kitosan setelah amobilisasi (g)			Rerata (g)
	1	2	3	
0,5	16,024	16,548	16,598	16,390
1,0	17,178	17,463	17,546	17,396
1,5	19,648	19,732	19,571	19,650
2,0	20,039	19,541	19,290	19,623
2,5	20,198	19,667	20,360	20,075

Contoh perhitungan :

$$\text{Massa rerata mikrokapsul Ca-alginat-kitosan} = \frac{(16,024 + 16,548 + 16,598)}{3} \text{ g} = 16,390 \text{ mg}$$

Tabel L.11.4 Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam tiap gram (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase)

[Kitosan] %	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam setiap gram (matriks Ca-alginat-kitosan+ ekstrak kasar lipase) (mg/g)			Rerata (mg/g)
	1	2	3	
0,5	0,272	0,357	0,322	0,317
1,0	0,578	0,472	0,521	0,524
1,5	0,754	0,816	0,716	0,762
2,0	1,195	1,205	1,202	1,201
2,5	1,368	1,314	1,365	1,349

Contoh perhitungan :

$$\text{Rerata ekstrak kasar lipase tiap g} = \frac{(0,272 + 0,357 + 0,322)}{3} \text{ g} = 0,317 \text{ g}$$

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

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

Dengan :

$W_{\text{terjebak}}$  = jumlah yang terikat dalam Ca-alginat kitosan

$W_c$  = massa mikrokapsul (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase) setelah amobilisasi (g)

Contoh perhitungan :

Perhitungan jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat setelah amobilisasi dalam 0,5 g (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase) dengan  $W_c$  sebesar 16,024 g adalah sebagai berikut :

$$= \frac{0,5 \text{ g}}{16,024 \text{ g}} \times 0,272 \text{ mg/g}$$

$$= 0,136 \text{ mg/g}$$

Tabel L.11.5 Jumlah ekstrak kasar lipase amobil dalam 0,5 g (matriks Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase)

[Kitosan] %	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam 0,5 g (matriks Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar lipase) (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	
0,5	0,136	0,179	0,161	0,159
1,0	0,289	0,236	0,261	0,262
1,5	0,377	0,408	0,358	0,381
2,0	0,598	0,603	0,601	0,601
2,5	0,684	0,657	0,683	0,675

Contoh perhitungan :

$$\text{Rerata ekstrak kasar lipase tiap 0,5 g} = \frac{(0,136 + 0,179 + 0,161) \text{ g}}{3} = 0,159 \text{ g}$$

## Lampiran 12. Perhitungan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil dan Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Lipase Amobil

### Lampiran 12.1 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Aktivitas ekstrak kasar lipase bebas adalah  $\mu\text{g}$  asam oleat yang bereaksi dengan laktosa oleh lipase amobil (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase) dalam setiap menit.

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

Contoh perhitungan :

Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dengan volume titrasi 4,50 mL dan volume titrasi blanko 5,28 mL adalah :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{\text{Volume titrasi KOH} \times M \text{ KOH}}{\text{Massa enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times Mr (\text{Asam oleat}) \\ &= \frac{0,483 \text{ mL} \times 0,2055 \text{ M} \times 282,47 \text{ mg/mmol}}{500 \text{ mg} \times 1440 \text{ menit}} \\ &= 38,940 \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

Tabel L.12.1.1 Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Volume KOH (mL)			Vol.Total (mL)	Volume KOH rerata (mL)
Vol.1	Vol.2	Vol.3		
5,30	5,30	5,25	15,85	5,28

Contoh perhitungan:

$$\text{Vol. KOH rerata} = \frac{(5,30 + 5,30 + 5,25) \text{ mL}}{3} = 5,28 \text{ mL}$$

Tabel L.12.1.2 Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam berbagai variasi konsentrasi kitosan

[Kitosan] %	Volume titrasi sampel (mL)			Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)
	Vol.1	Vol.2	Vol.3	A1	A2	A3	
0,5	4,80	4,80	4,80	38,698	38,698	38,698	38,698
1,0	4,85	4,85	4,90	34,667	34,667	30,636	33,323
1,5	4,85	4,80	4,80	34,667	38,698	38,698	37,354
2,0	4,15	4,20	4,15	91,102	87,071	91,102	89,758
2,5	4,15	4,25	4,20	91,102	83,040	87,071	87,071

Contoh perhitungan :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas rerata} &= \frac{(38,698 + 38,698 + 38,698)}{3} \mu\text{g/g menit} \\ &= 38,698 \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

### Lampiran 12.2 Penentuan Temperatur Optimum dari Lipase Amobil

Penentuan temperatur optimum dari ekstrak kasar lipase amobil dengan konsentrasi larutan kitosan 2%, dapat ditentukan dari nilai perhitungan aktivitas yang terbesar dari variasi temperatur. Aktivitas lipase amobil dapat ditentukan dengan rumus:

