

IMOBILISASI LIPASE PADA KITOSAN SERBUK DENGAN METODE PENGIKATAN SILANG DAN UJI AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASINYA

Wikan Mahargyani¹, Tri Joko Raharjo², Winarto Haryadi²

¹Stikes Jenderal Achmad Yani Cimahi

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada

email : wikan.mahargyani@gmail.com

Diterima: 13 April 2017. Disetujui: 19 Juli 2017. Dipublikasikan: 30 Juli 2017

Abstract : Immobilization lipase on chitosan powder by cross linking technique has been carried out. The research was purposed to determine the optimum condition of immobilization process and catalytic activities of immobilized lipase. Glutaraldehyde was used as cross linking agent in immobilization lipase on chitosan powder. Immobilization was performed under the optimum conditions such as solubility pH of lipase, degree of deacetylation, mole ratio of chitosan and glutaraldehyde, and concentration of enzyme. Immobilized and free lipases were assayed their activity, thermal stability, reused ability, and kinetic parameters for transesterification reaction of palm oil with methanol. Result of the study showed that the optimum conditions of immobilization were occurred when lipase was dissolved in buffer phosphate at pH 6, mole ratio of chitosan and glutaraldehyde 4:1, and 5% for concentration of enzyme. The immobilized lipase has lower thermal stability but has better affinity and reused stability than the free lipase.

Key words: lipase, chitosan, immobilization, cross linking, transesterification

Abstrak : Telah dilakukan imobilisasi lipase pada kitosan serbuk dengan metode pengikatan silang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum proses imobilisasi dan aktivitas katalitik lipase terimobilisasi. Enzim lipase diimobilisasikan pada kitosan serbuk menggunakan glutaraldehid sebagai senyawa penaut silang. Parameter yang dipelajari untuk menentukan kondisi optimum imobilisasi meliputi pH pelarutan enzim, nilai derajat deasetilasi, perbandingan mol kitosan dengan glutaraldehid, dan konsentrasi enzim. Enzim lipase terimobilisasi dan enzim lipase bebas diuji aktivitas, stabilitas termal, dan kemampuan penggunaan ulangnya melalui reaksi transesterifikasi minyak kelapa sawit menggunakan metanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum imobilisasi diperoleh saat enzim dilarutkan pada buffer fosfat pH 6, perbandingan mol kitosan dengan glutaraldehid 4:1, dan konsentrasi enzim 5%. Enzim lipase terimobilisasi mempunyai stabilitas termal yang lebih rendah tetapi mempunyai kemampuan penggunaan ulang yang lebih baik daripada enzim lipase bebas.

Kata kunci: lipase, kitosan, imobilisasi, pengikatan silang, transesterifikasi

PENDAHULUAN

Lipase merupakan enzim pencernaan yang mempunyai aktivitas katalitik pada reaksi hidrolisis, alkoholisis, transesterifikasi, dan esterifikasi. Salah satu aktivitas yang menarik untuk dikaji adalah aktivitas transesterase. Reaksi tersebut merupakan reaksi dasar yang digunakan dalam konversi triasilgliserol menjadi ester. Reaksi menggunakan katalis enzim menguntungkan karena kondisi reaksinya yang lunak, pemisahan gliserol dapat dilakukan dengan mudah, dan tidak menghasilkan limbah yang berbahaya. Oleh karena itu, reaksi enzimatik berpotensi untuk diaplikasikan pada proses pembuatan biodiesel (Yücel *et al.*, 2013).

Secara umum enzim hanya larut pada pelarut tertentu dan cenderung sulit dipisahkan di akhir reaksi sehingga kemampuan penggunaan ulangnya terbatas (Krajewska, 2004). Selain itu struktur enzim tidak stabil terhadap perubahan pH dan suhu, sehingga mudah mengalami denaturasi. Tingginya harga enzim juga menjadikan proses enzimatik tidak ekonomis ketika diaplikasikan pada skala yang besar (Tan *et al.*, 2010).

Langkah yang dapat dilakukan untuk mengatasi beberapa kelemahan tersebut adalah dengan mengimobilisasi enzim pada matriks pendukung yang tidak larut

dalam air. Enzim terimobilisasi mampu mempertahankan aktivitas dan dapat digunakan secara berulang maupun proses kontinyu (Jegannathan *et al.*, 2008). Pemilihan padatan pendukung dan metode imobilisasi yang sesuai menjadi hal yang penting dan menarik untuk dikaji lebih lanjut.

Imobilisasi enzim lipase dapat dilakukan dengan teknik pengikatan pada matriks pendukung (*carrier binding*), penjebakan (*entrapping*), dan taut silang (*cross linking*). Metode taut silang memiliki kelebihan dibanding yang lain yaitu ikatan antara enzim dan padatan pendukung stabil, sehingga enzim tidak mudah lepas dan substrat dapat berinteraksi maksimal (Brena *et al.*, 2006). Glutaraldehid merupakan senyawa penaut silang yang banyak digunakan karena preparasi yang mudah dan harganya yang terjangkau. Senyawa ini memiliki dua gugus aldehyd yang dapat membentuk taut silang antara enzim dengan matriks pendukung imobilisasi.

