

Biotransformasi Asam Oleat menggunakan *Aspergillus oryzae* Secara Konvensional dan Iradiasi *Microwave* untuk Produksi *Bioflavour*

SKRIPSI

Oleh :

YOAN DE ELCANI

155090200111017



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2019

Biotransformasi Asam Oleat menggunakan *Aspergillus oryzae* Secara Konvensional dan Iradiasi *Microwave* untuk Produksi *Bioflavour*

SKRIPSI

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

Oleh :

YOAN DE ELCANI

155090200111017



JURUSAN KIMIA

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

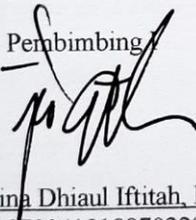
**Biotransformasi Asam Oleat menggunakan *Aspergillus oryzae*
Secara Konvensional dan Iradiasi *Microwave* untuk Produksi
*Bioflavour***

Oleh :

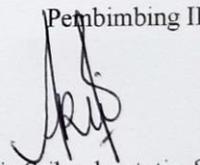
YOAN DE ELCANI

155090200111017

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal **25 JUN 2019**
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I


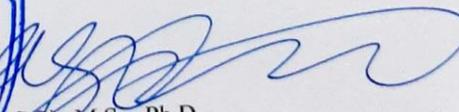
Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, M.Si
NIP. 197204191997022001

Pembimbing II


Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes
NIP. 197203262002122001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Universitas Brawijaya


Masruy, S.Si, M.St., Ph.D
NIP. 197310202002121001

**Biotransformasi Asam Oleat menggunakan *Aspergillus oryzae*
Secara Konvensional dan Iradiasi *Microwave* untuk Produksi
*Bioflavour***

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh waktu inkubasi terhadap pembentukan produk biotransformasi asam oleat menggunakan *Aspergillus oryzae* tanpa atau dengan metode menggunakan *microwave*. Metode biotransformasi tanpa menggunakan *microwave* atau disebut juga metode konvensional dilakukan menggunakan orbital *shaker* ± 130 rpm pada temperatur 26°C dengan variasi waktu inkubasi 3, 5, 7, dan 9 hari. Biotransformasi dengan metode *microwave* dilakukan menggunakan *microwave* rumah tangga termodifikasi pada temperatur 31°C dengan variasi waktu inkubasi 10, 20, 30 menit. Produk utama yang dihasilkan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan GC-MS. Hasil yang diperoleh dengan metode konvensional menunjukkan produk utama metil oleat (2.03%, 3 hari), etil oleat (29.68%, 5 hari), dan etil palmitat (11.19%, 9 hari). Sedangkan produk utama yang diperoleh dengan metode *microwave* adalah asam 11-hidroksi-trans-8-dodekanoat lakton (8.76%) dan metil palmitat (2.55%) masing-masing pada 10 menit, asam palmitat (2.78%, 20 menit), dan asam 10-oktadekenoat (4.74%, 30 menit). Semakin lama waktu inkubasi yang diperlukan pada metode konvensional maka produk ester yang terbentuk semakin meningkat, sedangkan metode *microwave* total jenis produk ester yang terbentuk semakin menurun.

Kata kunci: *Biotransformasi, Asam Oleat, Aspergillus oryzae, γ -dodekallakton, iradiasi microwave.*

Biotransformation Of Oleic Acid using *Aspergillus oryzae* by Conventional and Irradiation of Microwave for Bioflavour Production

ABSTRACT

The purpose of this research is to study the influence of incubation on biotransformation of oleic acid. *Aspergillus oryzae* is chosen as microbial through conventional heat and microwave method. Conventional heat method was carried out using orbital shaker \pm 130 rpm at a temperature of 26°C with variation of incubation time are 3, 5, 7 and 9 days. Microwave method was carried out using a modified household microwave at a temperature of 31°C with variation of incubation time are 10, 20, and 30 minutes. The main products was characterized by GC-MS. The results showed that on conventional heat method obtained methyl oleate (2.03%, 3 days), ethyl oleate (29.68%, 5 days), and ethyl palmitate (11.19%, 9 days). While on microwave method obtained 11-hydroxy-trans-8-dodecanoic acid lactone (8.76%) and methyl palmitate (2.55%) on 10 minutes, palmitic acid (2.78%, 20 minutes), and 10-octadecenoic acid (4.74%, 30 minutes). The longer of incubation time at the conventional method, the ester product formed are increased, while at the microwave method, total type of ester product formed are decreased.

Keyword: *Biotransformation, Oleic Acid, Aspergillus oryzae, γ -dodecalactone, irradiation of microwave.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT. Yang telah melimpahkan rahmat serta kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul, **Biotransformasi Asam Oleat menggunakan *Aspergillus oryzae* Secara Konvensional dan Iradiasi Microwave untuk Produksi Bioflavour**, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains dalam bidang Kimia. Dalam penyusunan skripsi ini, penulis telah didukung oleh berbagai pihak untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh sebab itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT, yang telah memberikan Rahmat serta Ridho-Nya
2. Dr. Uswatun Hasanah selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama perkuliahan.
3. Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing I atas kesabaran, arahan dan dukungan beliau dalam pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi.
4. Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes selaku dosen pembimbing II atas arahan dan dukungan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
5. Alm. Dr. Edi Priyo Utomo, MS selaku pembimbing terdahulu atas ide dan bimbingan selama penelitian skripsi.
6. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku ketua Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dan segenap Staff Kimia atas bantuan dalam penyusunan skripsi.
7. Mama, Bapak, Adik serta keluarga yang mendukung penulis.
8. Tim Biotransformasi (Dian, Yanuar, Galuh), Arrival, Tien, Yuli, Kiki, Prabasti, Afdhal, Nitia, Amandhangi, Mifta, Neisya dan Annisa serta teman-teman Kimia angkatan 2015 atas dukungan selama pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran, sehingga penulis dapat memperbaiki kesalahan dalam penulisan selanjutnya.

Malang, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 γ -Dodekalakton	5
2.2 Asam Oleat	5
2.3 Biotransformasi	6
2.4 <i>Aspergillus oryzae</i>	7
2.5 <i>Microwave Enzymatic Reaction</i>	9
BAB III METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	11
3.2.1 Alat	11
3.2.2 Bahan	11
3.3 Tahapan Penelitian	11
3.4 Prosedur Penelitian	12
3.4.1 Analisis Kandungan Asam Oleat	12
3.4.2 Pembuatan Media Padat	12

3.4.3 Penanaman Biakan Murni.....	12
3.4.4 Pembuatan Media Cair	13
3.4.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan	13
3.4.6 Pembuatan Inokulum	13
3.4.7 Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional	14
3.4.8 Biotransformasi Asam Oleat Dengan Iradiasi <i>Microwave</i>	14
3.4.9 Isolasi dan Karakterisasi Produk Biotransformasi	14
3.5 Analisis Data.....	15
BAB IV PEMBAHASAN	17
4.1 Analisis Substrat	17
4.2 Pengaruh Waktu Inkubasi Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional	18
4.3 Pengaruh Waktu Inkubasi Biotransformasi Asam Oleat Dengan Iradiasi <i>Microwave</i>	21
4.4 Hubungan Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional Dan Iradiasi <i>Microwave</i>	25
BAB V PENUTUP	29
5.1 Kesimpulan	29
5.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	34

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 3.5.1. Matriks data penelitian variabel waktu inkubasi biotransformasi asam oleat secara konvensional.....	15
Tabel 3.5.2 Matriks data penelitian variabel waktu inkubasi biotransformasi asam oleat dengan iradiasi microwave.....	15
Tabel 4.1 Senyawa yang terbentuk dari biotransformasi asam oleat secara konvensional.....	19
Tabel 4.2 Senyawa yang terbentuk dari biotransformasi asam oleat dengan iradiasi microwave	23

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1 Struktur senyawa γ -dodekalakton	5
Gambar 2.2 Struktur senyawa asam oleat	6
Gambar 2.3 Jalur biotransformasi asam oleat	7
Gambar 2.4 Koloni <i>A. oryzae</i>	8
Gambar 2.5 Mekanisme reaksi enzimatis dengan radiasi <i>microwave</i>	10
Gambar 3.5 Spektra massa γ -dodekalakton	16
Gambar 4.1 Kromatogram metil oleat	17
Gambar 4.2 Spektra massa metil oleat	17
Gambar 4.3 Struktur metil oleat	18
Gambar 4.4 Kromatogram biotransformasi asam oleat secara konvensional	18
Gambar 4.5 Reaksi pembentukan senyawa produk biotransformasi asam oleat secara konvensional	20
Gambar 4.6 Kromatogram biotransformasi asam oleat dengan iradiasi <i>microwave</i>	22
Gambar 4.7 Reaksi pembentukan senyawa produk asam oleat dengan iradiasi <i>microwave</i>	24
Gambar 4.8 Mekanisme esterifikasi asam oleat melalui hidrolisis lipase	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran A Diagram Alir	34
Lampiran B Perhitungan Mol Substrat	44
Lampiran C Pembuatan Kurva Pertumbuhan	44
Lampiran D Mekanisme Fragmentasi Spektra Massa	45
Lampiran E Perkiraan Tahap Reaksi Pembentukan Asam 11-Hidroksi-trans-8-dodekanoat Laktone	49
Lampiran F Dokumentasi	50

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Beberapa dekade terakhir penggunaan *flavour* alami lebih disukai dibandingkan *flavour* sintetis karena produksi *flavour* alami dapat dilakukan secara bioteknologi yaitu melalui proses fermentasi. Fermentasi mikrobial memberikan potensi dalam produksi senyawa *flavour* dan memberikan keuntungan yang besar dalam penelitian [1]. Salah satu senyawa *flavour* yang banyak digunakan oleh industri makanan dan minuman yaitu senyawa lakton. Lakton merupakan senyawa ester siklik dari asam lemak hidroksi [2]. γ -Lakton sintetis yang telah digunakan sebagai *flavour* buatan diproduksi melalui metode sintesis secara kimiawi [3]. Metode kultur mikrobial dalam produksi lakton membutuhkan adanya tahap isolasi dan pemurnian yang lebih mudah dilakukan dibandingkan metode sintesis kimiawi [4]. Selain itu, proses melibatkan mikrobial menghasilkan konversi yang lebih tinggi [5].