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

Contoh perhitungan :

Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil (konsentrasi kitosan 2%) dengan waktu inkubasi 24 jam dengan volume titrasi 4,85 mL dan volume titrasi blanko 5,28 mL adalah :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{\text{Volume titrasi KOH} \times M \text{ KOH}}{\text{Massa enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times Mr (\text{Asam oleat}) \\ &= \frac{0,43 \text{ mL} \times 0,2055 \text{ M}}{500 \text{ mg} \times 1440 \text{ menit}} \times 282,47 \text{ mg/mmol} \\ &= 34,667 \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

Tabel L.12.2.1 Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Volume KOH (mL)			Vol.Total (mL)	Volume KOH rerata (mL)
Vol.1	Vol.2	Vol.3		
5,30	5,30	5,25	15,85	5,28

Contoh perhitungan:

$$\text{Vol. KOH rerata} = \frac{(5,30 + 5,30 + 5,25) \text{ mL}}{3} = 5,28 \text{ mL}$$

3

Tabel L.12.2.2 Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam variasi temperatur untuk penentuan temperatur optimum

Suhu (°)	Vol. titrasi sample (mL)			Aktivitas (µg/g menit)			Rerata (µg/g menit)
	Vol.1	Vol.2	Vol.3	A1	A2	A3	
30	4,85	4,90	4,90	34,667	30,636	30,636	31,980
40	4,90	4,85	4,85	30,636	34,667	34,667	33,323
50	4,70	4,60	4,65	46,761	54,822	50,792	50,792
60	4,80	4,80	4,80	38,698	38,698	38,698	38,698
70	5,15	5,20	5,15	10,481	6,692	10,481	9,218

Contoh perhitungan:

$$\text{Aktivitas rerata} = \frac{(34,667 + 30,636 + 30,636) \mu\text{g/g menit}}{3}$$

3

$$= 31,980 \mu\text{g/g menit}$$

### Lampiran 12.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum dari Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Penentuan waktu inkubasi optimum dari ekstrak kasar lipase amobil dengan konsentrasi larutan kitosan 2% dan pada temperatur inkubasi 50 °C, dapat ditentukan dari nilai perhitungan aktivitas yang terbesar dari variasi waktu inkubasi. Aktivitas amobil dapat ditentukan dengan rumus :

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

Contoh perhitungan :

Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil (konsentrasi kitosan 2%) dengan temperatur inkubasi 50 °C dengan volume titrasi 4,70mL dan volume titrasi blanko 5,28 mL adalah :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{\text{Volume titrasi KOH} \times M \text{ KOH}}{\text{massa enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \times Mr (\text{Asam oleat}) \\ &= \frac{0,58 \text{ mL} \times 0,2055 \text{ M}}{500 \text{ mg} \times 1440 \text{ menit}} \times 282,47 \text{ mg/mmol} \\ &= 46,761 \mu\text{g/g menit} \end{aligned}$$

Tabel L.12.3.1 Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Volume KOH (mL)			Vol.Total (mL)	Volume KOH rata-rata (mL)
Vol.1	Vol.2	Vol.3		
5,30	5,30	5,25	15,85	5,28

Contoh perhitungan:

$$\text{Vol. KOH rerata} = \frac{(5,30 + 5,30 + 5,25) \text{ mL}}{3} = 5,28 \text{ mL}$$

Tabel L.12.3.2 Aktivitas ekstrak kasar lipase amobil dalam variasi waktu inkubasi untuk penentuan waktu inkubasi optimum

Waktu inkubasi (jam)	Volume titrasi sampel (mL)			Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)
	Vol.1	Vol.2	Vol.3	A1	A2	A3	
8	4,70	4,70	4,75	46,761	46,761	42,729	45,417
16	4,70	4,65	4,70	46,761	50,792	46,761	48,105
24	4,60	4,65	4,60	54,822	50,792	54,822	53,479
32	4,75	4,75	4,80	42,729	42,729	38,698	41,385
48	4,85	4,85	4,80	34,667	34,667	38,698	36,011

Contoh perhitungan:

$$\text{Aktivitas rerata} = \frac{(46,761 + 46,761 + 42,729)\mu\text{g/g menit}}{3}$$

$$= 45,417 \mu\text{g/g menit}$$



### Lampiran 13. Efisiensi Pemakaian Ulang Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Efisiensi pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil ditentukan berdasarkan perbandingan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil terhadap pemakaian pertama pada setiap pemakaian ulang. Diasumsikan pemakaian pertama memiliki efisiensi 100%, maka perhitungan lipase amobil dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Efisiensi pemakaian ulang} = \frac{\text{Aktivitas ke-n}}{\text{Aktivitas ke-1}} \times 100\%$$

Dengan:

Aktivitas ke-n = aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian ulang ke-n

Aktivitas ke-1 = aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian ke-1

Contoh :

Perhitungan efisiensi ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian II.