Padatan pendukung yang digunakan dapat berupa material anorganik maupun polimer organik (Tan *et al.*, 2010). Pemilihan padatan pendukung harus memperhatikan gugus fungsional yang berperan dalam ikatan (Cahyaningrum, 2009). Salah satu polimer alam yang sering digunakan adalah kitosan

(Amorim *et al.*, 2003; Chiou *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2009; Orrego *et al.*, 2010; Romdhane *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012, Kuo *et al.*, 2012). Menurut Nasratun (2009) kitosan banyak digunakan sebagai matriks pendukung imobilisasi karena bentuknya dapat dimodifikasi sesuai kebutuhan (serpihan, serbuk, gel, fiber, membran, *beads*), dapat terbiodegradasi dan penanganannya mudah. Selain itu material kitosan bersifat non toksik dan yang terpenting mempunyai afinitas yang baik terhadap protein (Pereira *et al.*, 2003).

Pemanfaatan kitosan sebagai matriks imobilisasi enzim lipase banyak memanfaatkan gugus amina, dimana interaksi terjadi melalui reaksi taut silang antara lipase dengan kitosan menggunakan penaut silang seperti glutaraldehid (Foresti dan Ferreira, 2007). Efisiensi optimum imobilisasi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, komposisi kitosan, glutaraldehid, dan enzim.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum imobilisasi enzim lipase pada kitosan serbuk. Keberhasilan imobilisasi enzim dibuktikan melalui uji aktivitas katalitik enzim pada reaksi transesterifikasi. Selain itu beberapa parameter seperti

stabilitas termal, kemampuan penggunaan ulang, dan parameter kinetik dipelajari untuk mengetahui kualitas enzim terimobilisasi pada kitosan serbuk.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitin (Biotech Surindo), enzim lipase pankreas babi (Merck), minyak kelapa sawit (Bimoli Spesial), kertas saring Whatman 1, bahan dari Merck dengan kualitas p.a, yaitu : natrium hidroksida (NaOH), asam klorida (HCl), metanol (CH₃OH), n-heksan, natrium dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄.2H₂O), natrium hidrogen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O), asam oksalat (H₂C₂O₄), tembaga (II) sulfat (CuSO₄.5H₂O), kalium natrium tatrak (KNaC₄H₄O₆.4H₂O), glutaraldehid, BSA (Bovin Serum Albumin) dan indikator pp.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas laboratorium, botol Falcon 50 mL, mikropipet (10, 200, 1000 µL), *hot plate* (Ishtar Hitzstir), *magnetic stirrer*, *shaker incubator* (Seiwa Rico Co, LTD, EFM-60), oven (WTB Binder), *muffle furnace*, pH meter, spektrometer inframerah (FT-IR Prestige-21), kromatografi gas (GC, Shimadzu GC-14B, Shimadzu QP 2010), kromatografi Gas-Spektrometer Massa

(GC-MS, Shimadzu QP 2010S), *microplate*, *Elisa Reader*.

Pembuatan kitosan

Sebanyak 50 g kitin direaksikan dengan 500 mL NaOH 50% (b/v) pada suhu 100 °C dengan variasi waktu reaksi 1, 2, dan 3 jam. Setelah dingin, hasil reaksi disaring dan dicuci hingga pH pencucian netral. Residu hasil penyaringan dioven hingga kering dan diperoleh kitosan yang kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrometer FT-IR serta diukur kadar air, kadar abu, dan kadar nitrogennya.

Imobilisasi enzim lipase pada kitosan serbuk

Larutan enzim bebas 1% dibuat dengan melarutkan 50 mg enzim lipase dalam 5 mL buffer fosfat 0,05 M. Campuran dihomogenkan dengan pengadukan selama 30 menit. Pada saat yang sama kitosan serbuk diaktivasi dengan glutaraldehid. Selanjutnya kitosan teraktivasi diinteraksikan dengan enzim terlarut. Setelah perendaman 60 menit dilakukan penyaringan. Jumlah enzim awal dan sisa enzim terimobilisasi dianalisis kadar proteinnya menggunakan *elisa reader*.

