

ESTERIFICATION

BUDIDAYA

KKC

KK

660.284 44

Sum

e



LAPORAN PENELITIAN
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2001

ESTERIFIKASI DENGAN BIOKATALIS LIPASE UNTUK SINTESIS EMULSIFIER MONO-OLEIL GLISEROL

Peneliti:

Dra. SRI SUMARSIH, M.Si.

Dra. TJITJIK SRIE TJAHJANDARIE, Ph.D.

3000270023141

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2001

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 5306/J03/PG/2001

Tanggal 12 Juni 2001

Nomor Urut: 33

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Desember, 2001



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga | 10. Puslit/ Kesehatan Reproduksi |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

3000270023141

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. Judul Penelitian	: Esterifikasi Dengan Biokatalis Lipase Untuk Sintensis <i>Emulsifier</i> Mono-Oleil Gliserol
a. Macam Penelitian	: ☐ Fundamental ☐ Terapan ☐ Pengembangan
b. Kategori Penelitian	: ☐ I ☐ II ☐ III
2. Kepala Poyek Penelitian	
a. Nama lengkap dan Gelar	: Dra. Sri Sumarsih, M.Si.
b. Jenis kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata/IIIc/131 802 890
d. Jabatan Sekarang	: Staf Pengajar
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: MIPA
f. Univ./Ins./Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang diteliti	: Kimia Organik/Biotransformasi
3. Jumlah Tim Peneliti	: 2 (dua) orang
4. Lokasi Penelitian	: Lab. Kimia Organik FMIPA Unair
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka waktu penelitian	: 5 (lima) bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 3.500.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian	
a. Dilaksanakan Tanggal	: 4 Desember 2001
b. Hasil Penelitian	: () Baik Sekali (V) Baik () Sedang () Kurang



Surabaya, 4 Desember 2001



Mengetahui/Mengesahkan
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.
NIP 180 701125

Scan Elara-2001 - 09-2001 - MIPA

RINGKASAN

ESTERIFIKASI DENGAN BIOKATALIS LIPASE UNTUK SINTESIS EMULSIFIER MONO-OLEIL GLISEROL (Sri Sumarsih, Tjitjik Srie Tjahjandarie, 2002, 37 halaman)

Pada reaksi esterifikasi poliol, aktivitas esterifikasi dan stabilitas enzim lipase tinggi dapat dicapai di dalam medium organik hidrofobik, namun poliol yang hidrofilik bersifat *immiscible* di dalam pelarut tersebut, sehingga reaksi berjalan sangat lambat. Lipase dari sumber yang berbeda memperlihatkan aktivitas dengan spesifisitas yang berbeda terhadap posisi dan jenis asam lemak.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan (1) Bagaimanakah kondisi reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase di dalam medium organik hidrofobik, (2) bagaimanakah selektivitas lipase *Candida rugosa* sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dan (3) apakah mono-oleil gliserol dapat dihasilkan pada kondisi percobaan

Tujuan penelitian ini adalah (1) mengetahui kondisi reaksi berlangsungnya proses esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase di dalam medium organik hidrofobik, (2) mengetahui selektivitas lipase dari *Candida rugosa* sebagai biokatalis pada esterifikasi gliserol dan asam oleat dan (3) mengetahui apakah mono-oleil gliserol dapat diperoleh pada kondisi percobaan.

Pada penelitian ini, reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase *Candida rugosa* dilakukan dengan cara mengadsorpsikan substrat hidrofilik gliserol pada silika gel (1 : 1 b/b) dan melarutkan substrat asam oleat dalam pelarut organik hidrofobik (n-heksana atau sikloheksana). Reaksi dilakukan pada berbagai konsentrasi gliserol dan waktu reaksi. Analisis produk dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fasa gerak campuran kloroform-metanol (1 : 1 v/v) dan GC/ MS.

Hasil analisis dengan KLT memperlihatkan bahwa proses reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase di dalam medium organik hidrofobik dapat berlangsung pada kondisi reaksi : substrat gliserol-silika gel 0,6 – 1,8 gram, substrat asam oleat 30 mM dalam 20 mL medium organik hidrofobik (n-heksana atau sikloheksana) dan enzim lipase 0,2 gram setelah inkubasi selama 3 jam pada temperatur 40^o C. Pada kondisi reaksi ini dihasilkan produk dominan dengan $R_f = 0,58$. Hasil analisis dengan alat GC/ MS menunjukkan bahwa pada kondisi percobaan, lipase dari *Candida rugosa* mempunyai spesifisitas terhadap sintesis di-oleil gliserol. Sedangkan senyawa yang dikehendaki yaitu mono-oleil gliserol tidak dapat diperoleh dari percobaan ini. Hal ini kemungkinan disebabkan karena mono-oleil gliserol tidak/ kurang larut di dalam n-heksana atau sikloheksana atau mono-oleil yang terbentuk teradsorpsi pada silika gel atau karena memang lipase *Candida rugosa* bersifat spesifik pada sintesis di-oleil gliserol.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka disarankan untuk mempelajari aktivitas lipase sebagai biokatalis pada berbagai reaksi esterifikasi di dalam media organik, dengan cara (1) modifikasi medium organik untuk mendapatkan medium dengan kepolaran yang tepat bagi mono-oleil gliserol dan (2) mencari lipase dari berbagai sumber yang mempunyai spesifisitas terhadap sintesis senyawa yang dikehendaki.

(Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga : DIK Suplemen Universitas Airlangga, nomor kontrak : 589/J03.2/PG/2001)

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kami panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya, sehingga penelitian dan penyusunan laporan ini dapat terselesaikan. Penelitian ini bertujuan mengaplikasikan metode esterifikasi dengan biokatalis lipase untuk sintesis *emulsifier* mono-oleil gliserol.

Melalui kesempatan ini, kami mengucapkan terima kasih atas kesempatan, fasilitas dan semua bantuan yang telah diberikan kepada kami, terutama kepada :

1. Pimpinan Universitas Airlangga
2. Pimpinan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
3. Pimpinan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
4. Pimpinan Jurusan Kimia FMIPA Unair dan Kepala Laboratorium Kimia Organik
5. Rekan-rekan sejawat, laboran dan analis di Lab. Kimia Organik serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Kami menyadari bahwa laporan ini belum sempurna, meskipun demikian kami berharap semoga penelitian ini berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Januari 2002

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan Tentang Biokatalis	5
2.2. Tinjauan Tentang Biotransformasi	6
2.3. Tinjauan Tentang Lipase	13
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
3.1. Tujuan Penelitian	19
3.2. Manfaat Penelitian	19
BAB IV METODE PENELITIAN	20
4.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	20
4.2. Bahan dan Alat Penelitian	20
4.3. Variabel Penelitian	21

	4.4. Prosedur Kerja	21
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	26
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	36
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1 Prospek dan Konsekuensi Penggunaan Isolat Enzim dan Whole Cell (sel utuh)	7
Tabel 5.1 Perkiraan Senyawa Produk Esterifikasi	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kromatogram produk esterifikasi

Lampiran 2. (a) Spektrum massa senyawa-9 produk esterifikasi

(b) Spektrum massa senyawa di-(9-oktadekenoil) gliserol

Lampiran 3. (a) Spektrum massa senyawa-10 produk esterifikasi

(b) Spektrum Massa senyawa asam oleat

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Ketertarikan penggunaan biokatalis dalam sintesis organik mengalami peningkatan dengan pesat, terutama untuk produksi senyawa-senyawa aktif biologis enansiomer tunggal dan *biodegradable*. Keadaan fisik biokatalis yang digunakan untuk biotransformasi dapat berbeda-beda, antara lain : isolat enzim, enzim murni/ sedikit murni atau mikroorganisme utuh (sel yang sedang tumbuh atau sel istirahat), baik bentuk bebas atau bentuk amobil. Hal ini sangat tergantung pada berbagai faktor, antara lain : tipe reaksi, ada/ tidaknya kofaktor yang perlu di-*recycle* dan skala biotransformasi yang akan dilakukan.

Air merupakan medium reaksi yang esensial untuk biokatalisis, baik dengan enzim maupun dengan sel. Hal ini telah diakui sebagai suatu kelebihan dari biokonversi. Namun demikian, penggunaan medium air untuk biokonversi menyebabkan aplikasi biokatalisis dalam sintesis organik menjadi terbatas, karena hampir semua senyawa organik kurang larut dalam medium air. Reaksi samping seperti hidrolisis, rasemisasi, polimerisasi dan dekomposisi sering terjadi dengan adanya air. Penggunaan pelarut organik dalam sistem reaksi biokatalisis, mempunyai banyak kelebihan. Pelarut organik memperbesar kelarutan reaktan sehingga akan meningkatkan produktivitas sistem reaksi. Keseimbangan reaksi dapat ditingkatkan ke arah pembentukan produk, karena produk reaksi terekstraksi di dalam pelarut organik. Hal ini memudahkan dalam

recovery biokatalis dan produk reaksi (disebut *extractive bioconversion*). Produk reaksi yang tinggi juga dapat dicapai dengan mereduksi kemungkinan inhibisi enzim oleh substrat dan produk serta mencegah reaksi samping yang tidak diinginkan.