Proses konversi senyawa yang melibatkan mikrobial yaitu biotransformasi. Biotransformasi merupakan salah satu cara dalam produksi senyawa *flavour* alami dan melibatkan penggunaan enzim dan atau mikroorganisme yang dapat mengkonversi substrat alami seperti asam lemak menjadi suatu produk yang diinginkan [6]. Dalam konversi substrat proses biotransformasi melibatkan reaksi yang berdasarkan pemutusan rantai menggunakan enzim melalui sistem β -oksidasi. Biotransformasi dapat digunakan produksi senyawa lakton seperti γ -dekalakton dan γ -dodekalakton dari asam lemak bebas, asam lemak hidroksi, atau minyak atsiri [3]. Menurut Kuo dan Gardner [4] asam lemak bebas yang disarankan untuk produksi senyawa γ -dodekalakton yaitu asam oleat. Asam oleat merupakan *starting material* yang disarankan karena mudah diperoleh dari sumber agrikultural dan relatif murah [7]. Asam oleat dapat produksi γ -

dodekalakton membentuk senyawa intermidiet 10-hidroksistearat dan tahap konversi asam hidroksi menjadi γ -dodekalakton [4]. Menurut penelitian Gocho dkk [6] produksi γ -dodekalakton melalui biotransformasi membutuhkan waktu selama 72 jam untuk pembentukan senyawa intermidiet lalu 72 jam hingga pembentukan γ -dodekalakton, metode fermentasi yang digunakan membutuhkan waktu yang lama untuk konversi substrat menjadi produk.

Dalam industri kimia, peningkatan konversi produk dalam rentang waktu yang singkat dapat digunakan teknologi gelombang mikro (*microwave*). Energi gelombang mikro dapat digunakan untuk mempercepat reaksi enzimatik dalam konversi senyawa ester [8]. Sebagai contoh, proses enzimatik dalam esterifikasi asam laurat menggunakan lipase Novozym 435 dengan pelarut alkohol dibawah radiasi *microwave* diperoleh konversi dalam waktu 6 menit, dibandingkan tanpa bantuan radiasi *microwave* yang memerlukan proses enzimatik 24 jam [9]. Biotransformasi senyawa γ -dodekalakton dapat digunakan paparan *microwave* untuk mempercepat proses enzimatik dibandingkan fermentasi mikrobial. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan metode konvensional dan metode dengan iradiasi *microwave* dalam biotransformasi asam oleat untuk produksi senyawa *bioflavour*. Senyawa γ -dodekalakton adalah *bioflavour* yang menjadi sasaran penelitian ini diharapkan dapat diproduksi dalam hasil konversi yang tinggi dan proses waktu yang lebih singkat.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apa produk yang dihasilkan oleh biotransformasi terhadap asam oleat secara konvensional dan iradiasi *microwave*?
2. Bagaimana pengaruh waktu inkubasi terhadap pembentukan produk biotransformasi asam oleat dalam produksi *bioflavour*?

1.3 Batasan Masalah

1. Asam oleat yang digunakan yaitu asam oleat sintetis T&T Chemical.

2. *Microwave* yang digunakan merupakan *microwave* rumah tangga yang termodifikasi.
3. Temperatur untuk biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* menggunakan temperatur 31°C.
4. Temperatur untuk biotransformasi asam oleat secara konvensional menggunakan temperatur ruang (26°C).
5. Biotransformasi asam oleat secara konvensional menggunakan *incubator shaker*.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui produk yang dihasilkan oleh biotransformasi asam oleat secara konvensional dan bantuan iradiasi *microwave*.
2. Mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap pembentukan produk biotransformasi asam oleat dalam produksi *bioflavour*.

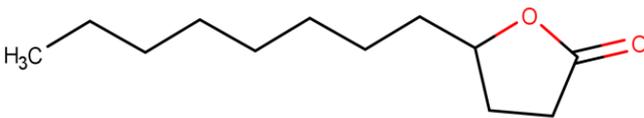
1.5 Manfaat Penelitian

1. Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai rujukan dan panduan dalam proses biotransformasi asam oleat dalam produksi *bioflavour*.
2. Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai rujukan perbandingan antara biotransformasi terhadap asam oleat secara konvensional dan iradiasi *microwave* dalam produksi *bioflavour*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 γ -Dodekalakton

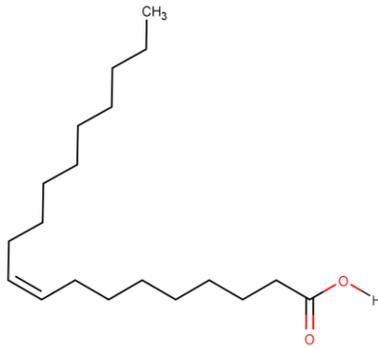
γ -Dodekalakton ($C_{12}H_{22}O_2$) yang memiliki struktur senyawa pada **gambar 2.1** merupakan senyawa *flavour* yang terdapat pada buah aprikot, persik, stroberi, nanas, mangga, buah plum, *acerola* dan susu. γ -Dodekalakton telah digunakan sebagai aroma atau perasa pada beberapa *consumable* material seperti makanan, permen karet, pasta gigi, kosmetik, obat-obatan, produk tembakau, detergen, dan parfum [10]. Selain digunakan sebagai senyawa *flavour* pada makanan, γ -dodekalakton memiliki aktivitas antifungal dan antibakteri [11].



Gambar 2.1 Struktur senyawa γ -dodekalakton

2.2 Asam Oleat

Asam oleat (*cis-9-octadecenoic acid*) adalah asam lemak jenuh omega-9 yang memiliki rumus molekul $C_{18}H_{34}O_2$ dengan struktur senyawa pada **gambar 2.2**. Asam oleat merupakan komponen utama dalam minyak zaitun, *grape seed oil*, minyak kedelai, minyak sawit dan minyak jagung [12]. Asam oleat memiliki massa molekul 282,468 g/mol, berwujud cair tidak berwarna hingga kuning muda dengan bau yang menyengat, memiliki titik didih $360^{\circ}C$ dan titik leleh $13,4^{\circ}C$ [13]. Asam oleat bersifat tidak larut dalam air namun sangat larut dalam alkohol. Asam lemak ini dapat bereaksi dengan senyawa alkalis membentuk sabun sebagai *emulgent* [14].



Gambar 2.2 Struktur senyawa asam oleat

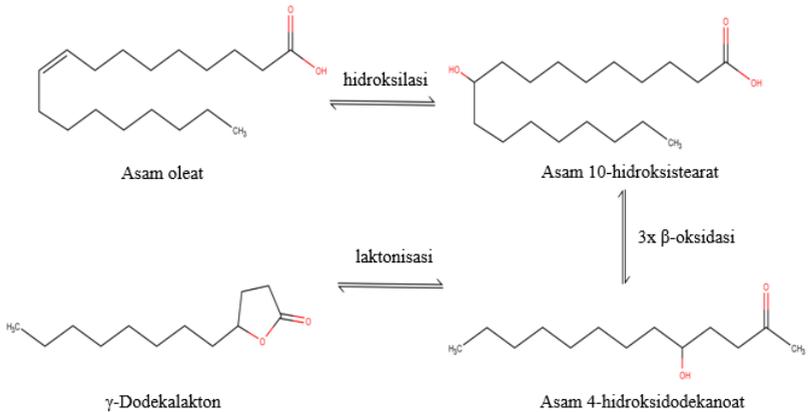
2.3 Biotransformasi

Biotransformasi merupakan metode modifikasi struktural dalam senyawa kimia yang dilakukan oleh mikroorganisme atau enzim untuk membentuk suatu molekul yang memiliki polaritas yang lebih besar. Biotransformasi telah dikembangkan dan digunakan dalam proses bioteknologi [15]. Kelebihan biotransformasi bersifat dapat diperbarui (*renewable*) dan melalui proses yang memiliki toksisitas yang lebih rendah [5].

Biotransformasi terbagi menjadi dua yaitu enzimatik dan non-enzimatik. Biotransformasi mikrobial telah digunakan dalam transformasi beberapa polutan ataupun beberapa senyawa hidrokarbon, logam, dan komponen obat-obatan. Transformasi terbagi berdasarkan reaksi yang digunakan yaitu oksidasi, reduksi, hidrolisis, isomerisasi, kondensasi, pembentukan atom karbon, dan pengenalan gugus fungsi. Pada jaman sekarang, biotransformasi mikrobial menjadi peran penting dalam industri produksi bahan kimia, makanan, obat-obatan, agrokimia, dan industri lainnya [15].

Biotransformasi senyawa lakton oleh asam lemak hidroksi melalui β -oksidasi terdapat dua tahap konversi oleh mikrobial, yaitu tahap oksidasi asam oleat menjadi asam 10-hidroksistearat dan tahap pembentukan γ -dodekalakton dari asam hidroksi yang dijelaskan pada **gambar 2.3** [6]. Menurut Gocho dkk [6] mikroorganisme memiliki

aktivitas yang tinggi untuk mengubah asam oleat menjadi asam 10-hidroksistearat dalam suatu medium. Kemudian, melalui jalur β -oksidasi senyawa γ -dodekalakton terbentuk dari asam 10-hidroksistearat. Asam 10-hidroksistearat mengalami metabolisme menghasilkan asam 4-hidroksidodekanoat dan asam asetat melalui siklus β -oksidasi, kemudian asam 4-hidroksidodekanoat dikonversi menjadi γ -dodekalakton melalui laktonisasi [10].



Gambar 2.3 Jalur biotransformasi asam oleat

2.4 *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae adalah jamur berfilamen aerob, yang berkoloni berwarna putih dapat berubah menjadi warna kuning-kehijauan. *A. oryzae* belum diidentifikasi tahap pembuahan seksualnya, namun sporanya merupakan spora aseksual yang mudah dilepaskan di udara. Memiliki temperatur optimum untuk pertumbuhan yaitu 32-36°C [16]. Koloni *Aspergillus oryzae* berumur 7 hari dalam medium *czapek yeast agar* terdapat pada **gambar 2.4** [17].



Gambar 2.4 Koloni *A. oryzae*

Aspergillus oryzae atau koji (kapang koji) yang berperan penting dalam fermentasi pembuatan makanan, khususnya dalam pembuatan makanan tradisional jepang dan minuman seperti miso (pasta kedelai), shoyu (saus kecap), dan sake (*rice wine*) [18]. Jamur berfilamen pada *Aspergillus oryzae* memiliki potensi dalam sekresi beberapa macam enzim yang digunakan untuk bioteknologi modern. Beberapa enzim yang diproduksi oleh *A. oryzae* yaitu amilase, protease, lipase dan selulase [19].

Enzim lipase berperan penting dalam bioteknologi modern sebagai biokatalis. Lipase memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis dan sintesis senyawa kimia. Kemampuan katalisis bergantung pada aktivitas enzim [20]. Enzim lipase dapat dihasilkan dalam jumlah sedikit oleh *A. oryzae*. Lipase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis lipid pada kacang kedelai menjadi asam lemak jenuh, secara *reversible*, lipase dapat katalisis pembentukan senyawa ester dari asam lemak jenuh melalui proses fermentasi [21].