Uji aktivitas enzim pada reaksi transesterifikasi

Sebanyak 2,43 mL minyak kelapa sawit dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu ditambahkan 606 µL metanol, 10 µL air dan n-heksan sampai tanda batas. Kemudian campuran dipindahkan ke botol falcon 50 mL lalu ditambahkan 1 g kitosan serbuk terimobilisasi. Dengan prosedur yang sama, kontrol reaksi dibuat dengan penambahan enzim lipase bebas yang setara dengan enzim terimobilisasi. Kedua larutan direaksikan selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam *shaker incubator*. Setelah reaksi selesai, dilakukan penyaringan untuk memisahkan enzim dengan filtrat yang mengandung *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) dan dianalisis menggunakan GC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Kitosan dan Karakterisasinya

Kitosan diperoleh melalui reaksi deasetilasi kitin menggunakan basa kuat. Reaksi deasetilasi dilakukan selama 1, 2, dan 3 jam menghasilkan produk yang selanjutnya disebut sebagai kitosan DD-1, kitosan DD-2, dan kitosan DD-3. Hasil karakterisasi kitosan disajikan pada Tabel 1. Kitosan yang diperoleh pada penelitian ini memiliki kadar abu dan kadar nitrogen yang sesuai dengan parameter

standar kitosan. Namun untuk kadar airnya sedikit lebih tinggi dari parameter standar yang ditentukan.

Tabel 1. Hasil karakterisasi kitosan

Pengukuran	Hasil pengukuran (%)		
	DD-1	DD-2	DD-3
Kadar Air	10,85	10,65	11,65
Kadar Abu	0,40	0,29	0,34
Kadar Nitrogen	2,92	3,94	4,34

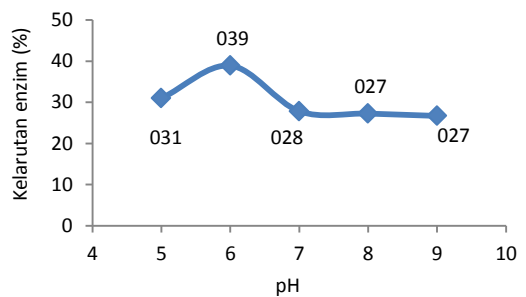
Berdasarkan standar kualitas kitosan, jika derajat deasetilasi < 70% maka disebut sebagai kitin dan apabila > 70% disebut sebagai kitosan. Nilai derajat deasetilasi kitin dan kitosan ditentukan dari spektra FTIR yang diperoleh dengan membandingkan serapan gugus amida (1655 cm⁻¹) dan gugus hidroksi (3450 cm⁻¹). Derajat deasetilasi merupakan nilai yang menunjukkan persentase gugus asetil yang hilang selama proses deasetilasi kitin.

Perhitungan derajat deasetilasi didasarkan pada metode *base-line A* seperti yang dikemukakan oleh Domzy dan Robets (1985) dan *base-line B* seperti yang dikemukakan Baxter dalam Hung *et al.* (2002). Kitosan yang diperoleh pada penelitian ini memiliki nilai derajat deasetilasi sebesar 82,37; 87,30; dan 92,72%. Adanya perlakuan deasetilasi pada waktu yang lebih

lama terbukti dapat meningkatkan penghilangan gugus asetil.

Studi Pengaruh pH dan Derajat Deasetilasi Pada Imobilisasi Enzim

Enzim lipase yang akan diimobilisasikan pada kitosan serbuk dilarutkan terlebih dahulu dalam larutan buffer fosfat dengan pH yang bervariasi. Larutan enzim digunakan untuk merendam kitosan yang sebelumnya telah diaktivasi menggunakan agen penaut silang glutaraldehid. Semakin banyak enzim lipase yang terlarut dalam buffer fosfat diharapkan dapat meningkatkan jumlah enzim yang terimobilisasi dalam kitosan serbuk. Hasil kelarutan enzim lipase pada buffer fosfat dengan variasi pH disajikan pada Gambar 1. Grafik tersebut menunjukkan bahwa jumlah enzim terlarut paling banyak terdapat pada buffer fosfat pH 6 dan mengalami penurunan seiring dengan naiknya pH buffer fosfat.

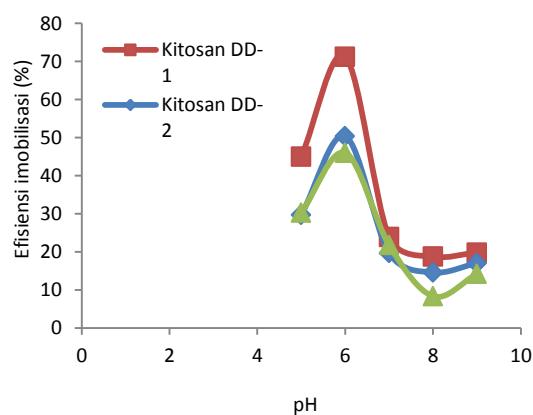


Gambar 1. Hubungan pH dengan Jumlah Enzim Terlarut

Enzim terlarut selanjutnya diimobilisasikan pada kitosan serbuk yang memiliki nilai derajat deasetilasi bervariasi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH pelarutan enzim dan nilai derajat deasetilasi kitosan terhadap efisiensi imobilisasi enzim. Kitosan dengan nilai derajat deasetilasi yang tinggi mengandung lebih banyak gugus $-NH_2$ yang dapat berikatan silang dengan glutaraldehid dan enzim. Semakin tinggi nilai derajat deasetilasi diharapkan dapat meningkatkan jumlah enzim yang terimobilisasi pada kitosan serbuk.