Lipase (triasilgliserol hidrolase, EC 3.1.1.3) merupakan kelompok enzim yang paling banyak dipelajari dalam pengembangan biotransformasi dan telah dimanfaatkan dalam industri obat-obatan, kosmetika, pestisida, biosurfaktan, flavor, makanan dan detergen. Lipase mampu mengkatalis hidrolisis trigliserida atau asil dan aril ester di dalam larutan berair. Di samping itu, lipase juga mampu mengkatalis reaksi esterifikasi, transesterifikasi dan derivatisasi enansioselektif senyawa-senyawa khiral. Lipase telah digunakan dalam modifikasi lemak/minyak melalui reaksi transesterifikasi, untuk menemukan senyawa-senyawa baru dengan sifat-sifat yang lebih baik dan untuk meningkatkan bahan baku murah menjadi produk-produk yang lebih berharga. Linko et al. (1998) telah melaporkan bahwa lipase dapat digunakan sebagai biokatalis pada senyawa-senyawa *biodegradable*, misalnya poliestер alifatik dan aromatik.

Lipase bersifat aktif di dalam pelarut organik dengan kandungan air terbatas, di mana kesetimbangan kimia meningkat terhadap sintesis ester. Aktivitas hidrolitik lipase telah dilaporkan berhubungan dengan aktivitas sintetik. Pembentukan air merupakan problem dalam reaksi esterifikasi karena memungkinkan terjadinya reaksi samping hidrolitik, kontrol kandungan air dalam sistem reaksi merupakan faktor yang penting untuk optimasi reaksi esterifikasi di dalam media organik.

Hasil penelitian yang dilakukan terdahulu menunjukkan adanya keterkaitan antara aktivitas hidrolisis dan aktivitas sintesis dari beberapa jenis lipase. Walaupun demikian, beberapa lipase yang mempunyai aktivitas hidrolisis serupa memperlihatkan aktivitas esterifikasi yang bervariasi. Dari 25 jenis lipase komersial yang tersedia, ditemukan bahwa lipase dari *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei* dan *Pseudomonas fluorescens* yang memperlihatkan aktivitas yang tinggi sebagai biokatalis pada sintesis butil oleat (Linko et al., 1998).

Pada reaksi esterifikasi, air merupakan produk reaksi yang memungkinkan terjadinya hidrolisis ester yang terbentuk, sehingga kontrol kandungan air dalam sistem reaksi merupakan satu faktor yang penting. Pada umumnya reaksi esterifikasi dilakukan di dalam sistem pelarut organik hidrofobik ataupun sistem tanpa pelarut, karena kesederhanaan dan keamanannya (Yahya et al., 1998).

Ester asam lemak dari poliol telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri. Sebagai contohnya, ester asam lemak dari gula memperlihatkan sifat *emulsifying*, *stabilizing* atau *conditioning* yang sangat baik. Dalam industri makanan, propilen glikol monoester dari eikosapentanoat dan dokosaheksanoat merupakan *emulsifier* yang bermanfaat untuk kesehatan yaitu mampu mereduksi trombotik dan hipertrigliserida. Mono-ester poliol dilaporkan merupakan *emulsifying agent* yang digunakan dalam industri makanan dan obat-obatan, sedangkan alkil poliglikosida merupakan surfaktan generasi baru dalam industri detergen. Secara industri, senyawa-senyawa tersebut diproduksi dengan cara esterifikasi poliol dan asam lemak menggunakan katalis kimia. Metode kimia

pada umumnya membutuhkan kondisi reaksi ekstrim sehingga menghasilkan campuran produk reaksi. Penggunaan enzim sebagai biokatalis dalam sintesis organik merupakan alternatif yang baik.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mempelajari selektivitas lipase sebagai biokatalis dalam reaksi esterifikasi enzimatik dari poliol, antara lain penggunaan jenis lipase dan pelarut organik yang berbeda serta variasi perbandingan reaktan. Kwon et al. (1995) melaporkan bahwa lipase *Mucor miehei* mempunyai spesifitas untuk produksi di-palmitoil gliserol sedangkan lipase *Rhizopus delemar* menghasilkan mono-palmitoil gliserol.

Dari latar belakang permasalahan di atas, pada penelitian ini dipelajari reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase *Candida rugosa*, untuk mengetahui kondisi reaksi dan selektivitas lipase *Candida rugosa* serta apakah mono-oleil gliserol dapat dihasilkan pada kondisi reaksi tersebut.

1.2. Rumusan masalah

Dari uraian latar belakang permasalahan di atas, permasalahan yang akan dijawab pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah kondisi reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase di dalam medium organik hidrofobik ?
2. Bagaimanakah selektivitas lipase *Candida rugosa* pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat ?
3. Apakah mono-oleil gliserol dapat dihasilkan pada kondisi reaksi tersebut ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Biokatalis

Enzim merupakan protein yang mempunyai fungsi spesifik sebagai katalis yang efektif, mempunyai spesifitas yang tinggi terhadap substrat dan hanya mengkatalis jenis reaksi tertentu. Di dalam reaksi enzimatik, substrat berikatan dengan konfigurasi tertentu pada lokasi spesifik pada permukaan enzim membentuk kompleks enzim-substrat. Jenis ikatan pada enzim-substrat dapat berupa ikatan ionik, ikatan kovalen atau interaksi hidrofobik antara gugus fungsi substrat dan gugus fungsi aminoasil dari enzim (Cunningham, 1978).

Penggunaan enzim sebagai biokatalis mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan katalis kimia (Faber, 1992; Champe & Harvey, 1994).

- a. Enzim adalah katalis yang efisien, mampu mempercepat reaksi $10^{10} - 10^{12}$ lebih cepat dibandingkan dengan reaksi non enzimatik dan setiap molekul enzim mampu mengubah 100 – 1000 molekul substrat menjadi produk setiap detik.
- b. Enzim ramah lingkungan.
- c. Enzim bereaksi pada kondisi lunak.

Di samping itu, ada beberapa kelemahan yang perlu diperhatikan oleh pemakai biokatalis, antara lain :

- a. enzim membutuhkan parameter operasi yang sempit. Perubahan temperatur dan pH hanya dapat dilakukan pada kisaran yang sempit, karena kenaikan temperatur yang ekstrim dapat menyebabkan deaktivasi protein enzim;
- b. enzim larut dalam air dan memperlihatkan aktivitas katalitik tertinggi di dalam larutan berair, sehingga perlu dicari kondisi reaksi yang tepat untuk senyawa organik yang sukar larut dalam air;
- c. enzim cenderung ke fenomena inhibisi.

2.2. Tinjauan Tentang Biotransformasi

2.2.1. Pengertian Biotransformasi

Biotransformasi telah dikenal sejak zaman Pasteur, tetapi transformasi mikrobial senyawa industri yang penting baru dilakukan pada tahun 1950-an yaitu modifikasi steroid. Sejak saat itu, teknologi penting dikembangkan untuk mengganti beberapa proses kimia klasik dengan transformasi menggunakan biokatalis. Keadaan fisik biokatalis yang digunakan untuk biotransformasi dapat berbeda-beda, antara lain : isolat enzim, enzim murni/ sedikit murni atau mikroorganisme utuh (sel yang sedang tumbuh atau sel istirahat), baik bentuk bebas atau bentuk amobil. Hal ini sangat tergantung pada berbagai faktor, antara lain :

- (i) tipe reaksi
- (ii) ada/ tidaknya kofaktor yang perlu *recycle*
- (iii) Skala biotransformasi yang akan dilakukan

Tabel 2.1. Prospek & Konsekuensi Penggunaan Sistem Isolat Enzim
dan *Whole Cell* (sel utuh) (Faber, 1992)

Sistem	Bentuk	Prospek	Konsekuensi
Isolat Enzim	-	- Alat dan pengerjaan sederhana - Produktivitas lebih baik karena toleransi terhadap konsentrasi tinggi	Perlu re-siklus kofaktor
	Dilarutkan dalam air	Aktivitas enzim tinggi	- ada reaksi samping - substrat lipofilik tak larut - perlu ekstraksi
	Disuspensikan dalam pelarut organik	- pengerjaan mudah - substrat lipofilik larut - <i>recovery</i> enzim mudah	Aktivitas rendah
	Amobil	<i>Recovery</i> enzim mudah	Kehilangan aktivitas selama anobilisasi
Sel Utuh (<i>Whole Cell</i>)	-	- peralatan mahal - membosankan untuk volume besar - produktivitas rendah - toleransi terhadap konsentrasi dan pelarut organik rendah - ada reaksi samping	Tidak perlu re-siklus kofaktor
	Sel yang sedang tumbuh	Aktivitas tinggi	- biomassa banyak - produk samping banyak
	Sel istirahat	- pengerjaan lebih mudah - produk samping lebih sedikit	Aktivitas lebih rendah
	Sel amobil	Memungkinkan penggunaan ulang sel	Aktivitas lebih rendah

Banyak senyawa penting (mulai dari asam amino sampai penicillin) telah dapat disintesis menggunakan *viable whole cells* (sel utuh hidup) dengan sumber karbon murah (misalnya karbohidrat). Sintesis seperti itu memerlukan banyak

tahap reaksi biokimia, yang dikenal sebagai fermentasi, karena merupakan *de novo synthesis* di dalam sistem biologi.

Kebanyakan biotransformasi berawal dari molekul organik yang relatif kompleks, sehingga hanya memerlukan satu (atau beberapa) tahap sintesis biokimiawi dengan menggunakan (tepatnya mempekerjakan) enzim atau mikroba yang potensial untuk mengubah senyawa organik *non-natural* menjadi produk yang dikehendaki (Leon et al., 1998).