Diketahui :

aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian ulang II adalah sebesar 22,573  $\mu\text{g/g}$  menit

aktivitas ekstrak kasar lipase amobil pada pemakaian ulang I adalah sebesar 27,947  $\mu\text{g/g}$  menit

$$\text{Efisiensi} = \frac{22,573}{27,947} \times 100\% = 80,77\%$$

Tabel L.13.1 Volume titrasi blanko untuk penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Volume KOH (mL)			Vol.Total (mL)	Volume KOH rerata (mL)
Vol.1	Vol.2	Vol.3		
5,30	5,30	5,25	15,85	5,28

Contoh perhitungan:

$$\text{Vol. KOH rerata} = \frac{(5,30 + 5,30 + 5,25) \text{ mL}}{3} = 5,28 \text{ mL}$$

3

Tabel L.13.2 Volume titrasi untuk penentuan pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil

Ulangan	Volume titrasi sample (mL)			Vol.Rerata (mL)
	Vol.1	Vol.2	Vol.3	
I	4,90	4,95	4,95	4,93
II	4,95	5,00	5,05	5,00
III	5,00	5,05	5,05	5,03
IV	5,05	5,10	5,10	5,08
V	5,10	5,10	5,20	5,13
VI	5,20	5,25	5,20	5,27

Tabel L.13.3 Pengaruh pemakaian ulang ekstrak kasar lipase amobil terhadap efisiensi aktivitas

Ulangan	Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)	Efisiensi (%)
	A1	A2	A3		
I	30,636	26,603	26,603	27,947	100
II	26,603	22,574	18,543	22,573	80,77
III	22,574	18,543	18,543	19,887	71,16
IV	18,543	14,512	14,512	15,856	56,74
V	14,512	14,512	6,448	11,824	42,31
VI	6,448	2,419	6,448	5,105	18,27

### Lampiran 14. Uji Statistik terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Lipase Amobil

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil maka harus dianalisis dengan menggunakan olahan RAL sebagai berikut :

Tabel L.14.1 Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

[Kitosan] %	Aktivitas (µg/g menit)			Rerata (µg/g menit)
	A1	A2	A3	
0,5	38,698	38,698	38,698	38,698
1,0	34,667	34,667	30,636	33,323
1,5	34,667	38,698	38,698	37,354
2,0	91,102	87,071	91,102	89,758
2,5	91,102	83,040	87,071	87,071

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

1. Menghitung faktor koreksi :

$$FK = \frac{\left[ \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n Y_{ij} \right]^2}{p \cdot n} = \frac{737219,7812}{15} = 49147,98122$$

Menghitung jumlah kuadrat (JK) :

$$\begin{aligned} \text{a. JK total} &= \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK \\ &= 58988,72598 - 49147,98122 \\ &= 9840,74478 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. JK perlakuan} &= \frac{\left[ \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n Y_{ij} \right]^2}{pxn} - FK \\
 &= 58923,7302 - 49147,98122 \\
 &= 9775,74898
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{c. JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 9840,74478 - 9775,7490 \\
 &= 64,99578
 \end{aligned}$$

Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

$$\begin{aligned}
 \text{a. KT perlakuan} &= \frac{JK_{perlakuan}}{dB_{perlakuan}} \\
 &= 9775,7490 / 4 \\
 &= 2443,93725
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. KT galat} &= \frac{JK_{galat}}{dB_{galat}} \\
 &= 64,99578 / 10 \\
 &= 6,499578
 \end{aligned}$$

Menghitung nilai F

$$\begin{aligned}
 F_{\text{hitung perlakuan}} &= \frac{KT_{perlakuan}}{KT_{perlakuan}} \\
 F_{\text{hitung}} &= KTp / KTg \\
 &= 2443,9373 / 6,499578 \\
 &= 376,01465
 \end{aligned}$$

FK	49147,98122
JKT	9840,74478
JKP	9775,74898
JKG	64,99578
KTP	2443,93725
KTG	6,499578
Fhitung	376,01465
Ftabel	3,48
BNT 5%	4,63780

Tabel L.14.2 Hasil uji BNT 5% pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

[Kitosan] (%)	[Kitosan] (%)	1,0	1,5	0,5	2,5	2,0	Notasi
	Rataan	33,323	37,354	38,698	87,071	89,758	
1,0	33,323	0					a
1,5	37,354	4,031	0				a
0,5	38,698	5,375	1,344	0			a
2,5	87,071	53,751	49,717	48,373	0		b
2,0	89,758	56,435	52,404	51,060	2,687	0	b