Grafik yang disajikan pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa pada pH optimum pelarutannya, enzim memiliki nilai efisiensi imobilisasi yang paling besar pada masing-masing jenis kitosan. Penutup sisi aktif enzim (*lid*) lebih mudah terbuka pada pH optimumnya, sehingga ikatan silang yang terbentuk dan jumlah enzim yang terimobilisasi semakin banyak (Nakajima *et al.*, 2000). Enzim lipase dan kitosan memiliki titik isoelektrik (pI) yang sangat peka terhadap perubahan pH. Enzim lipase memiliki titik isoelektrik 5,7-5,8 sedangkan kitosan mempunyai titik isoelektrik sebesar 5,4. Pada pH di bawah titik isoelektriknya gugus $-NH_2$ yang terdapat pada molekul enzim dan kitosan

mudah terprotonasi menjadi $-NH_3^+$, sehingga ikatan silang antara kitosan-glutaraldehid-enzim sulit terjadi. Pada pH yang lebih tinggi dari titik isoelektrik akan menyebabkan enzim dan kitosan kaya elektron. Sedangkan pada pH yang terlampaui tinggi efisiensi imobilisasi akan semakin menurun karena enzim mengalami denaturasi.



Gambar 2. Hubungan pH dan derajat deasetilasi kitosan terhadap efisiensi imobilisasi enzim

Efisiensi imobilisasi enzim pada kitosan DD-1, kitosan DD-2, dan kitosan DD-3 berturut-turut sebesar 71,24; 50,36; dan 45,99%. Berdasarkan hasil ini dapat diketahui bahwa kenaikan nilai derajat deasetilasi tidak berpengaruh terhadap jumlah enzim yang terimobilisasi pada kitosan serbuk. Jumlah gugus $-NH_2$ yang semakin banyak dimungkinkan dapat menimbulkan halangan sterik pada proses imobilisasi, sehingga sisi aktif kitosan sulit berikatan dengan sisi aktif enzim dan mengakibatkan jumlah enzim

terimobilisasi semakin sedikit. Pada tahap selanjutnya kitosan DD-1 (82,37%) digunakan sebagai padatan pendukung untuk mempelajari kondisi optimum imobilisasi enzim pada kitosan serbuk.

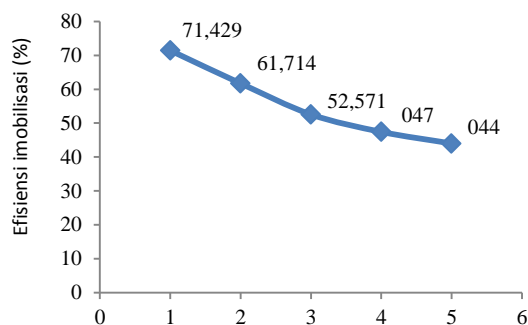
Studi Pengaruh Rasio Mol Kitosan dengan Glutaraldehyd terhadap Efisiensi Imobilisasi

Efisiensi imobilisasi dan aktivitas katalitik enzim terimobilisasi ditentukan oleh proses *cross-linking* yang tepat. Reaksi pengikatan yang tepat dapat terjadi antara gugus $-NH_2$ kitosan secara dominan terhadap gugus $-CHO$ pada glutaraldehyd. Dengan demikian, perbandingan kitosan dan glutaraldehyd yang digunakan menjadi salah satu hal yang penting untuk diperhatikan. Kitosan yang teraktivasi dengan baik akan meningkatkan peluang enzim menempel pada permukaannya. Pada tahap ini imobilisasi dilakukan menggunakan kondisi optimum yang telah diperoleh pada tahap sebelumnya yaitu pH 6 untuk pelarutan enzim dengan kitosan DD-1 sebagai padatan pendukung.

Migneault *et al.* (2004) menyatakan bahwa belum ada mekanisme pasti yang dapat menggambarkan interaksi yang terjadi antara glutaraldehyd dan protein (enzim). Juang *et al.* (2002) mengusulkan interaksi yang terjadi antara

kitosan-glutaraldehyd-enzim melalui dua kemungkinan. Selama proses pengikatan silang gugus $-NH_2$ dari kitosan dapat berikatan dengan gugus $-CHO$ dari glutaraldehyd pada dua perbandingan molekul yaitu 1:1 dan 2:1. Pengikatan silang pada rasio 1:1 berarti satu molekul $-NH_2$ pada kitosan akan berikatan dengan satu molekul $-CHO$ pada glutaraldehyd, sehingga memungkinkan gugus $-NH_2$ dari enzim berikatan dengan gugus $-CHO$ glutaraldehyd pada sisi yang lain. Sedangkan pada rasio 2:1 enzim akan terjebak pada ikatan silang yang terbentuk antara kitosan dengan glutaraldehyd. Interaksi pada pola ini kurang menguntungkan karena dapat menghambat aktivitas katalitik enzim karena berpotensi mengganggu sisi aktif enzim.