2.2.2. Biotransformasi di dalam Medium Organik

Air merupakan medium reaksi yang esensial untuk biokatalisis, baik dengan enzim maupun dengan sel. Hal ini telah diakui sebagai suatu kelebihan dari biokonversi. Namun demikian, penggunaan medium air untuk biokonversi menyebabkan aplikasi biokatalisis dalam sintesis organik menjadi terbatas, karena hampir semua senyawa organik kurang larut dalam medium air. Reaksi samping seperti hidrolisis, rasemisasi, polimerisasi dan dekomposisi sering terjadi dengan adanya air. Fungsi air dalam sistem biologi sering kali kontradiktif. Air sangat diperlukan oleh enzim untuk interaksi non kovalen yang menjaga konformasi aktivitas katalitiknya, tetapi air juga berperan dalam reaksi yang menyebabkan denaturasi. Jadi, dengan mengurangi kandungan air dalam medium reaksi dan menggantinya dengan pelarut organik maka enzim akan dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya. Pelarut non-air (anhydrous) tidak mampu mendukung aktivitas enzimatik, tetapi sedikit air sangat diperlukan untuk proses enzimatik. Banyaknya air yang diperlukan untuk mempertahankan aktivitas enzimatik tergantung pada jenis enzim. Sebagai contohnya, α -khimotripsin hanya

membutuhkan 50 molekul air per molekul enzim untuk mempertahankan aktivitas katalitiknya, jauh lebih sedikit dibandingkan dengan banyaknya molekul air yang diperlukan untuk membentuk lapisan air *monolayer* mengitari enzim. Hal ini berbeda dengan enzim lain seperti subtilisin. Sedangkan polifenol oksidase membutuhkan adanya $\pm 3,5 \cdot 10^7$ molekul air (Faber, 1992).

Biotransformasi dalam media organik telah banyak dikembangkan dan dimanfaatkan dalam sintesis organik, karena banyak senyawa organik yang sukar larut dalam media air, potensial untuk ditransformasikan dengan enzim atau mikroorganisme. Penggunaan pelarut organik *water-immiscible* dalam biokatalisis dengan *whole-cell* (sel utuh) telah dikembangkan untuk biotransformasi senyawa-senyawa toksik dan sedikit larut air. Sistem ini dapat mengatasi problem produktivitas rendah dalam media konvensional karena kelarutan substrat rendah menggabungkan biokonversi dan recovery produk di dalam satu reaktor, serta meningkatkan kesetimbangan kimia yang akan meningkatkan hasil dan selektivitas. Penggunaan *whole cell* pada biokatalisis dalam media organik memungkinkan regenerasi kofaktor dan melakukan biokonversi atau fermentasi yang melibatkan banyak tahapan proses metabolisme. Proses amobilisasi dapat melindungi sel dari toksisitas pelarut organik, sehingga penggunaan pelarut organik akan lebih efektif (Leon et al., 1998).

Transformasi biokatalitik yang dilakukan dalam media organik mempunyai beberapa kelebihan (Cabral, 1997; Faber, 1992), antara lain sebagai berikut.

1. Hasil keseluruhan dari proses yang dilakukan dalam media organik biasanya lebih baik, disebabkan karena pengurangan jumlah tahap reaksi dapat dikurangi.
2. Substrat nonpolar dapat ditransformasi lebih cepat karena penggunaan pelarut organik akan meningkatkan kelarutan reaktan, dengan cara demikian akan meningkatkan produktivitas volumetrik dari sistem reaksi. Keseimbangan reaksi dapat diarahkan ke produk yang dikehendaki karena produk terekstraksi di dalam fasa pelarut organik, sehingga memudahkan *recovery* biokatalis dan produk (biokonversi ekstraktif).
3. Deaktivasi dan atau inhibisi enzim oleh substrat dan atau produk lipofilik dapat diminimalkan karena senyawa lipofilik terlarut dalam medium organik sehingga konsentrasi pada permukaan enzim lebih rendah.
4. Banyak reaksi samping seperti hidrolisis ester, polimerisasi quinon, rasemisasi sianohidrin atau migrasi asil yang tergantung air, dapat ditekan jika reaksi dilakukan dalam medium organik.
5. Amobilisasi enzim sering tidak diperlukan karena setelah reaksi enzim dapat dipisahkan dengan filtrasi sederhana. Namun demikian jika diperlukan secara eksperimen maka dimungkinkan adsorpsi sederhana pada suatu pendukung makroskopik seperti celite, silika atau gelas. Desorpsi dari padatan pendukung ke medium reaksi tidak dapat terjadi dalam lingkungan lipofilik.

6. Enzim lebih stabil di dalam lingkungan rendah kandungan air. Sebagai contohnya, lipase *porcine pancreatic* aktif selama beberapa jam pada 100°C dalam medium organik 99 %, tetapi dengan cepat terdenaturasi pada temperatur tersebut bila di dalam medium air.

Reaksi enzimatik di dalam pelarut organik dapat diklasifikasikan menjadi 3 kategori.

- a. Enzim dilarutkan dalam larutan monofasa air-pelarut organik

Enzim, substrat dan atau produk terlarut dalam larutan monofasa yang mengandung air dan pelarut organik *water-miscible*, misalnya : dimetil sulfoksida, dimetil formamida, tetrahidrofur, dooxane, aseton atau alkohol rendah. Sistem ini digunakan untuk transformasi substrat lipofilik yang sedikit larut dalam sistem berair dan akan beraksi dengan kecepatan rendah. Hampir semua pelarut *water-miscible* dapat digunakan dalam konsentrasi 10% dari volume total.

- b. Enzim dilarutkan dalam larutan bifasa air-pelarut organik

Sistem reaksi mempunyai 2 fasa makroskopik, yaitu fasa air yang mengandung enzim dan fasa kedua adalah pelarut organik nonpolar, seperti hidrokarbon, eter atau hidrokarbon terklorinasi, yang memungkinkan pemisahan biokatalis dari fasa organik. Biokatalis lebih suka dalam lingkungan berair dan tidak kontak langsung dengan pelarut organik, dimana substrat terlarut. Terbatasnya konsentrasi senyawa organik dalam fasa air dapat mencegah fenomena inhibisi. Di dalam sistem bifasa, reaksi enzimatik berjalan di dalam fasa air, transfer massa dari reaktan ke dan produk dari katalis dan antara 2

fasa. Jadi pengocokan dan pengadukan merupakan parameter yang penting sekali.

c. Enzim disuspensikan dalam pelarut organik monofasa

Medium reaksi dengan kandungan pelarut organik > 98% menyebabkan padatan enzim tersuspensi di dalam larutan monofasa organik. Walaupun biokatalis dalam keadaan kering, tetapi harus ada air yang mengelilinginya untuk mempertahankan aktivitas katalitiknya.

Satu aspek yang paling penting adalah pengaruh pH medium. Di dalam larutan organik yang kekurangan fasa air, pH medium tidak dapat diukur dengan mudah. Di lain pihak, keadaan ionisasi enzim merupakan fungsi pH, menentukan konformasinya sehingga mempengaruhi aktivitas dan selektivitasnya. Karena keadaan ionisasi dari muatan gugus protein tidak berubah bila ditempatkan dalam pelarut organik maka sebaiknya menggunakan enzim padat yang diperoleh dengan cara liofilisasi atau presipitasi dari larutan bufer pada pH optimumnya.

Keadaan fisik enzim yang digunakan sebagai biokatalis dapat berupa kristal, liofil atau endapan. Adsorpsi enzim pada permukaan makroskopik menyebabkan distribusi biokatalis lebih baik dan akan meningkatkan kecepatan reaksi. Beberapa materi anorganik seperti celite, silika gel atau padatan organik non-ionik dapat digunakan sebagai padatan pendukung.

Sebagai pengganti pelarut organik lipofilik, gas superkritis seperti karbon dioksida superkritis (*supercritical carbon dioxide* : SCCD) memperlihatkan sifat-sifat kelarutan yang mirip dengan heksana sehingga dapat digunakan sebagai

solven atau *co-solven* untuk transformasi enzimatik senyawa organik lipofilik. Penggunaan medium gas superkritis tidak terbatas pada klas enzim tertentu, tetapi enzim hidrolase yang paling dominan, misalnya untuk mengkatalis reaksi esterifikasi, transesterifikasi, alkoholisis, hidrolisis, hidroksilasi dan dehidrogenasi. Penggunaan gas superkritis mempunyai beberapa kelebihan antara lain : toksisitas rendah, mudah dihilangkan dan viskositasnya rendah (Faber, 1992; Vija et al., 1997).

Di dalam media organik, ada dua parameter yang tidak dijumpai di dalam larutan air yaitu jenis pelarut dan kandungan air. Telah diketahui sejak awal bahwa banyaknya air yang ada sangat penting untuk stabilitas termal dan aktivitas enzim di dalam media non-air (Ducret et al., 1998).