Menurut [22] pembentukan asam γ -hidroksidekanoat secara enzimatis dengan hidrolisis minyak jarak menggunakan enzim lipase melalui inkubasi mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang disarankan mampu hidrolisis substrat minyak jarak dan menghasilkan senyawa hidrolisat melalui β -oksidasi yaitu *Aspergillus oryzae*. Proses laktonisasi senyawa asam γ -hidroksidekanoat secara *in situ* menjadi γ -dekalakton dapat dilakukan dengan inkubasi *Aspergillus oryzae* pada substrat minyak jarak sebanyak 3 g dan diperoleh produk lakton

sebanyak 0,86 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa pembentukan enzim lipase pada *Aspergillus oryzae* dapat digunakan untuk biotransformasi substrat menjadi senyawa lakton.

2.5 Microwave Enzimatic Reaction

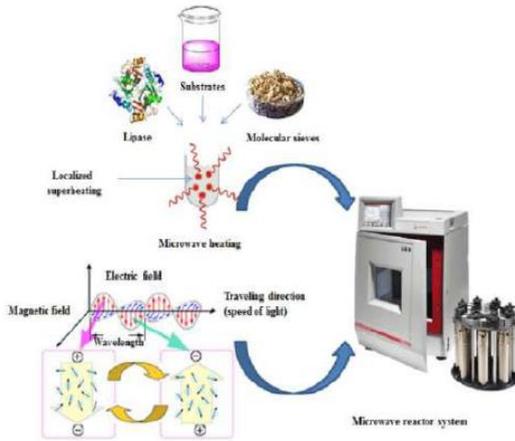
Teknologi *microwave* banyak digunakan pada industri kimia karena dapat meningkatkan laju konversi dan *yield* dalam waktu yang singkat [8]. Penggunaan *microwave* dalam kimia organik telah meningkatkan kecepatan reaksi, mengurangi biaya, mengurangi penggunaan energi sebagai proses “*green chemistry*” dengan meminimalisir material *non-renewable* seperti pelarut polutan, mengurangi produk samping yang berbahaya dan beracun dan mengurangi emisi gas [23].

Proses enzimatik memiliki kelemahan, salah satunya yaitu laju konversi berjalan lambat. Laju konversi dapat ditingkatkan dengan menggunakan bantuan gelombang mikro (*microwave*) [24]. Radiasi *microwave* terdapat pada frekuensi 300 MHz – 300 GHz dan panjang gelombang antara 1 m hingga 1 mm, kemudian panjang gelombang 12,24 cm dan frekuensi 2,45 GHz yang umum digunakan untuk reaksi enzimatik. Gelombang mikro juga memiliki radiasi yang meningkatkan stabilitas enzim dengan meminimalisir proses denaturasinya [8].

Medan listrik pada *microwave* dapat menginduksi proses osilasi lebih cepat pada suatu reaksi dan interaksi materi yang menyebabkan polarisasi dan re-orientasi antara molekul dipol. Suatu molekul mengalami momen dipol dapat menyerap gelombang mikro dan mengemisikan energi kalor serta energi internal pada sistem. Energi internal yang berasal dari gesekan dan tumbukan oleh interaksi antarmolekul menyebabkan peningkatan laju reaksi dalam waktu yang lebih singkat [25].

Microwave memiliki pengaruh kuat terhadap molekul polar yang memiliki momen dipol tinggi. Enzim lipase dan substrat dalam sintesis enzimatik memiliki momen dipol tinggi berdasarkan gugus fungsi

molekul yang memberikan karakter polar. Skema mekanisme reaksi enzimatis dengan radiasi *microwave* dijelaskan pada **gambar 2.5**. Molekul polar menunjukkan kecenderungan menyerap radiasi *microwave* lebih besar dan menghasilkan pemanasan supermolekuler pada rentang 13-26°C lebih tinggi dari titik didihnya [26].



Gambar 2.5 Mekanisme reaksi enzimatis dengan radiasi *microwave*.

Radiasi *microwave* dapat memberikan proses enzimatis yang lebih efektif. Modifikasi konformasi enzim lebih mudah dilakukan dibawah radiasi *microwave* dan membantu substrat lebih mudah mendekati sisi aktif enzim. Pengaruh *microwave* memberikan konformasi pada sisi aktif enzim yang berikatan dengan substrat membentuk kompleks substrat-enzim, sehingga enzim aktif dan menghasilkan produk dalam laju reaksi yang lebih cepat [8].

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Kegiatan ini dilakukan pada bulan Januari - Mei 2019.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah alat gelas, pengaduk magnet, jarum ose, seperangkat alat refluks, *microwave electrolux* modifikasi, *hotplate stirrer*, *laminar flow*, autoklaf model no. 25x American, *incubator shaker*, neraca analitik Mettler AE 25, lemari pendingin, inkubator, GC-MS.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam oleat, kultur biakan *Aspergillus oryzae*, *potato dextrose agar* (PDA), pepton, *extract yeast*, dekstrosa, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aktivator ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), n-heksana, MgSO_4 anhidrat, dan akuades.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan diantaranya adalah;

- 3.3.1 Analisis kandungan asam oleat
- 3.3.2 Pembuatan media padat
- 3.3.3 Penanaman biakan murni
- 3.3.4 Pembuatan media cair

- 3.3.5 Pembuatan kurva pertumbuhan
- 3.3.6 Pembuatan inokulum
- 3.3.7 Biotransformasi asam oleat secara konvensional
- 3.3.8 Biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave*
- 3.3.9 Isolasi dan karakterisasi produk biotransformasi

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Analisis Kandungan Asam Oleat

Asam oleat diambil 25 g lalu dilarutkan dalam 18 mL etanol dan ditambahkan 1 mL asam sulfat 1 M. Dilakukan ekstraksi dengan metode refluks selama 2 jam pada temperatur 70°C. Hasil refluks didinginkan dan diekstraksi dengan corong pisah. Bila tidak terjadi pemisahan lapisan pada larutan, ditunjukkan dengan larutan NaCl lalu dilakukan ekstraksi kembali. Dipisahkan lapisan organik kemudian ditambahkan MgSO₄ anhidrat sebagai *drying agent*.

Diambil sebanyak 1 mL hasil reaksi ke dalam botol vial 10 mL, lalu ditambahkan pelarut n-heksana sebanyak 9 mL. Asam oleat diinjeksikan pada GC-MS.

3.4.2 Pembuatan Media Padat

Media yang digunakan adalah *potato dextrose agar* (PDA). PDA sebanyak 1 g ditambahkan dalam 25 mL akuades sambil dipanaskan dan diaduk hingga mendidih. Larutan dipipet 5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit. Selanjutnya dibiarkan memadat sambil dimiringkan [27].

3.4.3 Penanaman Biakan Murni

Kapang *Aspergillus oryzae* dari biakan murni dipindahkan secara aseptis sebanyak 1 mata ose ke dalam media PDA kosong yang telah disterilkan. Selanjutnya diletakkan dalam inkubator pada temperatur 30°C selama 6 hari [27].

3.4.4 Pembuatan Media Cair

Media pertumbuhan *Aspergillus oryzae* untuk menghasilkan enzim lipase terdiri atas; pepton 2,5 g, *extract yeast* 1,25 g, dekstrosa 2,5 g, NaCl 1,25 g, KH_2PO_4 3,35 g, K_2HPO_4 4,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, dilarutkan dalam 250 mL akuades dengan *activator*; 0,00125 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0004 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00035 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0005 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, tween 80 0,2%, dan asam oleat 0,5%. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kultur jamur *Aspergillus oryzae* yang telah diremajakan dalam media PDA selama 6 hari pada temperatur 30°C (dari kultur stok) selanjutnya ditambahkan akuades steril sebanyak 5 mL kemudian dikocok. Suspensi spora tersebut dimasukkan kedalam 200 mL media cair secara aseptis. Kemudian diletakkan diatas *incubator shaker* pada temperatur 26°C dengan kecepatan ± 130 rpm. Pengamatan terhadap pertumbuhan *Aspergillus oryzae* dilakukan setiap 24 jam hingga jam ke-240 (hari ke-10) dengan mengambil 10 mL kultur dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian setiap tabung dilakukan penyaringan. Endapan yang telah disaring lalu dipanaskan dalam oven pada 80°C selama 1 jam hingga berat konstan. Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan hubungan antara logaritma berat kering miselium dan spora dengan waktu pertumbuhan (jam) [27].

3.4.6 Pembuatan Inokulum

Kultur stok disuspensikan dalam 5 mL akuades steril. Kemudian dimasukkan kedalam 70 mL media cair. Selanjutnya diinkubasi dalam *incubator shaker* pada temperatur 26°C dengan kecepatan ± 130 rpm selama 96 jam ($\frac{1}{2}$ fase log yang diperoleh dari kurva pertumbuhan) [27].

3.4.7 Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional

Sebanyak 4 media cair masing-masing sebanyak 50 mL dalam erlenmeyer 100 mL dengan komposisi asam lemak oleat 5% dan penambahan tween 80 0,2% [6]. Media cair disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit [27]. Keempat media didinginkan lalu ditambahkan 5 mL larutan inokulum secara aseptis kemudian masing-masing media diinkubasi selama 3, 5, 7, dan 9 hari pada temperatur 26°C dalam *incubator shaker* dengan kecepatan ± 130 rpm [6].

3.4.8 Biotransformasi Asam Oleat Dengan Iradiasi *Microwave*

Sebanyak 4 media cair masing-masing sebanyak 50 mL dalam erlenmeyer 100 mL dengan komposisi asam lemak oleat 5% dan penambahan tween 80 0,2% [6]. Media cair disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit [27]. Keempat media didinginkan lalu ditambahkan 5 mL larutan inokulum secara aseptis, kemudian masing-masing media diinkubasi 10 menit, 20 menit dan 30 menit dengan iradiasi *microwave* pada temperatur 31°C dan daya rendah.

3.4.9 Isolasi dan Karakterisasi Produk Biotransformasi

Produk biotransformasi dilakukan inaktivasi mikroba dengan dididihkan hingga 100°C. Kemudian produk disaring dengan kertas saring kualitatif 150mm. Filtrat diambil dan diekstraksi dengan pelarut n-heksana hingga terbentuk lapisan yang berbeda [22]. Lapisan organik diambil lalu diuapkan pelarut dengan *rotary evaporator*.

Diambil masing-masing 1 mL produk hasil isolasi dalam 9 mL pelarut n-heksana, kemudian dianalisis menggunakan GC-MS dengan spesifikasi sebagai berikut [28];

- a. Jenis kolom : Kolom kapiler Restrex RTX-5
- b. Temperatur kolom : 40-250°C
- c. Temperatur injektor : 250°C
- d. Laju alir : 1,00 mL/menit

3.5 Analisis Data

Berikut merupakan gambaran matriks data yang akan dilakukan pada penelitian ini.