Perbandingan kitosan dan glutaraldehyd yang optimum diamati melalui efisiensi imobilisasi dan aktivitas katalitik dari enzim lipase terimobilisasi. Hasil yang disajikan pada Gambar 3 memperlihatkan bahwa efisiensi imobilisasi meningkat seiring dengan semakin banyaknya kitosan yang digunakan. Hal ini dapat terjadi karena jumlah amina yang tersedia untuk berikatan silang dengan glutaraldehyd dan enzim menjadi semakin banyak.



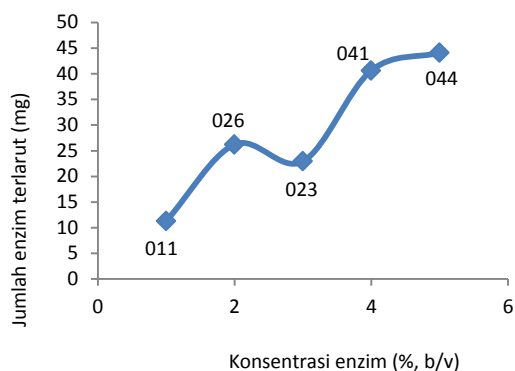
Gambar 3. Hubungan Perbandingan Mol (Kitosan: Glutaraldehyd) terhadap Efisiensi Imobilisasi

Keberadaan glutaraldehyd yang semakin banyak akan menginisiasi terbentuknya ikatan antara gugus $-CHO$ dari glutaraldehyd dengan sisi aktif enzim yaitu ion alkoksida pada serin. Terjadinya interaksi ini akan menyebabkan aktivitas katalitik enzim terganggu. Pada penelitian ini mekanisme *cross-linking* yang terjadi diperkirakan melalui mekanisme dimana satu gugus $-CHO$ pada glutaraldehyd mengikat gugus $-NH_2$ pada kitosan dan pada sisi yang lain gugus $-CHO$ berikatan dengan gugus $-NH_2$ dari enzim.

Studi Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Jumlah Enzim Terimobilisasi

Imobilisasi enzim pada variasi konsentrasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim terhadap banyaknya enzim yang terimobilisasi pada kitosan. Variasi enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah 1, 2,

3, 4, dan 5% (% b/v) yang masing-masing dilarutkan dalam buffer fosfat pH 6. Konsentrasi yang digunakan hanya sampai 5% karena pada konsentrasi tersebut larutan enzim sangat pekat dan mulai jenuh sehingga pelarutan tidak optimal. Perbandingan kitosan dan glutaraldehyd yang digunakan pada tahap ini mengacu pada kondisi optimum imobilisasi yang diperoleh pada tahap sebelumnya.

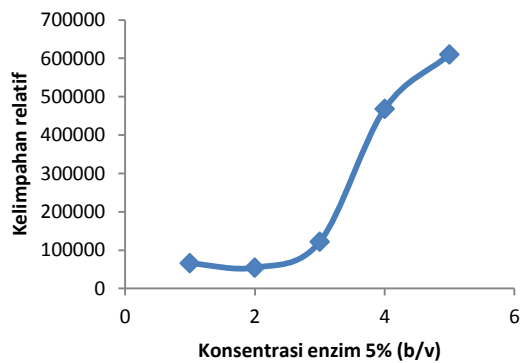


Gambar 4. Hubungan konsentrasi enzim terhadap banyaknya jumlah enzim terimobilisasi

Berdasarkan Gambar 4 dapat dilihat bahwa konsentrasi enzim yang semakin besar dapat meningkatkan jumlah enzim yang terimobilisasi pada kitosan serbuk. Kenaikan konsentrasi enzim sebanding dengan bertambahnya jumlah enzim terimobilisasi, hingga batas tertentu dimana kenaikan enzim tidak dapat menaikkan jumlah enzim terimobilisasi. Pada setiap kenaikan konsentrasi jumlah enzim terimobilisasi mengalami kenaikan

hampir 2 kali dibanding konsentrasi sebelumnya. Namun demikian, terjadi penyimpangan pada konsentrasi 3% dimana jumlah enzim terimobilisasi justru mengalami penurunan. Hal ini dapat disebabkan proses pelarutan yang belum sempurna, sehingga jumlah enzim terimobilisasi menjadi lebih sedikit.