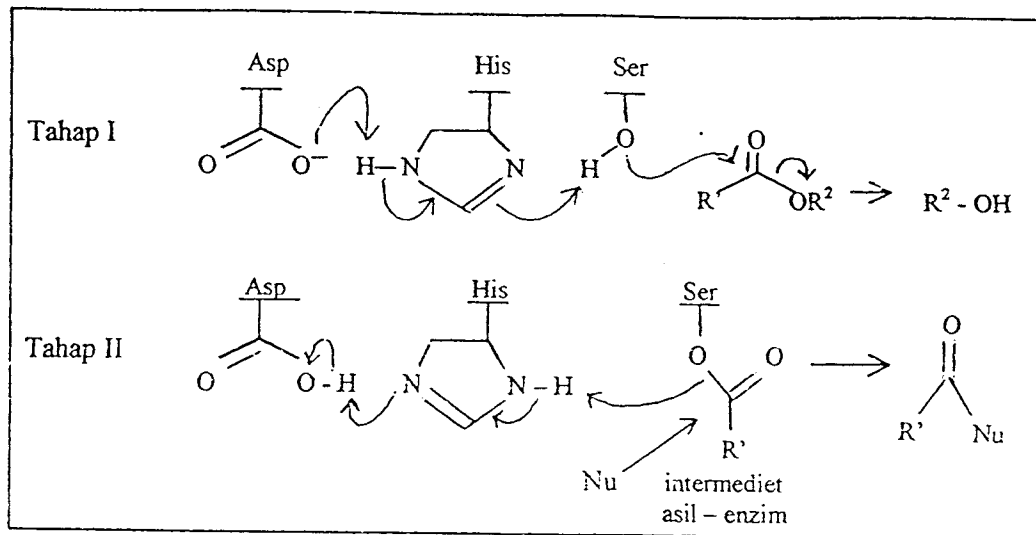
2.3. Tinjauan Tentang Lipase

Lipase (triasilgliserol hidrolase, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang mampu menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Lipase dapat dikategorikan berdasarkan spesifitasnya dalam memecah minyak/ lemak. Lipase nonspesifik memecah molekul asilgliserol pada posisi random, menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol dengan mono- dan diasil gliserol sebagai intermediet. Produknya mirip dengan produk yang dihasilkan dari reaksi dengan katalis kimia, hanya saja pada biokatalisis, degradasi dapat terjadi pada temperatur yang lebih rendah. Sedangkan lipase spesifik-1,3 mengkatalis pelepasan asam lemak pada posisi 1 dan 3 dari molekul gliserol. Dengan lipase-spesifik asam lemak, hanya tipe asam lemak tertentu yang akan dibebaskan dari molekul asilgliserol (Faber, 1992).

Lipase dari beberapa mikroba dan pankreas kuda & sapi serta pankreas manusia telah diketahui strukturnya. Berat molekul dari enzim-enzim tersebut berkisar antara 20.000 – 60.000. Mirip dengan serin hidrolase, enzim-enzim tersebut bersama-sama dengan residu nukleofilik – histidin - asam menyebabkan *catalytic triad* (tiga serangkai katalitik), yang diwujudkan sebagai Ser-His-Asp *triad* atau Ser-His-Glu *triad* (Faber, 1992; Yahya et al., 1998).

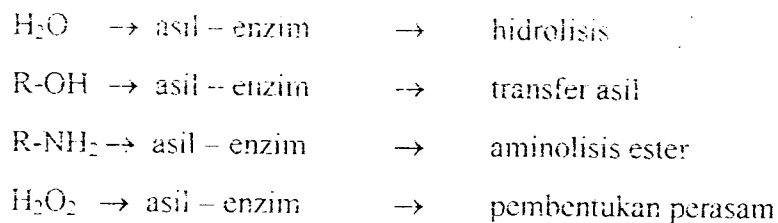
Mekanisme enzim-enzim penghidrolisis amida dan ester mirip dengan yang digambarkan oleh hidrolisis kimia dengan basa. Suatu gugus nukleofilik dari sisi aktif enzim menyerang gugus karbonil dari substrat ester atau amida. Nukleofil yang bertindak sebagai “*chemical operator*” dapat berupa gugus hidroksi dari residu serin, gugus karboksil dari residu aspartat atau gugus thiol dari residu sistein. Mekanisme hidrolisis oleh lipase yang telah dieludaskan dengan detail adalah mekanisme dari serin hidrolase, yang pada sisi aktifnya terdapat residu serin dan dua gugus lain (yaitu residu aspartat dan histidin) yang terdapat bersama-sama residu serin tersebut. membentuk *catalytic triad*. Pengaturan tertentu dari ketiga gugus ini menyebabkan penurunan harga pK dari gugus OH serin yang menyebabkan serangan nukleofilik pada gugus karbonil dari substrat. Akibatnya gugus asil dari substrat berikatan secara kovalen dengan enzim membentuk intermediet asil-enzim dengan membebaskan R^2OH . Kemudian suatu nukleofil lain misalnya air akan menyerang intermediet asil-enzim dan membebaskan enzim dan asam karboksilat. Bila enzim dioperasikan di dalam lingkungan dengan kandungan air rendah, maka nukleofil lain (misalnya : $R-OH$, $R-NH_2$, H_2O_2) dapat bersaing dengan air untuk bereaksi dengan

intermediet asil-enzim menghasilkan sejumlah transformasi yang berguna yaitu :
transfer asil, aminolisis ester dan pembentukan perasam (Faber, 1992).



Nu (nukleofil) : H_2O , R-OH , R-NH_2 , H_2O_2

Transformasi yang mungkin terjadi antara nukleofil dan intermediet asil-enzim :



Gambar 2.1. Mekanisme Hidrolisis Serin Hidrolase (Faber, 1992)

Awal penelitian tentang lipase mikrobial difokuskan pada pencegahan pembusukan makanan, kemudian dikembangkan untuk mendapatkan lipase industri yang lebih stabil dan murah. Hampir semua lipase yang digunakan dalam industri obat, makanan dan detergen merupakan lipase mikrobial, karena banyak tersedia secara komersial dan harganya relatif murah. Penggunaan enzim lipase

sebagai katalis khiral pada berbagai reaksi sintesis berbagai senyawa aktif biologis yang penting juga mengalami peningkatan (Hou and Johnson, 1992).

Terlepas dari arti biologisnya, lipase memainkan peran penting dalam bioteknologi. Sebanyak 15 % dari biotransformasi yang dilaporkan, dilakukan dengan biokatalis lipase. Selama dekade terakhir, lipase menjadi enzim yang sangat menarik bagi industri kimia dan farmasi, karena aktivitasnya sebagai biokatalis pada reaksi hidrolisis dan sintesis ester. Walaupun lipase mengkatalis reaksi hidrolisis trigliserida atau asil dan aril ester di dalam sistem air, lipase juga mengkatalis reaksi organik di dalam media non-air. Lipase mengkatalis hidrolisis dan sintesis trigliserida dengan spesifitas posisi dan asam lemak. Okumura et al. (1979) melaporkan bahwa lipase *Aspergillus niger* dan *Rhizopus delemar* menghidrolisis dan membentuk ikatan ester pada posisi 1 dan 3 dari gliserol. Sedangkan lipase dari *Geotrichum candidum* dan *Penicillium cyclopium* menghidrolisis dan membentuk ikatan ester pada ketiga posisi. Lipase beraksi pada *interface* (antar muka) antara daerah hidrofobik dan daerah hidrofilik, sifat khas yang membedakan lipase dari esterase. Namun demikian, lipase juga berfungsi sebagai esterase. Sebagai contohnya, Tsujisaka et al. (1977) melaporkan bahwa *A. niger* mensintesis gliserida dari asam DL-maleat, asam suksinat dan asam-asam aromatik seperti asam benzoat dan asam fenil asetat. Sebaliknya lipase *C. candidum* dan *P. cyclopium* hanya mensintesis gliserida dari asam lemak rantai panjang. Sedangkan lipase dari *A. niger* dan *R. delemar* mensintesis ester oleil alkohol dari berbagai asam lemak dan beberapa asam dibasa. (Hou & Johnson, 1992).

Kelebihan lipase yang lain adalah kestabilannya yang tinggi di dalam pelarut organik dan temperatur tinggi. Lipase juga mempunyai kemampuan mengkatalis reaksi dengan substrat yang berbeda dan substrat sintetis serta reaksi stereoselektif (Marek & Bednarski, 1996).

Aktivitas hidrolitik dari lipase telah dilaporkan berhubungan secara langsung dengan aktivitas sintetiknya. Walaupun lipase dari sumber yang berbeda dapat mengkatalis reaksi yang sama, mungkin berbeda aktivitasnya di bawah kondisi reaksi yang sama.

Lipase telah digunakan secara sukses pada hidrolisis trigliserida untuk produksi asam lemak bebas. Bagaimanapun, dalam lingkungan rendah air, reaksi esterifikasi dan transesterifikasi juga dapat berlangsung. Lipase merupakan biokatalis yang efektif bila beraksi pada *interface* (antar muka) antara substrat tak larut (trigliserida) dan fasa air di mana enzim terlarut. Hal ini menyebabkan lipase sangat cocok untuk aplikasi biokonversi di dalam media non-konvensional (Cabral et al., 1997).

Ketertarikan penggunaan biokatalisis dalam sintesis organik meningkat dengan cepat. Dalam hal ini, lipase merupakan kelompok enzim yang paling banyak dipelajari. Lipase telah digunakan dalam modifikasi lemak/ minyak melalui reaksi transesterifikasi, untuk menemukan senyawa-senyawa baru dengan sifat-sifat yang lebih baik dan untuk meningkatkan bahan baku murah menjadi produk-produk yang lebih berharga. Linko et al. (1998) telah melaporkan bahwa lipase dapat digunakan sebagai biokatalis di dalam produksi senyawa-senyawa *biodegradable* yang bermanfaat, antara lain : esterifikasi langsung antara butanol dan asam oleat untuk produksi 1-butil oleat, transesterifikasi asam-asam lemak

dari rapeseed oil yang menghasilkan campuran 2-etil-1-heksil ester. Penemuan bahwa lipase juga dapat mengkatalis sintesis ester, membuka peluang untuk produksi poliester *biodegradable* secara enzimatik. Poliesterifikasi 1,4-butanadiol dan sebacic acid menghasilkan poliester dengan massa > 56000 g/ mol, dan poliester dengan massa 130000 g/ mol diperoleh bila menggunakan lipase dari *Rhizomucor miehei* sebagai biokatalis. Poliester aromatik poli (1,6-heksanadiil isoftalat) dengan massa > 50000 g/ mol dapat diperoleh dari poliesterifikasi dengan biokatalis lipase (Linko et al., 1998).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

- a. Menentukan kondisi reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase di dalam medium organik hidrofobik.
- b. Mempelajari selektivitas lipase dari *Candida rugosa* pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat.
- c. Mengetahui apakah mono-oleil gliserol dapat dihasilkan pada kondisi reaksi tersebut.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang aktivitas lipase dari *Candida rugosa* sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi di dalam medium pelarut organik.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.1.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga

4.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan antara bulan September – Desember 2001

4.2. Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

a. Enzim lipase

Enzim lipase yang digunakan pada penelitian ini merupakan enzim lipase dari *Candida rugosa* komersial yang diproduksi oleh *Sigma*, mempunyai aktivitas lipolitik sebesar 724 Unit/ mggram serbuk.