Tabel 3.5.1. Matriks data penelitian variabel waktu inkubasi biotransformasi asam oleat secara konvensional

	Variasi waktu inkubasi (hari)*			
	3	5	7	9
Kode sampel	A1	A2	A3	A4

Keterangan:

*) = Inkubasi menggunakan *incubator shaker* pada temperatur ruang (26°C).

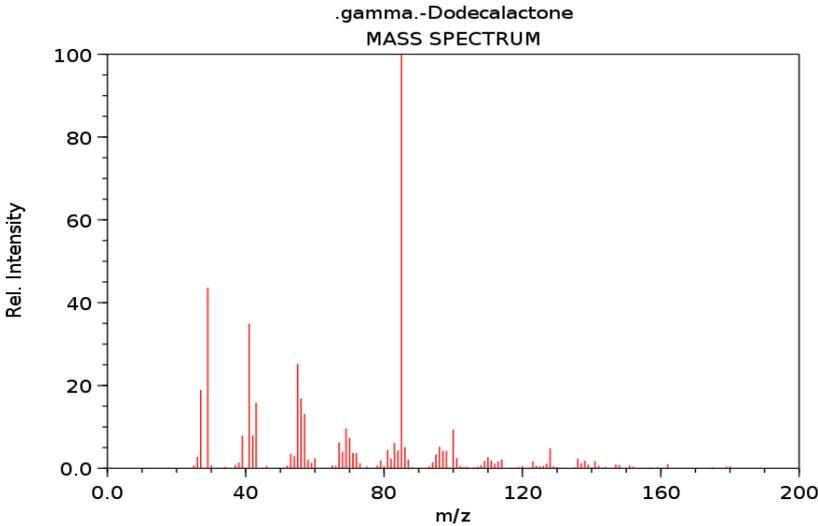
Tabel 3.5.2. Matriks data penelitian variabel waktu inkubasi biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave*

	Variasi waktu inkubasi (menit)**		
	10	20	30
Kode sampel	B1	B2	B3

Keterangan:

**) = Inkubasi menggunakan *microwave* termodifikasi pada temperatur 31°C.

Analisa data hasil produk biotransformasi yaitu senyawa *bioflavour* γ -dodekalakton dapat diukur dengan GC-MS. Menurut [29], senyawa γ -dodekalakton komersil menunjukkan beberapa pola fragmentasi pada spektra massa hasil analisis dengan instrumen GC-MS seperti pada **gambar 3.5**.



NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

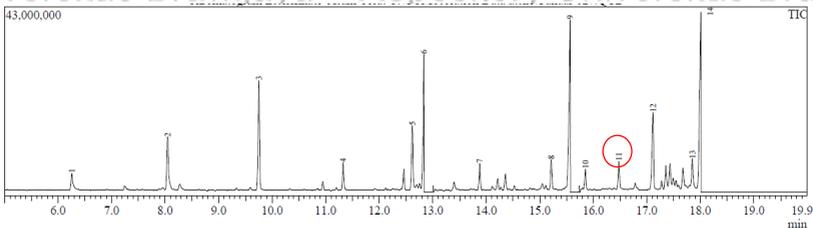
Gambar 3.5 Spektra massa γ -dodekalakton

Berdasarkan **gambar 3.5** spektra massa γ -dodekalakton diinterpretasikan oleh pola fragmentasi dalam rasio m/z yaitu 29, 41, 55, 69, 85, 100, dan 128.

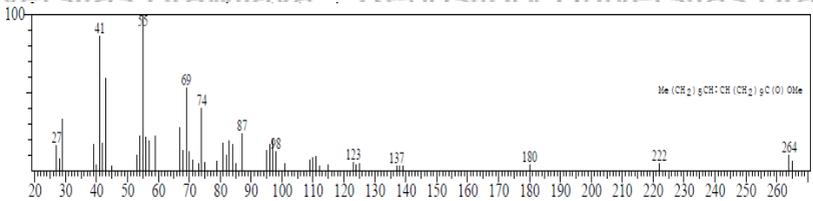
BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Analisis Substrat

Substrat asam oleat terlebih dahulu dianalisis dengan GC-MS sebelum dilakukan biotransformasi asam oleat untuk mengetahui tingkat kemurniannya. Analisis kandungan asam oleat dilakukan esterifikasi terlebih dahulu membentuk senyawa metil oleat. Hasil analisis GC dan MS senyawa pada **gambar 4.1** dan **gambar 4.2** serta mekanisme fragmentasi pada **Lampiran D** disajikan sebagai berikut.

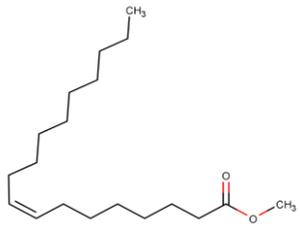


Gambar 4.1 Kromatogram metil oleat



Gambar 4.2 Spektra massa metil oleat pada t_r 16,477

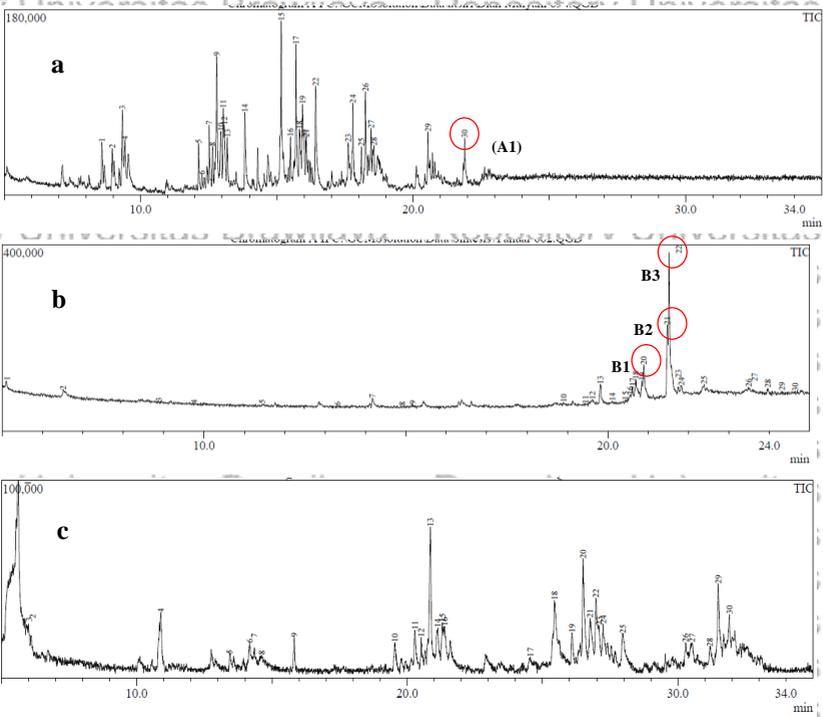
Berdasarkan **gambar 4.1** senyawa metil ester oleat diperoleh pada waktu retensi 16,477 (2,76%). Berdasarkan **gambar 4.2** diperoleh puncak fragmentasi yaitu 27, 41, 55, 69, 74, 87, 98, 123, 137, 180, 222 dan 264 yang telah dijelaskan **lampiran D** mekanisme fragmentasi tersebut. Hasil analisis substrat dengan GC-MS dapat diperkirakan struktur senyawa metil oleat seperti pada **gambar 4.3**

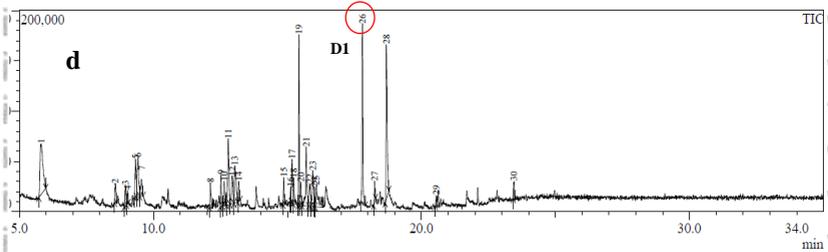


Gambar 4.3 Struktur senyawa metil oleat

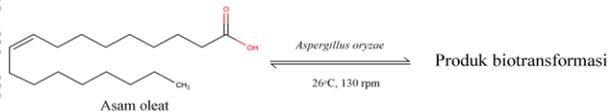
4.2 Pengaruh Waktu Inkubasi Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional

Biotransformasi asam oleat secara konvensional diperoleh produk yang dianalisis dengan GC-MS. Hasil karakterisasi produk biotransformasi secara konvensional diinterpretasikan kromatogram pada **gambar 4.4**





Gambar 4.4 Kromatogram biotransformasi asam oleat secara konvensional (a) hari ke-3, (b) hari ke-5, (c) hari ke-7, dan (d) hari ke-9.



Biotransformasi asam oleat secara konvensional dapat terjadi melalui reaksi enzimatis oleh lipase yang disekresikan mikroorganisme *Aspergillus oryzae* dengan kondisi temperatur 26°C dan kecepatan orbital *shaker* ±130 rpm diperoleh produk biotransformasi. Pada **tabel 4.1** menyajikan produk dari reaksi biotransformasi asam oleat merujuk kromatogram **gambar 4.4** dan analisis spektra massa pada **lampiran D**.

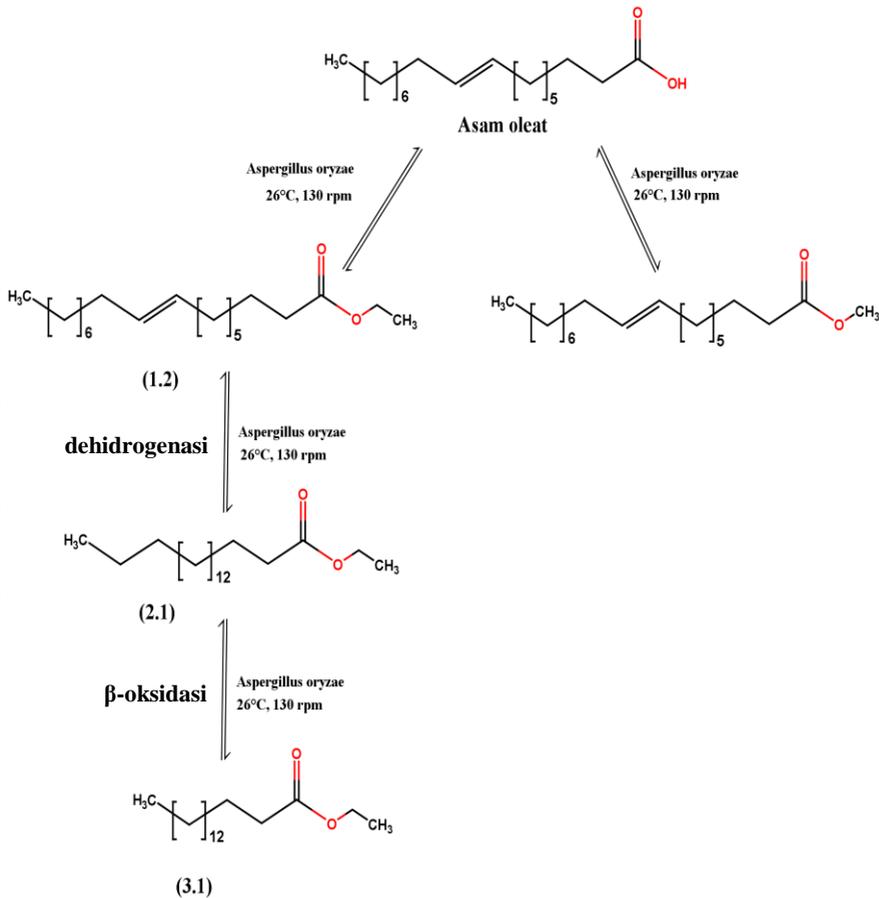
Tabel 4.1 Senyawa yang terbentuk dari biotransformasi asam oleat secara konvensional