Pada konsentrasi enzim 5% jumlah enzim terimobilisasi hanya mengalami kenaikan sedikit. Hal ini dimungkinkan terjadi karena sistem imobilisasi telah jenuh, dimana kitosan serbuk yang telah diaktivasi dengan glutaraldehid tidak dapat lagi mengikat enzim pada konsentrasi yang lebih tinggi.



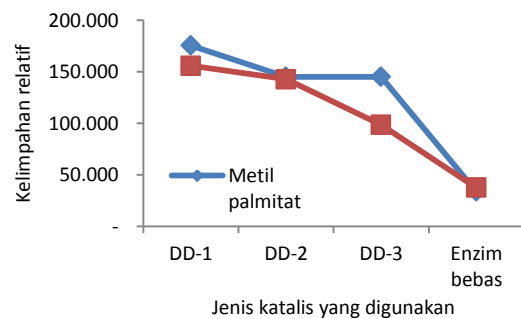
Gambar 5. Hubungan Konsentrasi Enzim terhadap Kelimpahan Relatif Metil Palmitat

Banyaknya enzim yang terimobilisasi pada kitosan serbuk sebanding dengan aktivitas katalitik enzim pada reaksi transesterifikasi minyak kelapa sawit dengan metanol. Hal ini dibuktikan dengan konversi metil ester dimana

semakin banyak jumlah enzim terimobilisasi memberikan aktivitas katalitik yang semakin baik pula, ditandai dengan semakin meningkatnya luas area metil palmitat yang terbentuk (Gambar 5).

Aktivitas Katalitik Enzim Lipase Terimobilisasi

Keberhasilan enzim lipase terimobilisasi dalam mengkatalisis reaksi transesterifikasi ditandai dengan terbentuknya FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*). Hasil uji aktivitas transesterase enzim lipase terimobilisasi pada kitosan serbuk dengan derajat deasetilasi berbeda disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Perbandingan aktivitas katalitik enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi pada kitosan dengan derajat deasetilasi yang berbeda

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa enzim lipase terimobilisasi pada kitosan serbuk memiliki aktivitas katalitik pada reaksi transesterifikasi. Enzim lipase yang terimobilisasi pada

kitosan DD-1 memberikan hasil konversi yang lebih baik dibanding kitosan DD-2 dan kitosan DD-3. Sebagai pembanding digunakan enzim lipase bebas dengan jumlah yang setara dengan enzim terimobilisasi. Secara keseluruhan enzim lipase terimobilisasi pada kitosan serbuk memiliki aktivitas katalitik yang lebih baik dibanding enzim lipase bebas.

Pada beberapa kajian yang diacu pada penelitian ini melaporkan bahwa enzim terimobilisasi memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan enzim bebas. Penurunan aktivitas ini dapat disebabkan oleh hambatan sterik yang ditimbulkan oleh matriks pendukung imobilisasi. Selain itu dapat juga karena faktor perubahan struktur enzim yang terjadi selama proses imobilisasi sehingga menghambat aktivitas katalitik enzim mengingat struktur enzim sangat sensitif terhadap perubahan kondisi lingkungan. Namun demikian, memungkinkan bagi enzim terimobilisasi memiliki aktivitas katalitik yang lebih baik dibanding dengan enzim bebasnya.

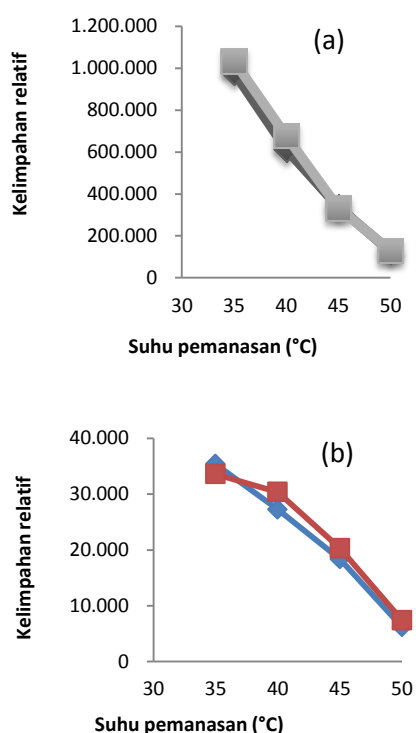
Aktivitas enzim terimobilisasi yang lebih baik dibanding enzim bebasnya dapat terjadi jika ikatan yang terbentuk selama proses imobilisasi berada pada sisi yang tepat, sehingga ikatan yang terbentuk dapat memperbesar luas

permukaan enzim. Luas permukaan yang semakin besar dapat memperbesar peluang terjadinya interaksi antara enzim dan substrat, sehingga pada rentang waktu yang sama enzim terimobilisasi dapat mengkonversi produk lebih banyak dibandingkan dengan enzim bebasnya. Selain itu enzim berbentuk serbuk dapat membentuk agregat pada medium reaksi yang minim air, sehingga menghambat interaksinya dengan substrat Shah and Gupta (2007). Ketepatan matriks pendukung imobilisasi yang tepat juga menjadi penentu keberhasilan imobilisasi enzim.