Di mana : 1 Unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghidrolisis 1,0 mikroekivalen asam lemak dari substrat minyak zaitun dalam waktu 1 jam pada temperatur 37⁰ C dan pH 7,2.

b. Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini semuanya berkualitas *pro-analysis*, antara lain :

Gliserol, asam oleat, silika gel, n-heksana, sikloheksana, metanol, khloroform, lempeng silika gel dan iodium.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas yang lazim digunakan di dalam laboratorium Kimia Organik, *hot plate/magnetic stirer* dan seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT). Sedangkan analisis produk reaksi dilakukan dengan spektrofotometer GC/MS Shimadzu QP 5050 di Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) Bandung.

4.3. Variabel penelitian

1. Variabel bebas : waktu reaksi, konsentrasi gliserol, jenis pelarut organik
2. Variabel terikat : produk reaksi yang terbentuk

4.4. Prosedur Kerja

4.3.1 Adsorpsi substrat gliserol pada silika gel

Gliserol yang akan digunakan sebagai substrat pada reaksi esterifikasi terlebih dahulu diadsorpsikan pada silika gel dengan cara mencampur gliserol dan silika gel dengan perbandingan 1 : 1 (b/b), sehingga diperoleh serbuk gliserol-silika gel yang homogen.

4.3.2 Penentuan kondisi reaksi esterifikasi asam oleat dan gliserol dengan biokatalis lipase dari *Candida rugosa*

Untuk mengetahui kondisi reaksi esterifikasi antara asam oleat dan gliserol maka pada penelitian ini dilakukan variasi : waktu reaksi, jenis pelarut organik dan konsentrasi gliserol.

1. Penentuan waktu reaksi

Sebanyak 4 gram substrat gliserol-silika gel dan 1,0 gram enzim lipase dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml yang berisi 30 mM (423 mg) asam oleat dalam 50 mL n-heksana. Kemudian campuran diinkubasi di atas penangas air 40⁰ C sambil daduk dengan *magnetic stirrer* sampai terbentuk produk reaksi. Untuk mengetahui waktu berlangsungnya proses esterifikasi gliserol dan asam oleat, setiap interval waktu 30 menit dilakukan pengambilan sampel produk, dengan cara mengambil 2 mL medium reaksi. Produk esterifikasi yang terlarut di dalam medium reaksi, selanjutnya diuji dengan metode KLT pada lempeng silika gel menggunakan fasa gerak campuran metanol - khloroform (1 : 1 v/v), dengan pembanding substrat asam oleat. Noda yang terbentuk pada lempeng silika gel diperjelas dengan uap I₂.

2. Variasi konsentrasi gliserol dan jenis pelarut

Untuk mengetahui perbandingan substrat gliserol terhadap asam oleat dan jenis pelarut organik yang cocok sebagai medium reaksi

esterifikasi gliserol dan asam oleat, pada penelitian ini, konsentrasi asam oleat dan jumlah enzim dibuat tetap. Asam oleat 30 mM (84,6 mg) dalam 10 mL pelarut organik, sedangkan substrat gliserol dibuat berlebihan dengan variasi : 300, 400, 500, 600, 700, 800 dan 900 mg. Reaksi dilakukan di dalam medium pelarut organik : n-heksana atau sikloheksana dengan cara sebagai berikut :

a. Reaksi esterifikasi di dalam medium n-heksana

Disiapkan 7 buah labu Erlenmeyer 50 mL yang masing-masing diisi dengan 30 mM (84,6 mg) asam oleat dalam 10 mL n-heksana dan 0,2 gram enzim lipase. Ke dalam setiap labu Erlenmeyer tersebut berturut-turut dimasukkan : 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 dan 1,8 gram substrat gliserol-silika gel. Selanjutnya campuran reaksi di dalam masing-masing labu Erlenmeyer tersebut diinkubasi di atas penangas air 40^o C sambil diaduk dengan pengaduk magnet selama 3 jam. Pada akhir reaksi medium organik dipisahkan dari campuran reaksi dan diuapkan, kemudian produk ester yang terbentuk dideteksi dengan metode KLT menggunakan fasa gerak campuran metanol - kloroform (1 : 1 v/v). Noda yang terbentuk pada lempeng silika gel diperjelas dengan uap I₂.



b. Reaksi Esterifikasi di dalam medium sikloheksana

Reaksi ini dilakukan dengan prosedur yang sama dengan prosedur (a) reaksi esterifikasi di dalam medium n-heksana, hanya saja pelarut n-heksana diganti dengan sikloheksana.

4.3.3 Uji selektivitas lipase dari *Candida rugosa* sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat

Untuk uji selektivitas lipase digunakan produk reaksi yang diperoleh dari prosedur 4.3.2 (1). Medium organik yang mengandung produk ester dipisahkan dari campuran reaksi, kemudian diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh produk ester. Selanjutnya produk ester yang diperoleh dianalisis dengan GC/ MS untuk mengetahui banyaknya produk reaksi yang terbentuk dan mengetahui selektivitas lipase dari *Candida rugosa* sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat.

4.3.4 Analisis Data

Dari uji KLT dengan fasa gerak campuran kloroform-metanol (1 : 1 v/v) dapat diketahui berlangsungnya proses esterifikasi dengan cara mengamati terbentuknya noda produk reaksi dan dibandingkan dengan R_f substrat asam oleat. Dari data yang diperoleh kemudian dibuat tabel sebagai berikut :

Jenis Pelarut	gliserol-silika gel (1 : 1 b/b)							Waktu reaksi					
	(gram)							(jam)					
	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	0,5	1	1,5	2	2,5	3
n-heksana													
Sikloheksana													

Dari hasil analisis dengan GC/ MS dapat diketahui banyaknya senyawa di dalam campuran produk reaksi dan dengan cara membandingkan spektrum massa produk reaksi dengan spektrum massa pada pustaka maka dapat diketahui produk ester yang terbentuk, sehingga dapat diketahui selektivitas lipase *Candida rugosa* pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat di bawah kondisi percobaan

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

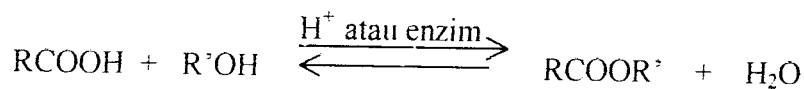
5.1. Penentuan Kondisi Reaksi Esterifikasi Gliserol dan Asam Oleat dengan Biokatalis Lipase dari *Candida rugosa*

Enzim lipase komersial diperdagangkan berdasarkan aktivitas hidrolitiknya terhadap substrat alaminya dan tidak dijamin tentang aktivitas esterifikasinya. Namun demikian, dari hasil penelitian terhadap beberapa jenis lipase menunjukkan adanya hubungan antara aktivitas hidrolitik dan sintesis ester. Walaupun mempunyai aktivitas hidrolisis yang mirip tetapi aktivitas esterifikasinya mungkin sangat bervariasi. Oleh karena itu pada penelitian ini perlu dipelajari kondisi reaksi berlangsungnya reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase dari *Candida rugosa*.

Pada umumnya reaksi enzimatik berlangsung/ dilakukan di dalam medium air, sehingga aplikasi di dalam sintesis organik menjadi terbatas karena kebanyakan senyawa organik sedikit/ tidak larut dalam air. Penggunaan pelarut organik sebagai media reaksi di dalam reaksi biokatalisis mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan di dalam media konvensional antara lain : kelarutan reaktan lipofilik lebih besar dan *recovery* produk reaksi lebih mudah karena produk reaksi terekstraksi di dalam medium organik (disebut *extractive bioconversion*).

Seperti telah diketahui bahwa air merupakan komponen esensial untuk aktivitas katalitik suatu enzim di dalam media organik, tetapi pada reaksi esterifikasi air yang berlebihan dapat menyebabkan reaksi hidrolisis sehingga reaksi berlangsung ke arah berlawanan. Di lain pihak, pada reaksi esterifikasi senantiasa dihasilkan air. Oleh karena itu, kontrol kandungan air dalam sistem reaksi sangat diperlukan untuk optimasi reaksi esterifikasi.

Persamaan reaksi esterifikasi secara umum dapat dituliskan sebagai berikut :



Reaksi esterifikasi asam lemak dan poliol dapat dilakukan di dalam pelarut hidrofobik seperti heksana. Namun demikian, senyawa poliol yang hidrofilik tidak dapat bercampur (*immiscible*) di dalam pelarut hidrofobik seperti itu, sehingga kecepatan esterifikasi rendah. Untuk meningkatkan selektivitas esterifikasi poliol, beberapa metode dapat diterapkan seperti : penggunaan berbagai lipase atau pelarut organik yang berbeda serta variasi perbandingan reaktan.