Waktu inkubasi	Puncak*	t _R (menit)	% Area	Senyawa yang terbentuk
3 hari	A1	21,892	2,03	Metil oleat
	B1	19,818	4,97	Etil stearat
5 hari	B2	20,891	9,42	Metil 10-oktadekenoat
	B3	21,517	29,68	Etil oleat
7 hari	-	-	-	-
9 hari	D1	18,695	11,19	Etil palmitat

Keterangan:

*) = Puncak kromatogram pada **gambar 4.4**

Berdasarkan **tabel 4.1** senyawa-senyawa yang terbentuk dari biotransformasi asam oleat secara konvensional selama 3, 5, 7, dan 9 hari merupakan senyawa ester dan senyawa karboksilat yang dijelaskan pada **gambar 4.5**. Hal ini menunjukkan bahwa biotransformasi asam oleat secara konvensional belum mencapai tahap pembentukan senyawa asam hidroksi yang mengarah produksi senyawa γ -dodekalakton.



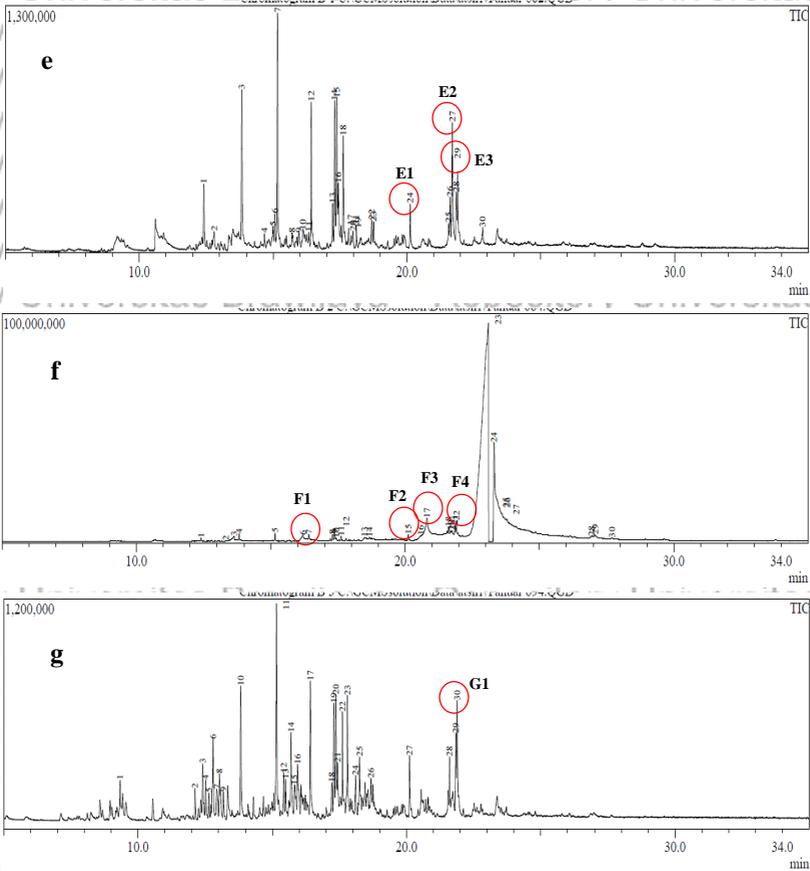
Gambar 4.5 Reaksi pembentukan senyawa produk biotransformasi asam oleat secara konvensional.

Menurut **gambar 4.5** menunjukkan biotransformasi asam oleat secara konvensional adanya tahap esterifikasi pada hari ke-3 membentuk metil oleat (**1.1**), selanjutnya hari ke-5 membentuk etil oleat (**1.2**) kemudian terjadi reaksi hidrogenasi membentuk etil stearat (**2.1**), pada hari ke-7 tidak teridentifikasi senyawa ester yang terbentuk, selanjutnya hari ke-9 membentuk senyawa etil palmitat (**3.1**) yang diperkirakan melibatkan β -oksidasi dari etil stearat. Senyawa yang terbentuk pada biotransformasi asam oleat secara konvensional melibatkan esterifikasi dan β -oksidasi dalam satu jalur konversi asam oleat dengan inkubasi hari ke-5 hingga hari ke-9.

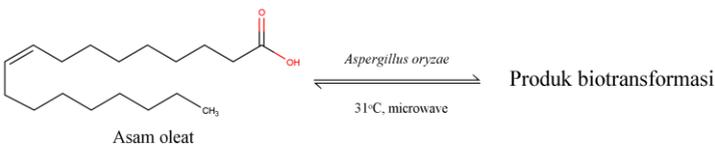
Produk biotransformasi asam oleat secara konvensional belum membentuk senyawa hidroksi sebagai senyawa intermediet dalam pembentukan γ -dodekalakton yaitu asam 10-hidroksistearat. Menurut penelitian Gocho dkk [6] diperlukan aktivitas enzimatis oleh mikroorganisme yang tinggi untuk transformasi asam oleat membentuk asam 10-hidroksistearat sehingga perlu dikondisikan dalam media yang mengandung asam stearat dan diinkubasi secara aerob. Sedangkan dalam metode penelitian ini tidak ada penambahan asam stearat dan proses inkubasi tidak secara aerob. Hal ini menyebabkan tidak terbentuknya senyawa γ -dodekalakton dalam biotransformasi asam oleat secara konvensional.

4.3 Pengaruh Waktu Inkubasi Biotransformasi Asam Oleat Dengan Iradiasi *Microwave*

Biotransformasi terhadap asam oleat diperoleh produk yang dianalisis dengan GC-MS. Hasil karakterisasi produk biotransformasi dengan iradiasi *microwave* diinterpretasikan kromatogram pada **gambar 4.6**



Gambar 4.6 Kromatogram biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* (e) menit ke-10, (f) menit ke-20, dan (g) menit ke-30.



Biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* dapat terjadi melalui reaksi enzimatik oleh lipase yang disekresikan mikroorganisme *Aspergillus oryzae* dengan kondisi temperatur 31°C dan daya rendah *microwave* menghasilkan produk biotransformasi.

Pada **tabel 4.2** menyajikan produk dari reaksi biotransformasi asam oleat merujuk kromatogram **gambar 4.6** dan analisis spektra massa pada **lampiran D**.

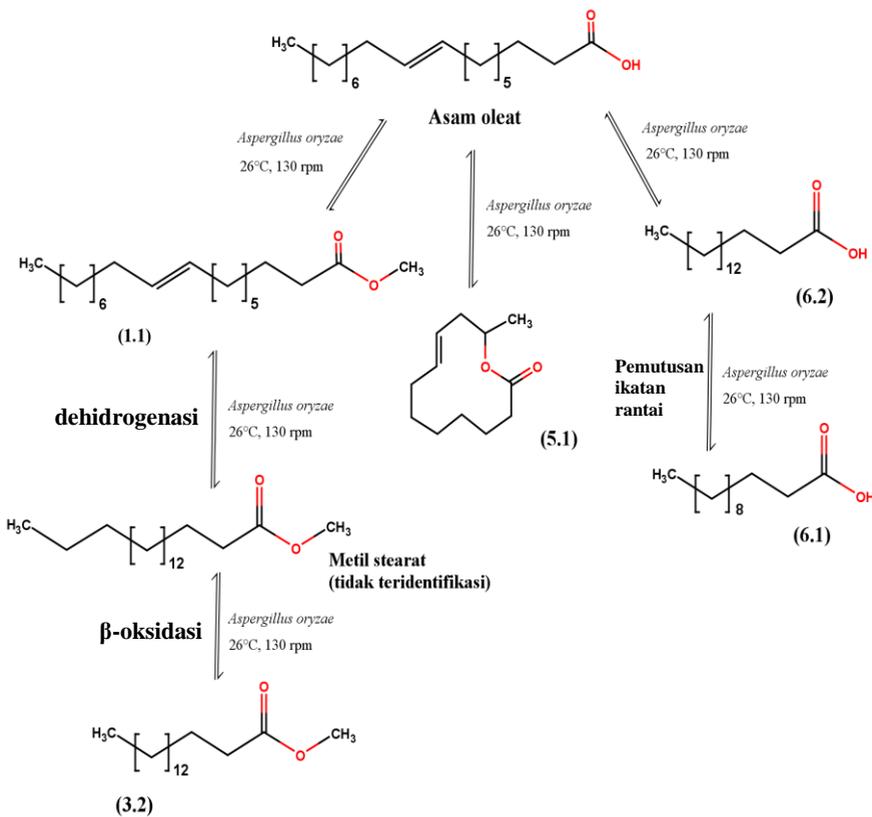
Tabel 4.2 Senyawa yang terbentuk dari biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave*

Waktu Inkubasi	Puncak*	t _R (menit)	%Area	Senyawa yang terbentuk
10 menit	E1	20,120	2,55	Metil palmitat
	E2	21,693	8,76	Asam 11-hidroksi-trans-8-dodekanoat lakton
	E3	21,891	3,44	Asam 10-oktadekanoat
20 menit	F1	16,192	0,69	Asam laurat
	F2	20,116	0,20	Metil palmitat
	F3	20,812	2,78	Asam palmitat
	F4	21,909	0,50	Metil oleat
30 menit	G1	21,884	4,74	Asam 10-oktadekanoat

Keterangan:

*) = Puncak kromatogram pada **gambar 4.6**

Berdasarkan **tabel 4.2** senyawa-senyawa yang terbentuk dari biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* selama 10, 20 dan 30 menit merupakan senyawa ester, karboksilat dan lakton yang dijelaskan pada **gambar 4.7**. Hal ini menunjukkan bahwa biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* belum mencapai tahap pembentukan senyawa intermidiet dan senyawa γ -dodekalakton.



Gambar 4.7 Reaksi pembentukan senyawa produk biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave*.