Stabilitas Termal Enzim Lipase Terimobilisasi

Aktivitas enzimatik sangat dipengaruhi oleh lingkungan yang salah satunya adalah suhu. Enzim memiliki aktivitas optimum pada suhu tertentu dan akan kehilangan aktivitas ketika berada di atas suhu optimumnya. Hal ini terjadi karena struktur enzim rusak atau mengalami denaturasi. Pengujian stabilitas termal dilakukan terhadap enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi untuk membandingkan kemampuan keduanya dalam mempertahankan aktivitas katalitiknya setelah pemanasan pada suhu tertentu.

Enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi dipanaskan pada variasi suhu 35, 40, 45, dan 50 °C sebelum digunakan untuk mengkatalisis reaksi transesterifikasi minyak kelapa sawit dengan metanol. Pengaruh pemanasan terhadap aktivitas katalitik enzim lipase terimobilisasi dan enzim lipase bebas disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengaruh pemanasan terhadap aktivitas katalitik (a.) enzim lipase terimobilisasi, (b) enzim lipase bebas

Pada Gambar 7 menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi mengalami penurunan pada setiap suhu pemanasan. Pada suhu 35-45 °C penurunan aktivitas rata-rata enzim lipase bebas lebih kecil

yaitu 16,25-32,92%, sedangkan enzim lipase terimobilisasi mengalami penurunan sebesar 36,01-47,86%. Namun demikian stabilitas termal enzim lipase terimobilisasi pada suhu 50 °C lebih baik dibandingkan dengan enzim lipase bebas. Besarnya penurunan aktivitas enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi berturut-turut sebesar 64,86% dan 61,94%.

Berdasarkan hasil pengujian ini diketahui bahwa enzim lipase terimobilisasi memiliki stabilitas termal yang hampir sama dengan enzim lipase bebasnya. Hal ini ditandai dengan perbedaan yang tidak signifikan dari persentase penurunan rata-rata pada setiap kenaikan suhu. Persentase penurunan rata-rata untuk reaksi yang dikatalisis enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi berturut-turut sebesar 38% dan 48%. Enzim lipase bebas masih dapat mempertahankan aktivitasnya di setiap kenaikan 5 °C dengan penurunan yang cenderung lebih rendah dibandingkan enzim lipase terimobilisasi kecuali pada suhu pemanasan 50 °C.

Struktur tiga dimensi enzim sangat rentan terhadap perubahan suhu, dimana perubahan struktur atau konformasi dapat mempengaruhi aktivitas katalitik enzim. Bahkan dapat menyebabkan inaktivasi

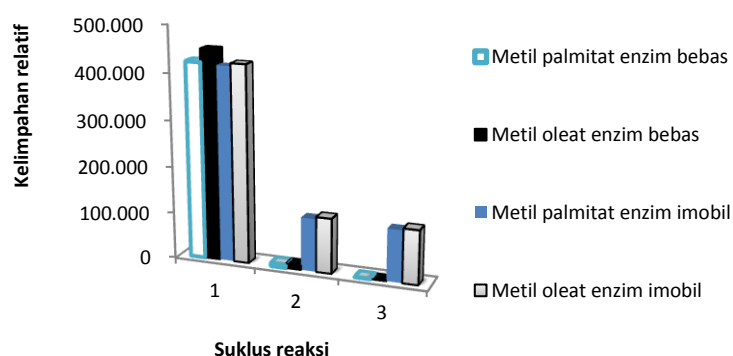
jika enzim berada pada lingkungan yang ekstrim rendah atau ekstrim tinggi dibanding suhu optimumnya. Enzim terimobilisasi yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki stabilitas termal yang tidak terlalu baik. Hal ini mungkin terjadi karena ikatan silang antara kitosan-glutaraldehid-enzim mengalami pemutusan selama pemanasan, sehingga sebagian enzim terlepas dari sistem imobilisasi.

Kemampuan Penggunaan Ulang Enzim Lipase Terimobilisasi

Secara umum enzim bebas memiliki stabilitas penggunaan ulang yang rendah karena mudah terlarut dalam sistem reaksi, sehingga kurang menguntungkan jika diaplikasikan pada reaksi berulang. Imobilisasi enzim dilakukan sebagai upaya untuk mengatasi kelemahan ini. Pada proses imobilisasi, enzim diikatkan

pada padatan pendukung yang tidak larut sehingga proses pemisahan setelah reaksi lebih mudah dan enzim terimobilisasi masih dapat digunakan ulang. Pengujian kemampuan penggunaan ulang enzim lipase terimobilisasi menghasilkan grafik yang disajikan pada Gambar 8.