Pada penelitian ini, digunakan silika gel sebagai padatan pendukung dalam reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat. Proses ini melibatkan reaksi antara substrat polar, yaitu gliserol dan substrat hidrofobik, yaitu asam oleat. Pada penelitian ini, gliserol diadsorpsikan pada padatan pendukung hidrofilik (yaitu silika gel), sedangkan asam oleat dilarutkan dalam pelarut non polar. Dalam hal ini silika gel bertindak sebagai suatu “*reservoir*” untuk gliserol. Silika gel mempunyai sifat *water-sorption*, sehingga adanya silika gel di dalam sistem

reaksi diharapkan juga dapat mengurangi kandungan air dalam sistem reaksi. Dengan demikian akan meningkatkan kesetimbangan reaksi dan % konversi substrat menjadi produk.

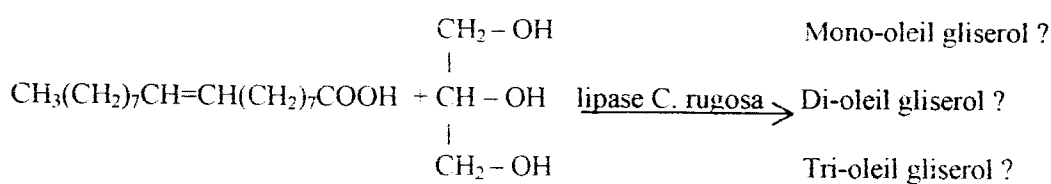
Kim & Lee (1996) mengemukakan bahwa proses reaksi esterifikasi di dalam medium organik berlangsung lebih lambat dibandingkan dengan proses resolusi hidrolitik dari rasemat asam 2-arilpropionat. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penambahan padatan pendukung ke dalam medium reaksi dapat meningkatkan kecepatan reaksi dan hasil ester pada reaksi esterifikasi ibuprofen dengan biokatalis lipase dari *Candida cylindracea* di dalam medium organik. Silika gel dan Eupergit C yang ditambahkan ke dalam medium reaksi secara efektif dapat meningkatkan efisiensi katalitik enzim, karena dapat mengefektifkan dispersi serbuk enzim di dalam medium organik.

Lipase *Candida rugosa* yang digunakan pada penelitian ini merupakan lipase komersial yang diperdagangkan oleh *Sigma* sebagai enzim hidrolase yang mempunyai aktivitas lipolitik sebesar 724 Unit/ mg serbuk. Di mana 1 Unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghidrolisis 1,0 mikroekuivalen asam lemak dari substrat minyak zaitun dalam waktu 1 jam pada temperatur 37⁰ C dan pH 7,2. Oleh karena itu, belum diketahui aktivitasnya dalam reaksi esterifikasi.

Untuk mengetahui apakah enzim tersebut mempunyai aktivitas sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat, maka pada penelitian ini dipelajari kondisi reaksi yang diperlukan untuk berlangsungnya reaksi esterifikasi. Untuk mengetahui kondisi reaksi esterifikasi, analisis produk reaksi dilakukan secara kualitatif dengan metode KLT.

Campuran reaksi terdiri dari : substrat gliserol yang telah diadsorpsikan pada silika gel, serbuk enzim lipase, asam oleat yang telah dilarutkan dalam n-heksana. Dalam hal ini n-heksana sekaligus berfungsi sebagai medium reaksi. Adanya silika gel di dalam medium menyebabkan gliserol dan serbuk enzim dapat terdispersi di dalam medium hidrofobik, sehingga diharapkan meningkatnya efisiensi aktivitas enzim. Terbentuknya air selama esterifikasi juga dapat diamati, serbuk enzim melekat pada substrat gliserol-silika gel, kemudian menempel pada labu Erlenmeyer sehingga tidak dapat terdispersi lagi di dalam medium. Dalam sistem reaksi ini terjadi biokonversi ekstraktif, produk reaksi terlarut di dalam medium dan mudah dipisahkan dari komponen lainnya. Selanjutnya, produk ester yang mungkin terbentuk yang terlarut di dalam n-heksana dapat dianalisis dengan metode KLT dan GC/ MS.

Persamaan reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dapat dituliskan sebagai berikut :



Hasil uji dengan KLT menunjukkan bahwa reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase *Candida rugosa* dapat berlangsung setelah inkubasi pada temperatur 40⁰ C selama 3 jam. Hal ini ditunjukkan adanya noda senyawa pada lempeng silika gel, yang berbeda Rf nya dengan noda dari senyawa standar, asam oleat.

Pada lempeng silika gel, asam oleat memperlihatkan 1 (satu) noda dengan $R_f = 0,7$. Adanya 1 (satu) noda yang sangat jelas pada lempeng silika gel dengan $R_f = 0,58$ menunjukkan adanya 1 (satu) senyawa yang dominan di dalam campuran produk reaksi. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase dari *Candida rugosa* di dalam medium n-heksana, menghasilkan 1 (satu) produk ester yang dominan.

Kim & Lee (1996) mengemukakan bahwa hidrofobisitas dari pelarut organik berpengaruh pada kecepatan awal reaksi esterifikasi rasemat ibuprofen dengan biokatalis lipase *C. cylindracea*. Stereoselektivitas lipase lebih baik dapat diperoleh bila reaksi dilakukan di dalam pelarut organik dari pada di dalam air.

Gliserol mempunyai 3 gugus fungsi OH yang memungkinkan terjadinya reaksi esterifikasi dengan asam oleat. Oleh karena itu, untuk mendapatkan mono-oleil gliserol maka konsentrasi gliserol harus dibuat berlebih, yang pada percobaan ini konsentrasi gliserol divariasi : 300, 400, 500, 600, 700, 800 dan 900 mg/ml per 10 mL medium organik.. Sedangkan untuk mengetahui jenis pelarut organik yang sesuai dengan kelarutan mono-oleil gliserol maka pada penelitian ini digunakan 2 (dua) jenis pelarut organik sebagai medium, yaitu n-heksana dan sikloheksana. Hidrofobisitas n-heksana lebih besar dibandingkan dengan sikloheksana. Reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dilakukan di dalam medium n-heksana atau sikloheksana dengan konsentrasi gliserol divariasi. Hasil uji dengan metode KLT menunjukkan bahwa proses esterifikasi pada berbagai konsentrasi gliserol, baik di dalam medium n-heksana ataupun sikloheksana, menghasilkan 1 (satu) produk ester yang dominan dengan $R_f = 0,58$.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa jenis ester yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh konsentrasi substrat gliserol antara 300 – 900 mg/ml dalam 10 mL medium organik (baik n-heksana ataupun sikloheksana) dengan konsentrasi substrat asam oleat 30 mM dan 0,2 gram enzim lipase. Berhubung pada penelitian ini tidak dilakukan analisis kuantitatif maka tidak dapat dikatakan apakah kondisi tersebut berpengaruh terhadap % produk ester yang dihasilkan.

5.2. Uji Selektivitas Lipase dari *Candida rugosa* pada Reaksi Esterifikasi Gliserol dan Asam Oleat

Lipase merupakan enzim yang mempunyai kemampuan hidrolisis dan sintesis trigliserida dengan spesifisitas posisi dan asam lemak. Lipase dari *Aspergillus niger* dan *Rhizopus delemar* menghidrolisis dan membentuk ikatan ester hanya pada posisi 1 dan 3 dari gliserol, sedangkan lipase dari *Geotrichum candidum* dan *Penicillium cyclopium* menghidrolisis dan membentuk ikatan ester pada ketiga posisi (Hou & Johnston, 1992). Spesifisitas lipase terhadap asam lemak juga telah dilaporkan, lipase *Mucor miehei* mempunyai spesifisitas untuk produksi di-palmitoil gliserol sedangkan lipase *Rhizopus delemar* mampu mengkatalis sintesis mono-palmitoil gliserol (Kwon, 1995).

Analisis produk ester yang dihasilkan selama proses esterifikasi gliserol dan asam oleat dilakukan dengan GC/ MS. Pada Kromatogram GC (Lampiran 1) terlihat adanya beberapa puncak yang menunjukkan bahwa di dalam medium reaksi esterifikasi terkandung beberapa senyawa, yang merupakan produk reaksi esterifikasi dan pengotor. Alat GC/ MS dapat mendeteksi adanya 11 senyawa di dalam campuran produk reaksi. Waktu retensi dan luas puncak dari 11 senyawa

tersebut tercantum pada Tabel 5.1. Pada kromatogram tersebut dapat dilihat adanya 1 (satu) senyawa yang memberikan puncak terluas yaitu senyawa-9 dengan waktu retensi 25,026 menit.

Berdasarkan data spektrum massa untuk 11 senyawa yang terdeteksi, dan dibandingkan dengan spektrum massa pada pustaka (1) WILEY229.LIB (2) NIST62.LIB dan (3) PESTICD.LIB dapat diperkirakan senyawa-senyawa yang mungkin terkandung di dalam campuran produk reaksi. Data selengkapnya tercantum pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Perkiraan Senyawa Produk Esterifikasi

Puncak ke-	Waktu retensi (menit)	Luas puncak	%	Perkiraan senyawa
1	8,160	31311	1,10	Oktanal
2	10,549	52014	1,83	Nonanal
3	13,576	42905	1,51	1-Nonanol, 1-dodekanol, 1-undekanol
4	17,429	73794	2,59	Cinerin II, Jasmolin II
5	19,877	77205	2,71	Ergosta-4,6,22-trien-3-alpha-ol
6	20,683	110930	3,90	Asam miristat, asam stearat
7	22,818	59383	2,09	Asam 9-heksadekanoat, siklododekana
8	23,045	254374	8,94	Asam palmitat, asam stearat
9	25,026	1971588	69,33	Di-(9-oktadekenoil)-gliserol
10	25,217	141815	4,99	Asam 9-oktadekenoat, asam oleat
11	26,987	28626	1,01	1-heptadekanol, 1-dodekanol, tridekanol

Dari data pada Tabel 5.1 dapat dikatakan hanya senyawa-9 dan senyawa-10 yang berhubungan dengan reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat. Senyawa-9 : di-(9-oktadekenoil)-gliserol atau di-oleil gliserol, merupakan produk ester sedangkan senyawa-10 adalah sisa asam oleat yang belum bereaksi.