Menurut **gambar 4.7** menunjukkan biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* terdapat konversi asam oleat yang melibatkan esterifikasi menjadi metil oleat (1.1) kemudian mengalami dehidrogenasi membentuk metil stearat dan melibatkan tahap β-oksidasi membentuk metil palmitat (3.2) yang terdapat pada menit ke-10 (2,55%) dan menit ke-20 (0,20%). Senyawa laktone yang dihasilkan pada menit ke-10 diperkirakan melalui tahap β-oksidasi asam 10-oktadekenoat (4.1) yang dijelaskan pada lampiran E. Asam 10-

oktadekenoat yang terbentuk mengalami β -oksidasi membentuk asam 4-dodekenoat kemudian mengalami resonansi ikatan rangkap menjadi asam 8-dodekenoat, selanjutnya terjadi laktonisasi yang membentuk asam 11-hidroksi-trans-8-dodekanoat lakton (**5.1**). pada menit ke-20 terbentuk asam laurat (0,69%) dan asam palmitat (2,78%) yang diduga terbentuk melalui pemutusan rantai dari asam oleat. Secara keseluruhan, produk yang dihasilkan biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* menunjukkan semakin lama waktu inkubasi maka total jenis senyawa ester yang dihasilkan semakin menurun.

Produk biotransformasi dengan iradiasi *microwave* belum membentuk senyawa intermidiet dan senyawa γ -dodekalakton. Menurut penelitian Yadav dan Thoorat [30] penggunaan iradiasi *microwave* terhadap esterifikasi asam miristat memberikan hasil konversi tinggi dengan biokatalis enzim lipase sehingga penggunaan iradiasi *microwave* unggul dalam proses esterifikasi asam lemak. Hal ini dapat dilihat hasil biotransformasi asam oleat dengan iradiasi *microwave* yang menghasilkan senyawa ester, sehingga biotransformasi asam oleat dalam pembentukan senyawa intermidiet dan γ -dodekalakton kurang didukung melalui iradiasi *microwave*.

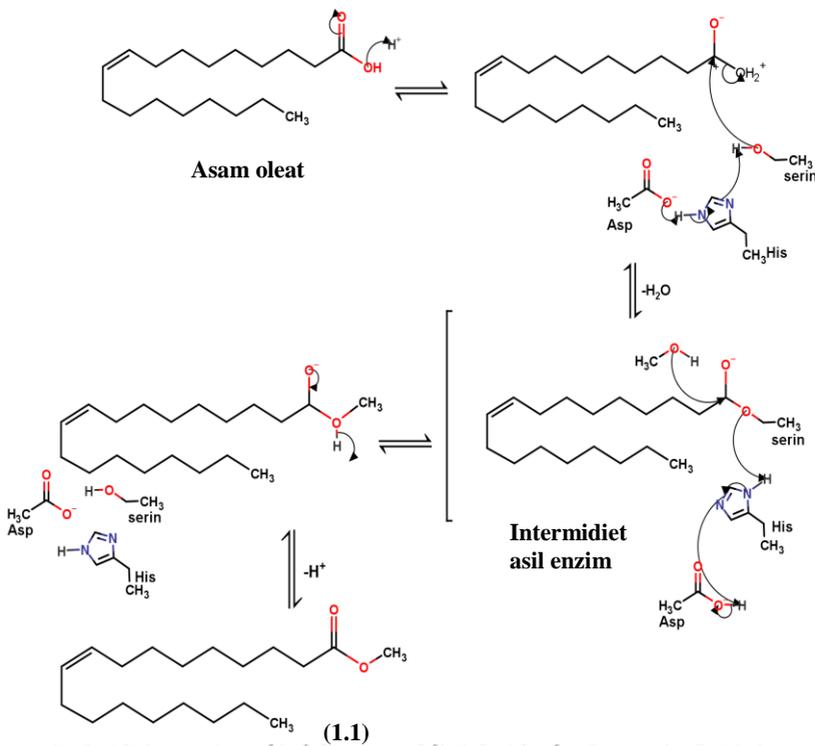
4.4 Hubungan Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional Dan Iradiasi Microwave

Karakterisasi produk biotransformasi asam oleat secara konvensional dan iradiasi *microwave* menghasilkan beberapa senyawa ester dan karboksilat. Konversi asam oleat menjadi senyawa ester palmitat dengan metode konvensional (11,19%) membutuhkan waktu selama 9 hari, sedangkan metode dengan iradiasi *microwave* membutuhkan waktu 10 menit (2,55%). Pembentukan senyawa ester palmitat dengan metode iradiasi *microwave* menggunakan temperatur 31°C memudahkan substrat yang dikonversi oleh mikroorganisme membentuk senyawa ester dibandingkan metode konvensional yang menggunakan temperatur 26°C sehingga pembentukan senyawa ester

palmitat lebih cepat dibandingkan menggunakan metode konvensional.

Produk yang diperoleh dari biotransformasi asam oleat secara konvensional dan iradiasi *microwave* tidak terdapat senyawa intermediet yang mengarah pembentukan senyawa γ -dodekalakton. Hal ini disebabkan oleh *Aspergillus oryzae* yang dapat sekresi beberapa enzim selain lipase yaitu enzim amilase, protease, dan selulase sehingga sisi aktif enzim tersebut memengaruhi produksi senyawa intermediet yang mengarah pembentukan senyawa γ -dodekalakton [19]. Enzim lipase yang disekresikan *Aspergillus oryzae* diperoleh jumlah yang sedikit dan aktivitas enzim lipase terhadap asam oleat dipengaruhi oleh reaksi hidrolisis lipase dengan enzim protease pada fase pertumbuhan sel [21]. Menurut Ohnishi dkk [21] aktivitas lipase mengalami peningkatan 10 kali lipat bila digunakan *jar fermentor* dengan adanya aerasi untuk proses biotransformasi dibandingkan metode fermentasi konvensional menggunakan *shaker* seperti diterapkan dalam penelitian ini.

Walaupun aktivitas lipase rendah, degradasi lipid dan esterifikasi asam lemak dapat meningkat seiring penambahan lipase dalam jumlah yang sedikit. Dalam reaksi reversibel, lipase dapat mengkatalisis pembentukan senyawa ester dari asam lemak [21]. Senyawa ester yang terbentuk seperti metil oleat oleh reaksi esterifikasi yang melibatkan hidrolisis lipase dijelaskan secara mekanisme pada **gambar 4.8**.



Gambar 4.8 Mekanisme esterifikasi asam oleat melalui hidrolisis lipase

Sisi aktif enzim lipase mengandung *triad catalytic* yaitu asam aspartat, histidin, dan serin. Histidin deprotonasi serin sehingga serin dapat menyerang gugus karbonil dengan menghidrolisis asam oleat membentuk intermidiet asil enzim kemudian etanol menyerang sisi aktif karbonil dan serin deprotonasi histidin sehingga melepas intermidiet asil enzim dan membentuk metil oleat [31].

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dapat diketahui bahwa:

1. Produk utama yang dihasilkan biotransformasi asam oleat metode konvensional adalah metil oleat (2.03%, 3 hari), etil oleat (29.68%, 5 hari), dan etil palmitat (11.19%, 9 hari), sedangkan metode *microwave* dihasilkan produk maksimum adalah asam 11-hidroksi-trans-8-dodekanoat lakton (8.76%, 10 menit), metil palmitat (2.55%, 10 menit), asam palmitat (2.78%, 20 menit), dan asam 10-oktadekenoat (4.74%, 30 menit).
2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap biotransformasi asam oleat metode konvensional, semakin lama waktu inkubasi maka produk yang terbentuk merupakan senyawa ester yang melibatkan esterifikasi dan β -oksidasi, sedangkan metode *microwave* semakin lama waktu inkubasi yang diperlukan maka total jenis produk ester yang terbentuk semakin menurun. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode *microwave* lebih cepat menghasilkan senyawa ester asam palmitat dibandingkan metode konvensional.

5.2 Saran

Sebaiknya desain *fermentor* perlu adanya aerasi untuk meningkatkan aktivitas lipase sehingga proses biotransformasi asam oleat lebih optimal dan dapat menghasilkan senyawa yang mengarah pembentukan γ -dodekalakton.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] G. Margavelu, L. Vijayakumar, D. Ramasamy, dan V. Thangavelu, 2008, **Microbial Biosynthesis of γ -Decalactone and its Applications-A Review**, *Glob. J. Biotechnol. Biochem.*, vol. 3.
- [2] C. Romero-Guido *dkk.*, 2011, **Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 3, hlm. 535–547.
- [3] A. Kondo, Y. Liu, M. Furuta, Y. Fujita, T. Matsumoto, dan H. Fukuda, 2000, **Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol**, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 10, hlm. 806–811.
- [4] T. M. Kuo dan H. Gardner, 2002, **Lipid Biotechnology**. CRC Press.
- [5] M. D. Mihovilovic, 2012, **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**. Third Edition, dalam *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Third Edition*, vol. 3, hlm. 1439–1485.
- [6] S. Gocho, N. Tabogami, M. Inagaki, C. Kawabata, dan T. Komai, 1995, **Biotransformation of Oleic Acid to Optically Active γ -Dodecalactone**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 59, no. 8, hlm. 1571–1572.
- [7] S. C. Cermak dan T. A. Isbell, 2000, **Synthesis of δ -stearolactone from oleic acid**, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 77, no. 3, hlm. 243–248.
- [8] N. R. Khan dan V. K. Rathod, 2018, **Microwave assisted enzymatic synthesis of speciality esters: A mini - review**, *Process Biochem.*, vol. 75, hlm. 89–98.
- [9] V. Osuna dan I. A. Rivero, 2012, **Study of the Influence of Microwave and Conventional Heating on the Lipase-Catalyzed Esterification of Lauric Acid with Different Alcohols**, *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 56, no. 2, hlm. 176–182.
- [10] J.-U. An, Y.-C. Joo, dan D.-K. Oh, 2013, **New Biotransformation Process for Production of the Fragrant Compound γ -Dodecalactone from 10-Hydroxystearate by Permeabilized *Waltomyces lipofer***

- Cells, Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 8, hlm. 2636–2641.
- [11] E. J. Yang, Y.-S. Kim, dan H. C. Chang, 2011, **Purification and Characterization of Antifungal δ -Dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 Isolated from Kimchi**, *J. Food Prot.*, vol. 74, no. 4, hlm. 651–657.
- [12] S.-G. Choi, S.-R. Won, dan H.-I. Rhee, 2010, **Chapter 153 - Oleic Acid and Inhibition of Glucosyltransferase**, dalam *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, V. R. Preedy dan R. R. Watson, Ed. San Diego: Academic Press, hlm. 1375–1383.
- [13] Pubchem, 2019, **MSDS of Oleic acid**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445639>. Diakses pada 11-Feb-2019
- [14] M. A. Ruiz, J. L. Arias, dan V. Gallardo, 2010, **Chapter 124 - Skin Creams Made with Olive Oil**, dalam *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, V. R. Preedy dan R. R. Watson, Ed. San Diego: Academic Press, hlm. 1133–1141.
- [15] R. Singh, 2017, **Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations**, *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, vol. 4.
- [16] P. Barbesgaard, H. P. Heldt-Hansen, dan B. Diderichsen, 1991, **Mini-review On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review**, hlm. 2.
- [17] P. Dehghan, F. Zaimi, S. Rezaei, A. Jebali, P. Kordbacheh, dan M. Mahmoudi, 2008, **Detection of Aflr Gene and Toxicogenicity of *Aspergillus flavus* Group Isolated from Patients with Fungal Sinusitis**, hlm. 9.
- [18] S. Takagi, 2014, **Koji mold (*Aspergillus oryzae*)**, <https://www.accessscience.com:443/content/koji-mold-aspergillus-oryzae/900130>, diakses pada 12-02-2019
- [19] M. Machida, O. Yamada, dan K. Gomi, 2008, **Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future**, *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes*, vol. 15, no. 4, hlm. 173–183.