Tabel L.14.3 Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah ekstrak kasar lipase amobil yang terikat

[Kitosan] %	Jumlah ekstrak kasar lipase yang terikat dalam 0,5 g (matriks Ca-alginat-kitosan beserta ekstrak kasar lipase) (mg)			Rerata (mg)
	1	2	3	
0,5	0,139	0,179	0,161	0,159
1,0	0,289	0,236	0,261	0,262
1,5	0,377	0,408	0,358	0,381
2,0	0,598	0,603	0,601	0,601
2,5	0,684	0,657	0,683	0,675

FK	2,03298
JKT	1,09161
JKP	0,94224
JKG	0,14937
KTP	0,23556
KTG	0,01494
Fhitung	15,77066
Ftabel	3,48
BNT 5%	0,22033

Tabel L.14.4 Hasil uji BNT 5% Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah ekstrak kasar lipase amobil yang terikat pada kapsul Ca-alginat-kitosan

Kitosan (%)	Kitosan (%)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	Notasi
		Rataan	0,159	0,262	0,381	0,601	
0,5	0,159	0					a
1,0	0,262	0,103	0				a
1,5	0,381	0,222	0,119	0			a
2,0	0,601	0,442	0,339	0,220	0		b
2,5	0,675	0,516	0,413	0,294	0,074	0	b

Tabel L.14.5 Pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Temperatur (°)	Aktivitas (µg/g menit)			Rerata (µg/gmenit)
	A1	A2	A3	
30	34,667	30,636	30,636	31,980
40	30,636	34,667	34,667	33,323
50	46,761	54,822	50,792	50,792
60	38,698	38,698	38,698	38,698
70	10,481	6,692	10,481	9,218

FK	16139,69927
JKT	2810,35815
JKP	2746,63198
JKG	63,72617
KTP	686,65799
KTG	6,37217
Fhitung	107,75889
Ftabel	3,48
BNT 5%	4,59212

Tabel L.14.6 Hasil uji BNT 5% pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

temperatur	temperatur	70	30	40	60	50	Notasi
		Rataan	9,218	31,980	33,323	38,698	
70	9,218	0					a
30	31,980	22,762	0				b
40	33,323	24,105	1,343	0			b
60	38,698	29,480	6,718	5,375	0		c
50	50,792	41,574	18,812	17,469	12,094	0	d

Tabel L.14.7 Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Waktu inkubasi (jam)	Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)
	A1	A2	A3	
8	46,761	46,761	42,729	45,417
16	46,761	50,792	46,761	48,105
24	54,822	50,792	54,822	53,479
32	42,729	42,729	38,698	41,385
48	34,667	34,667	38,698	36,011

FK	30212,22865
JKT	580,66826
JKP	526,50503
JKG	54,16326
KTP	131,62626
KTG	5,41633
Fhitung	24,30177
Ftabel	3,48
BNT 5%	4,23372

Tabel L.14.8 Hasil uji BNT 5% pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Waktu Inkubasi	Waktu inkubasi	48	32	8	16	24	Notasi
	Rataan	36,011	41,385	45,417	48,105	53,479	
48	36,011	0					a
32	41,385	5,374	0				b
8	45,417	9,406	4,032	0			b
16	48,105	12,094	6,720	2,688	0		b
24	53,479	17,468	12,094	8,062	5,374	0	c

Tabel L.14.9 Pengaruh pemakaian ulang terhadap efisiensi aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Ulangan	Aktivitas ( $\mu\text{g/g}$ menit)			Rerata ( $\mu\text{g/g}$ menit)	Efisiensi (%)
	A1	A2	A3		
I	30,636	26,603	26,603	27,947	100
II	26,603	22,574	18,543	22,573	80,77
III	22,574	18,543	18,543	19,887	71,16
IV	18,543	14,512	14,512	15,856	56,74
V	14,512	14,512	6,448	11,824	42,31
VI	6,448	2,419	6,448	5,105	18,27

FK	5324,29443
JKT	1104,94545
JKP	985,78106
JKG	119,16444
KTP	197,15621
KTG	9,93037
Fhitung	19,85386
Ftabel	2,11
BNT 5%	4,03120

Tabel L.14.10 Pengaruh pemakaian ulang terhadap efisiensi aktivitas ekstrak kasar lipase amobil

Pema kaian	Pema kaian	VI	V	IV	III	II	I	Notasi
	Rataan	5,105	11,824	15,856	19,887	22,573	27,947	
VI	5,105	0						a
V	11,824	6,719	0					b
IV	15,856	10,751	4,032	0				c
III	19,887	14,782	8,063	4,031	0			d
II	22,573	17,468	10,749	6,717	2,686	0		d
I	27,947	22,842	16,123	12,091	8,060	5,374	0	e

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