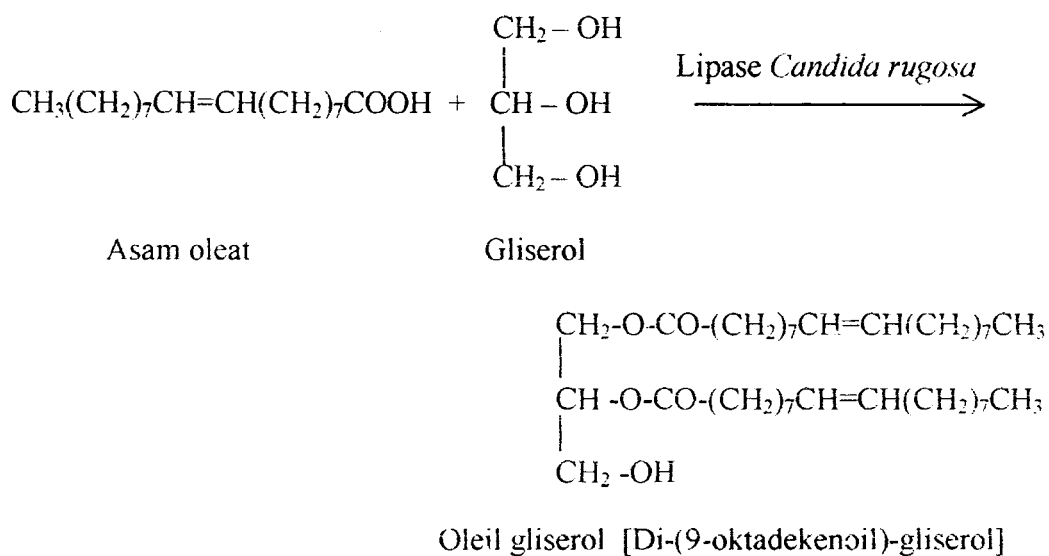
Data spektrum massa senyawa-9 menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai pola fragmentasi sebagai berikut : m/e 41, 55, 69, 83, 97, 111, 125, 138 dan 264 (Lampiran 2 a). Dari data pustaka : WILEY229.LIB didapatkan data pola fragmentasi dari senyawa dengan $(M + 1) = 621$ ($C_{39}H_{72}O_5$) : *di-(9-oktadekenoil) gliserol* atau di-oleil gliserol, yaitu : m/e 41, 55, 69, 83, 98, 111, 125, 151 dan 264 (Lampiran 2 b).

Spektrum massa senyawa-10 memperlihatkan pola fragmentasi sebagai berikut : m/e 41, 55, 69, 83, 97, 111, 129 dan 185 (Lampiran 3 a). Sedangkan dari data pustaka : WILEY229.LIB, didapatkan data pola fragmentasi dari senyawa dengan massa 282 ($C_{39}H_{72}O_5$) : asam 9-oktadekenoat atau asam oleat, yaitu : m/e 43, 55, 73, 83, 97, 111, 129, 143, 157, 171, 185 dan 199 (Lampiran 3 b).

Dari data di atas, dapat disimpulkan bahwa senyawa-9 adalah produk ester dan senyawa-10 adalah sisa substrat asam oleat yang belum terkonversi, sedangkan senyawa-senyawa yang lain kemungkinan merupakan pengotor.

Pada kondisi percobaan, reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase di dalam medium organik hidrofobik (n-heksana/ sikloheksana) menghasilkan di-oleil gliserol, sehingga tidak dapat diperoleh senyawa yang dikehendaki yaitu mono-oleil gliserol. Dengan kata lain, pada kondisi percobaan lipase dari *Candida rugosa* bersifat selektif untuk sintesis di-oleil gliserol.

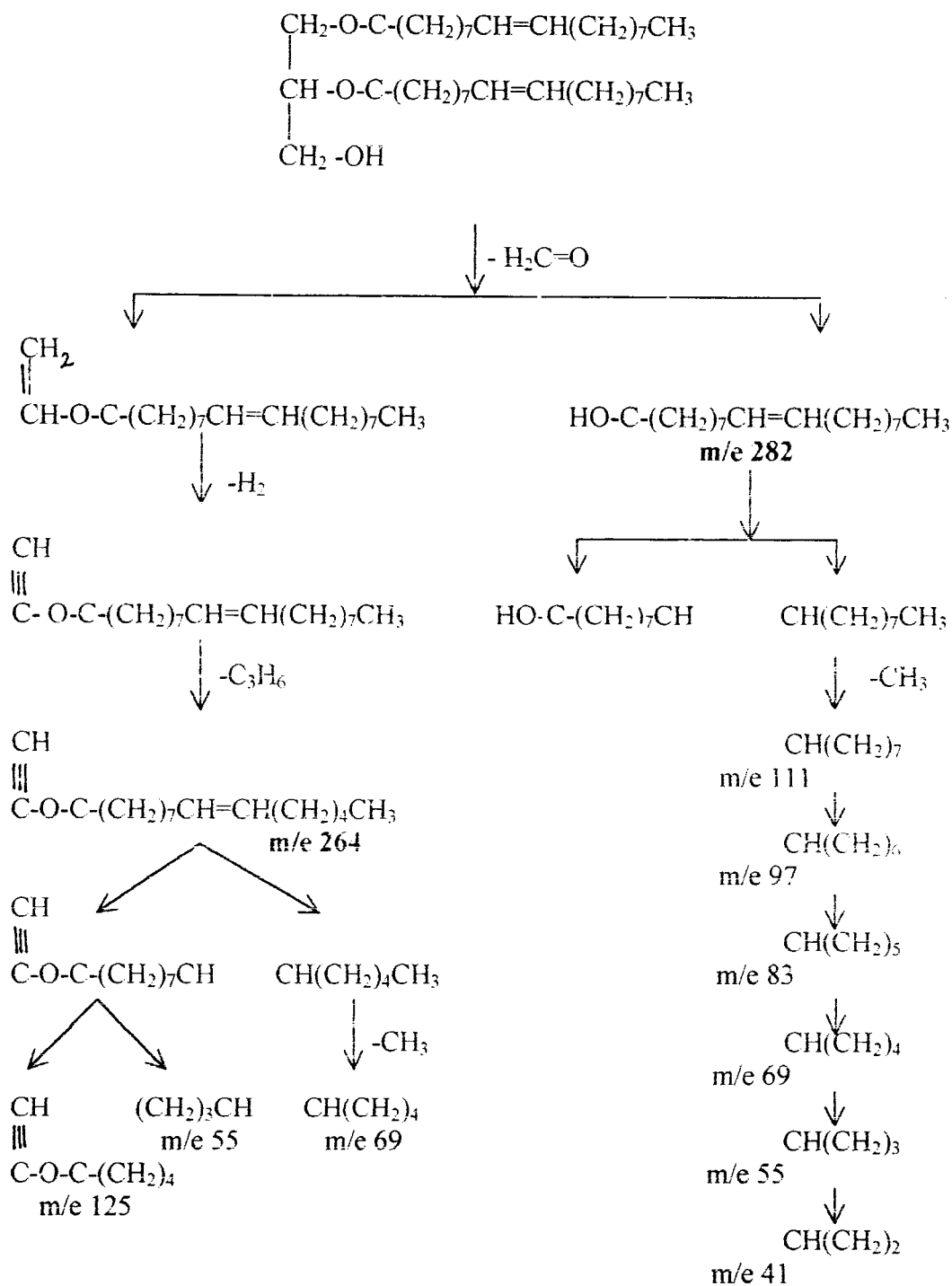
Reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase *Candida rugosa* dapat dituliskan sebagai berikut :



Reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat di dalam medium organik hidrofobik (n-heksana atau sikloheksana) tidak menghasilkan mono-oleil gliserol, kemungkinan disebabkan karena :

- mono-oleil gliserol tidak/ kurang larut di dalam n-heksana atau sikloheksana
- mono-oleil gliserol yang terbentuk teradsorpsi pada silika gel
- Lipase *Candida rugosa* bersifat spesifik pada sintesis di-oleil gliserol

Pola fragmentasi senyawa dengan Mr 620 ($C_{39}H_{72}O_5$) : di-(9-oktadekenoil)-gliserol adalah sebagai berikut :



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

1. Reaksi esterifikasi gliserol dan asam oleat dengan biokatalis lipase

Candida rugosa dapat berlangsung pada kondisi reaksi :

- a. substrat gliserol-silika gel (1 : 1 b/b) 0,6 – 1,8 gram
- b. substrat asam oleat 30 mM dalam 10 mL medium n-heksana atau sikloheksana
- c. enzim lipase 0,2 gram
- d. temperatur 40⁰ C

2. Pada kondisi percobaan, lipase *Candida rugosa* mempunyai spesifisitas terhadap sintesis di-oleil gliserol.
3. Pada kondisi percobaan, tidak dapat diperoleh senyawa yang dikehendaki yaitu mono-oleil gliserol.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh disampaikan saran-saran sebagai berikut.