- [20] S. Dali, A. B. D. R. Patong, M. N. Jalaluddin, Pirman, dan B. Hamzah, 2011, **Immobilization of Isolated Lipase From Moldy Copra (*Aspergillus Oryzae*)**, *E-J. Chem.*, vol. 8, no. 2, hlm. 896–902.
- [21] K. Ohnishi, Y. Yoshida, dan J. Sekiguchi, 1994, **Lipase production of *Aspergillus oryzae***, *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 77, no. 5, hlm. 490–495.
- [22] D. & O. I. Fritzsche, 1983, **Production of gamma-decalactone**, WO1983001072A1.
- [23] J. Jacob, 2012, **Microwave Assisted Reactions in Organic Chemistry: A Review of Recent Advances**, *Int. J. Chem.*, vol. 4, no. 6.
- [24] S. R. Bansode dan V. K. Rathod, 2018, **Enzymatic synthesis of Isoamyl butyrate under microwave irradiation**, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.*, vol. 129, hlm. 71–76.
- [25] V. Polshettiwar dan R. S. Varma, 2008, **Microwave-assisted organic synthesis and transformations using benign reaction media**, *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 5, hlm. 629–639.
- [26] P. Lidstroem, J. Tierney, B. Wathey, dan J. Westman, 2001, **Microwave assisted organic synthesis: review**, hlm. 59.
- [27] C. Widiastutik, 2006, **Penentuan Suhu dan Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Lipase Amobil dari *Mucor miehei***, Universitas Brawijaya, Malang.
- [28] M. Alchiniab *dkk.*, 2009, **Production of γ -Decalactone by a Psychrophilic and a Mesophilic Strain of the Yeast *Rhodotorula aurantiaca***, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 158, no. 1, hlm. 41–50.
- [29] NIST Webbook, 2019, **γ -Dodecalactone**, tersedia pada: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C2305057&Mask=200#Mass-Spec>. Diakses: 16-Jun-2019.
- [30] G. D. Yadav dan P. A. Thorat, 2012, **Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system**, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. Complete, no. 83, hlm. 16–22.
- [31] A. D. Simone, 2016, **Engineering the genetic code of *Escherichia coli* with methionine analogues and**

bioorthogonal amino acids for protein immobilization,
Technische Universität Berlin; Berlin.

LAMPIRAN

Lampiran A: Diagram Alir

A.1 Analisis Kandungan Asam Oleat

Diambil 25 g asam oleat lalu ditambahkan 18 mL etanol dan 1 mL asam sulfat 1 M kedalam labu alas bulat



Dirangkat alat refluks, campuran diekstraksi metode refluks pada 70°C selama 2 jam



Hasil refluks didinginkan lalu dijenuhkan dengan NaCl



Larutan diekstraksi dengan corong pisah, diambil lapisan organik



Lapisan organik ditambahkan MgSO₄ anhidrat, dipisahkan padatan MgSO₄ hidrat



Asam oleat metil ester



Diambil 1 mL lalu dilarutkan dalam 9 mL n-heksana



Dianalisis dengan GC-MS

A.2 Pembuatan Media Padat

PDA ditimbang 1 g lalu ditambahkan dalam 25 mL akuades sambil dipanaskan dan diaduk hingga mendidih



Larutan diambil 5 mL dan dimasukkan kedalam tabung, disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit.



Disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit.



Media didinginkan dan dibiarkan memadat



Media padat steril

A.3 Penanaman Biakan Murni

Diambil kapang *Aspergillus oryzae* dari biakan murni



Dipindahkan secara aseptis sebanyak 1 mata ose
kedalam media PDA kosong yang telah disterilkan



Diinkubasi dalam inkubator pada temperatur 30°C
selama 6 hari



Kapang *Aspergillus oryzae* berumur 6 hari

A.4 Pembuatan Media Cair

Ditimbang pepton 2,5 g, *extract yeast* 1,25 g, dekstroza 2,5 g, NaCl 1,25 g, KH_2PO_4 3,35 g, K_2HPO_4 4,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, dengan *activator*:
0,00125 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0004 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,00035 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0005 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
tween 80 0,2%, dan asam oleat 0,5% dilarutkan dalam
250 mL akuades



Disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit.



Media cair steril

A.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kapang *Aspergillus oryzae* berumur 6 hari ditambahkan 5 mL akuades steril lalu dikocok

Suspensi spora dimasukkan kedalam 200 mL media cair secara aseptis

Diinkubasi dalam *incubator shaker* pada temperatur 26°C dengan kecepatan ± 130 rpm

Dicuplik tiap 24 jam hingga jam ke-240 (hari ke-10) dengan mengambil 10 mL kultur dan dimasukkan kedalam tabung reaksi

Setiap tabung disaring lalu endapan miselium/spora dipanaskan pada 80°C selama 1 jam hingga berat konstan

Dibuat kurva pertumbuhan hubungan antara berat miselium dan waktu pertumbuhan

Diperoleh kurva pertumbuhan *Aspergillus oryzae*

A.6 Pembuatan Inokulum

Kapang *Aspergillus oryzae* berumur 6 hari ditambahkan 5 mL akuades steril lalu dikocok



Suspensi spora dimasukkan kedalam 70 mL media cair secara aseptis



Diinkubasi selama 96 jam ($\frac{1}{2}$ fase log yang diperoleh dari kurva pertumbuhan) dalam *incubator shaker* temperatur 26°C dengan kecepatan ± 130 rpm



Diperoleh inokulum berumur 96 jam

A.7 Biotransformasi Asam Oleat Secara Konvensional

Diambil 50 mL media cair dengan komposisi asam oleat 5% dan tween 80 0,2% dalam 100 mL erlenmeyer (dibuat sebanyak 4 media cair)



Media cair disterilkan dalam autoklaf pada 121 °C, 15 psi selama 15 menit



Keempat media didinginkan lalu ditambahkan 5 mL larutan inokulum secara aseptis



Masing-masing media diinkubasi dalam *incubator shaker* pada temperatur 26 °C dengan kecepatan ± 130 rpm selama 3, 5, 7, dan 9 hari

A.8 Biotransformasi Asam Oleat Dengan Iradiasi *Microwave*

Diambil 50 mL media cair dengan komposisi asam oleat 5% dan tween 80 0,2% dalam 100 mL erlenmeyer (dibuat sebanyak 4 media cair)



Media cair disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 15 menit



Keempat media didinginkan lalu ditambahkan 5 mL larutan inokulum secara aseptis



Masing-masing media diinkubasi selama 10 menit, 20 menit dan 30 menit dengan iradiasi *microwave* pada temperatur 31°C dan daya rendah

A.9 Isolasi dan Karakterisasi Produk Biotransformasi

Produk biotransformasi dipanaskan hingga 100°C
kemudian didinginkan

Produk disaring dengan kertas saring kualitatif 150mm

Filtrat diambil dan diekstraksi dengan pelarut n-heksana
hingga terbentuk lapisan yang berbeda

Lapisan organik diambil lalu diuapkan pelarut dengan
rotary evaporator

Ekstrak produk biotransformasi

Diambil masing-masing 1 mL produk hasil isolasi dalam
9 mL pelarut n-heksana

Dianalisis dengan GC-MS

Lampiran B : Perhitungan Mol Substrat

Perhitungan mol substrat esterifikasi asam oleat

$$\text{Massa asam lemak} = 25 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Mol Asam Oleat} &= \frac{\text{Massa Asam Oleat}}{\text{Mr Asam Oleat}} \\ &= \frac{25 \text{ g}}{282,468 \text{ g/mol}} \\ &= 0,0885 \text{ mol} \end{aligned}$$

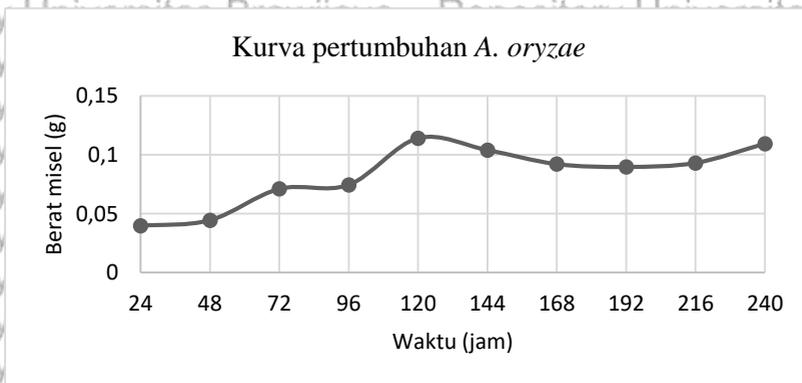
$$\begin{aligned} \text{Massa Etanol} &= \text{Massa jenis etanol} \times V. \text{ etanol} \\ &= 0,978 \text{ g/mL} \times 18 \text{ mL} \\ &= 17,604 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Mol Etanol} &= 17,604 \text{ g} / (46,069 \text{ g/mol}) \\ &= 0,3821 \text{ mol} \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka perbandingan mol asam oleat : etanol adalah 1:4

Lampiran C: Pembuatan Kurva Pertumbuhan

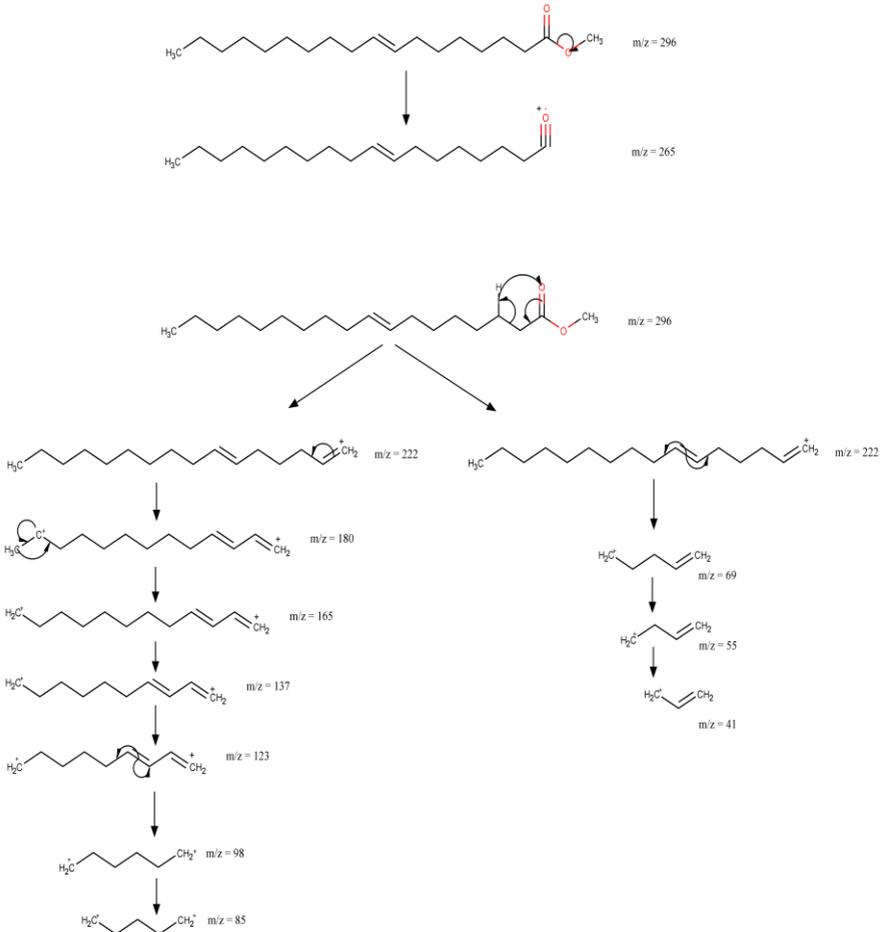
Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan berdasarkan hubungan antara logaritma berat kering miselium dan spora *Aspergillus oryzae* dengan waktu pertumbuhan (jam). Kurva pertumbuhan digunakan untuk proses biotransformasi asam oleat secara konvensional dan iradiasi *microwave*. Kurva pertumbuhan diperoleh sebagai berikut.



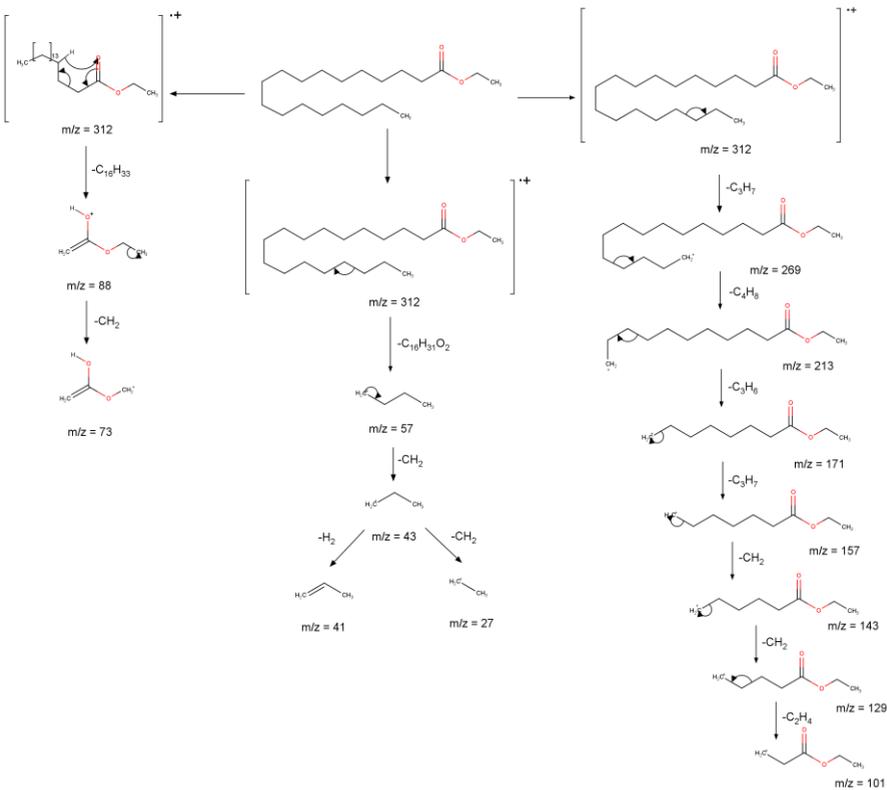
Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut untuk proses biotransformasi mikrobial terhadap asam oleat dilihat pada ½ fase log dari kurva pertumbuhan yaitu pada jam ke-96.

Lampiran D: Mekanisme Fragmentasi Spektra Massa

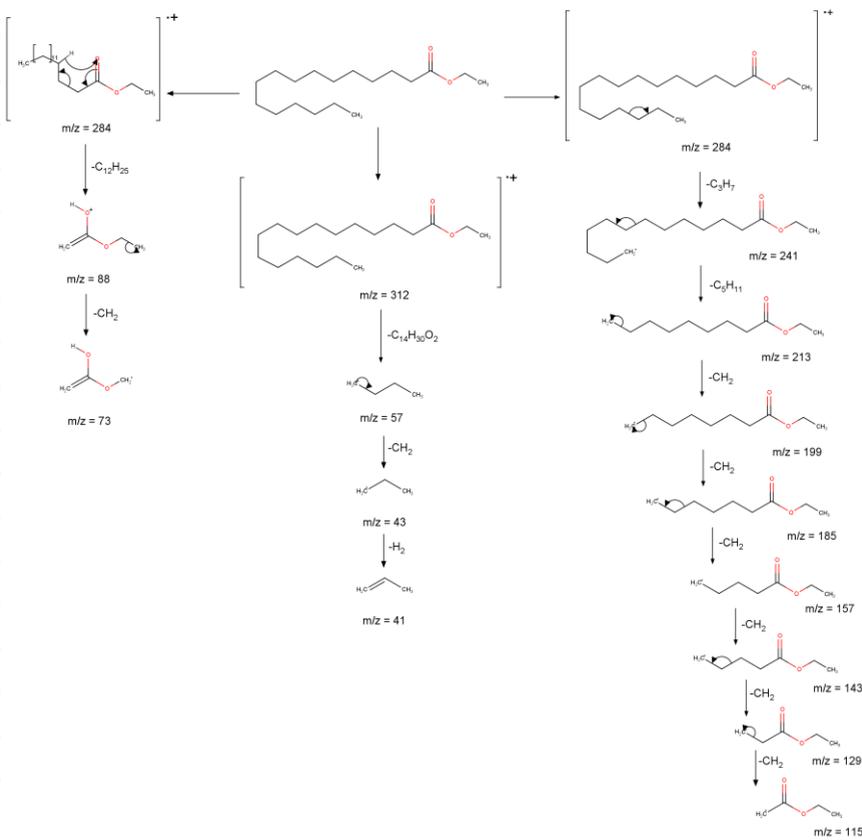
D.1 Mekanisme Fragmentasi Metil Oleat



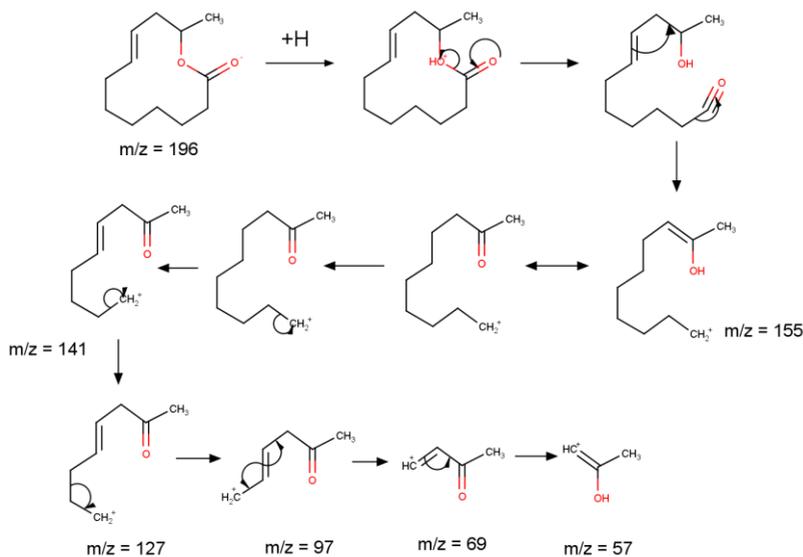
D.2 Mekanisme fragmentasi etil stearat



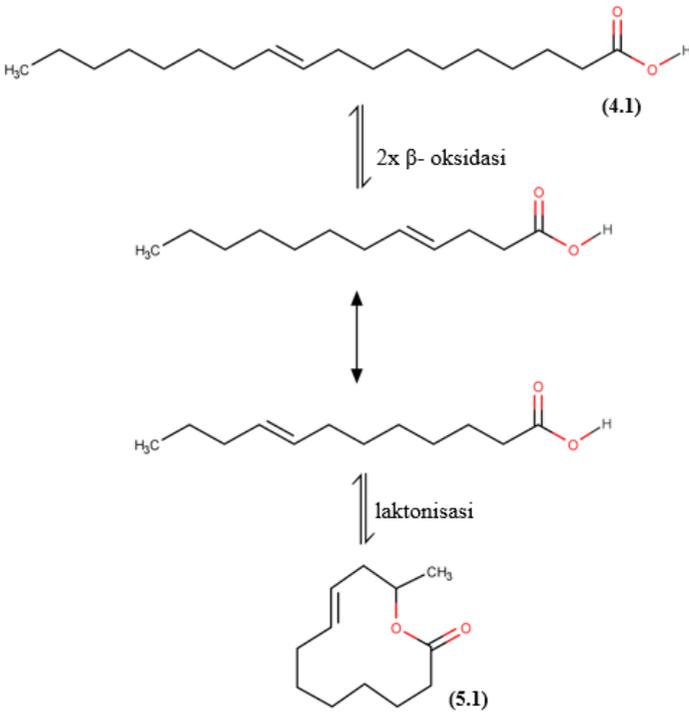
D.3 Mekanisme fragmentasi etil palmitat



D.4 Mekanisme fragmentasi asam 11-hidroksi-trans-8-dodekanoat lakton



Lampiran E: Perkiraan Tahap Reaksi Pembentukan Asam 11-Hidroksi-trans-8-dodekanoat Lakton



Lampiran F: Dokumentasi
F.1 Analisis Substrat



F.2 Biotransformasi Mikrobial Asam Oleat Secara Konvensional



F.3 Biotransformasi Mikrobial Asam Oleat Dengan Iradiasi
Microwave