1. Perlu dilakukan modifikasi medium organik untuk mendapatkan medium dengan kepolaran yang tepat bagi mono-oleil gliserol

2. Perlu dipelajari aktivitas lipase dari sumber lain sebagai biokatalis pada sintesis *emulsifier* mono-oleil gliserol.

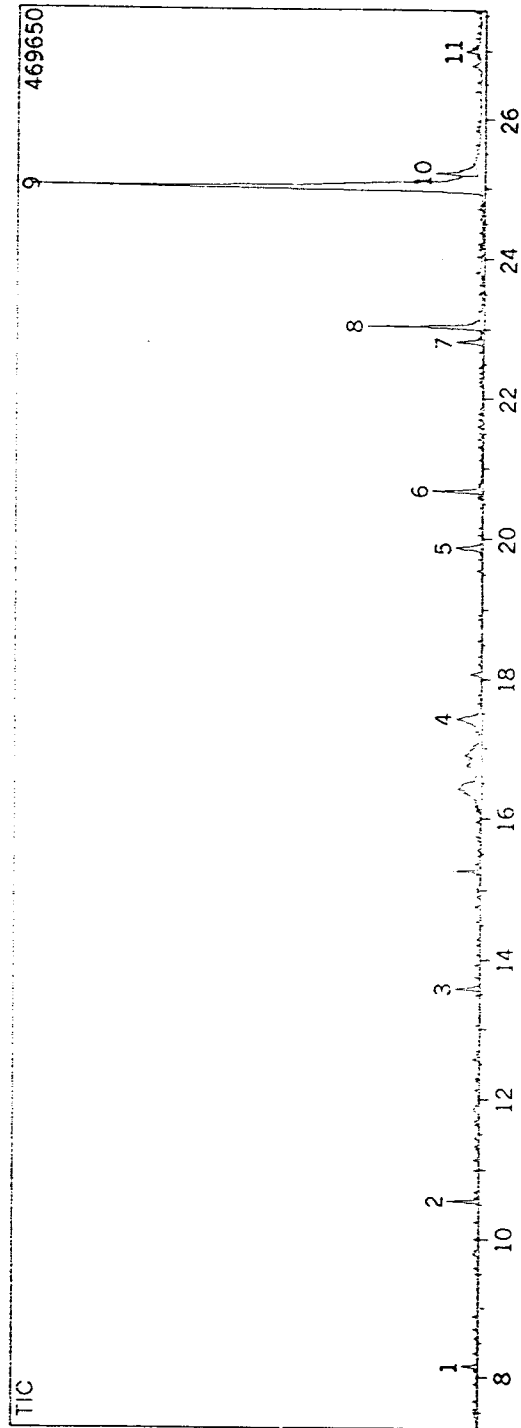
DAFTAR PUSTAKA

- Cabral, J.M.S.; Aries-Barros, M.R.; Pinheiro, H. and Prazeres, D.M.F. (1997) Biotransformation in Organic Media by Enzymes and Whole Cells, *Journal of Biotechnology*, **59**, 133-143.
- Champe, P.C. and Harvey, R.A. (1994) *Biochemistry*, 2nd edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Cunningham, E.B. (1978) *Biochemistry : Mechanism of Metabolism*, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Ducet, A.; Trani, M. and Lortie, R. (1998) Lipase-catalyzed Enantioselective Esterification of Ibuprofen in Organic Solvents under Controlled Water Activity, *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 212-216.
- Faber, K. (1992) *Biotransformation in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin
- Hou, C.T. and Johnston, T.M. (1992) Screening of Lipase Activities with Cultures from the Agricultural Research Service Culture Collection, *JAOCS*, **69**, 1088-1097.
- Kim, M.G. & Lee, S.B. (1996) Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen by Lipase-Catalyzed Esterification Reaction : Effects of Water Content and Solid Supports, *J. of Fermentation and Bioengineering*, **81**, 269-271.
- Leon, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H.M. and Cabral, J.M.S. (1998) Whole-Cell Biocatalysis in Organic Media, *Enzyme and Microbial Tech.*, **23**, 483-500.
- Linko, Y.; Lamsa, M.; Wu, X.; Uosukainen, E.; Seppala, J. and Linko, P. (1998) Biodegradable Products by Lipase Biocatalysis, *J. of Biotechnology*, **66**, 41-50.
- Kwon, S.J. and Rhee, J.S. (1995) Production and insitu Separation of Mono- or Diacylglycerol Catalyzed by Lipases in Hexane, *Enzyme and Microbial Tech.*, **17**, 700 - 705

- Marek, A. and Bednarski, K. (1996) Some Factors Affecting Lipase Production by Yeasts and Filamentous Fungi, *Biotechnology Letter*, **18**, 1155-1160.
- Vija, H.; Telling, A. and Tougu, V. (1997) Lipase-Catalysed Esterification in Supercritical Carbon Dioxide and in Hexane, *Biorganic & Medicinal Chemistry Letter*, **7**, 259-262.
- Yahya, A.R.M.; Anderson, W.A. and Moo-Young, M. (1998) Ester Synthesis in Lipase-catalyzed reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 438-450.

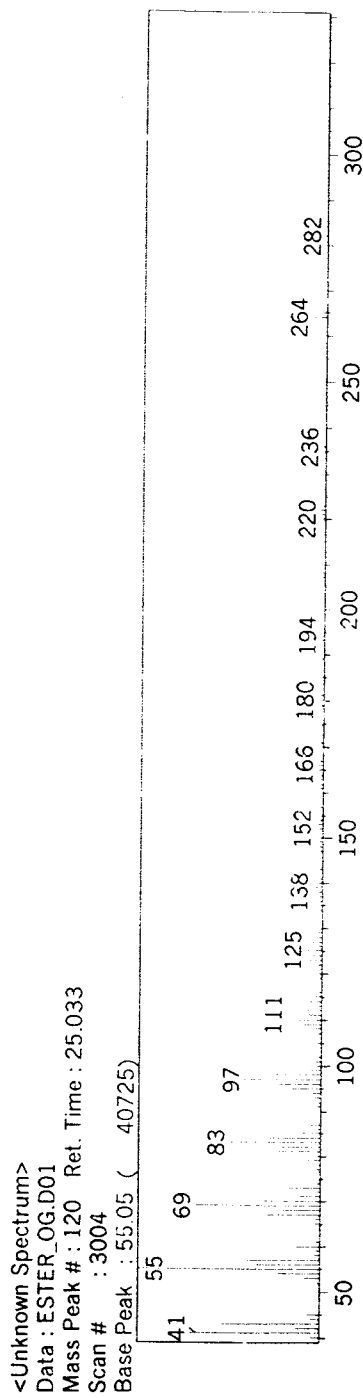
LAMPIRAN

Lampiran 1. Kromatogram produk esterifikasi

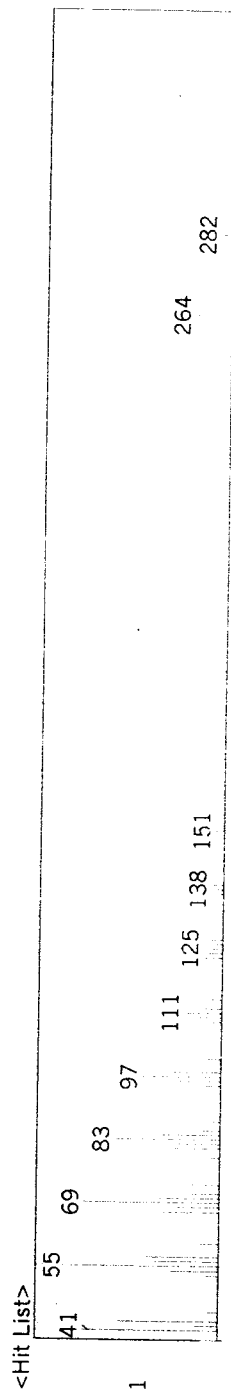


Lampiran 2.

(a) Spektrum massa senyawa-9 produk esterifikasi

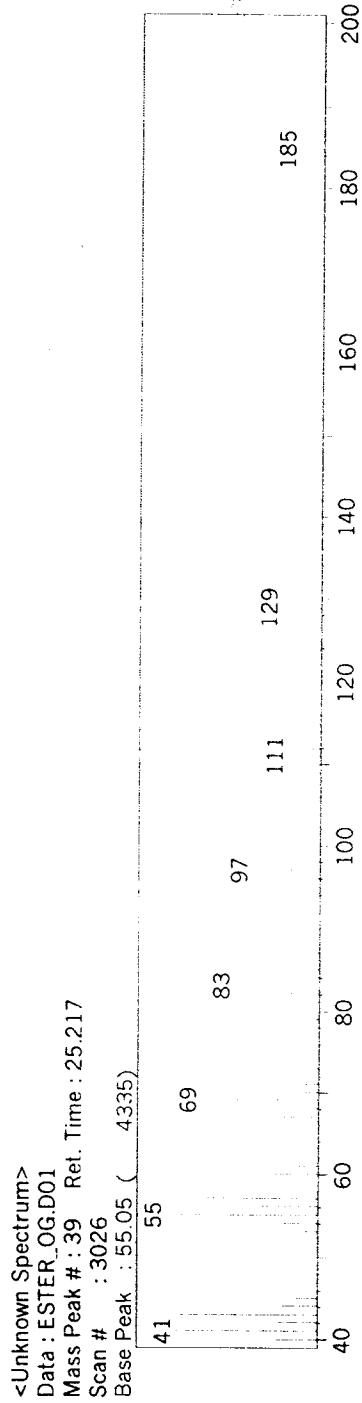


(b) Spektrum massa senyawa di-(9-oktadekenoil)-gliserol



Lampiran 3.

(a) Spektrum massa senyawa-10 produk esterifikasi



(b) Spektrum massa senyawa asam oleat