Hasil yang disajikan pada Gambar 8 memperlihatkan bahwa enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi mengalami penurunan aktivitas pada setiap siklus reaksi. Pada siklus kedua penurunan aktivitas cukup signifikan dimana penurunan aktivitas rata-rata untuk enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi berturut-turut sebesar 98,06% dan 72,35%. Hal ini berarti perbandingan konversi minyak kelapa sawit menjadi estermya pada awal dan akhir reaksi untuk enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi berturut-turut sebesar 1,94% dan 27,65%.



Gambar 8. Perbandingan Luas Area Metil Palmitat Dan Metil Oleat Pada Uji Stabilitas Penggunaan Ulang

Pada siklus ketiga enzim lipase terimobilisasi masih dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya dengan penurunan aktivitas rata-rata sebesar 2,19%. Hal ini berarti enzim lipase terimobilisasi masih dapat mengkonversi reaktan sebesar 97,81% dibandingkan dengan metil ester yang dihasilkan pada siklus reaksi kedua.

Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa enzim lipase terimobilisasi memiliki stabilitas penggunaan ulang yang lebih baik dibanding dengan enzim lipase bebas. Enzim lipase terimobilisasi masih dapat mempertahankan aktivitasnya hingga tiga siklus reaksi meskipun mengalami penurunan konversi hasil yang signifikan pada siklus reaksi kedua. Sedangkan enzim lipase bebas hanya dapat digunakan hingga dua siklus reaksi. Hasil ini mengindikasikan bahwa ikatan silang yang terjadi dalam sistem enzim terimobilisasi tidak mengganggu sisi aktif enzim, sehingga enzim masih dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya.

KESIMPULAN

Enzim lipase dapat diimobilisasikan pada kitosan serbuk dengan metode pengikatan silang. Kondisi optimum

imobilisasi ditandai dengan semakin banyaknya jumlah enzim yang terimobilisasi pada kitosan serbuk. Semakin besar nilai derajat deasetilasi kitosan tidak berpengaruh signifikan terhadap jumlah enzim terimobilisasi. Imobilisasi optimum diperoleh pada kondisi pH 6 untuk pelarutan enzim, nilai derajat deasetilasi 82,27%, perbandingan mol kitosan dengan glutaraldehid sebesar 4:1, dan konsentrasi enzim 5%. Banyaknya enzim yang terimobilisasikan pada kitosan serbuk, sebanding dengan aktivitas katalitiknya pada reaksi transesterifikasi minyak. Imobilisasi enzim mampu meningkatkan stabilitas penggunaan ulang dari enzim.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, lipase terimobilisasi dapat digunakan sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi yang merupakan reaksi dasar untuk produksi biodisel. Lipase terimobilisasi memiliki stabilitas penggunaan ulang yang lebih baik dibanding lipase bebas, sehingga dapat mengefisienkan penggunaan katalis. Selain itu, penggunaan kitosan sebagai matriks imobilisasi dapat meningkatkan nilai guna dan ekonomi dari limbah cangkang kepiting.

DAFTAR RUJUKAN

- Amorim, R. V. S., Melo E. S., Carneiro-daChunha, M. G., Ledingham, W. M., and Campos-Takaki, G. M., 2003, Chitosan from *Syncephalastrum resemosum* Used as a Film Support for Lipase Immobilization, *Bioresour. Technol.*, 89, 35-39.
- Brena, B.M., and Batista-Viera, F., 2006, *Imobilization of Enzymes*, Humana Press, Spanyol.
- Cahyaningrum, S.E., 2009, Peranan Jembatan Kation Logam dalam Imobilisasi Papain pada Kitosan, *Disertasi*, Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta.
- Chiou, S.H., and Wu, W.T., 2004, Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan with Activation of The Hydroxyl Groups, *Biomaterials*, 25, 197-204.
- Deng, H.T., Wang, J.J., Ma, M., Liu, Z.Y., and Zheng, F., 2009, Hydrophobic Surface Modification of Chitosan Gels by Stearyl for Improving the Activity of Immobilized Lipase, *Chinese Chem. Lett.*, 20, 995-999.
- Domzy, J.G., and Roberts, G.A.F., 1985, Evaluation of Infrared Spectroscopic Technique for Analyzing Chitosan, *Makromol. Chem.*, 186, 1671-1677.
- Foresti, M.L., and Ferreira, M.L., 2007, Chitosan-immobilized Lipases for The Catalysis of Fatty Acid Esterifications, *J. Enzyme Microb. Tech.*, 40, 769-777.
- Hung, S., Peh, K.K., and Khan, T.A., 2002, Reporting Degree of Deacetylation Value of Chitosan : The Influence of Analytical Methods, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5(3), 202-212.
- Jegannathan, K.R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E.S., and Ravindra, P., 2008, Production of Biodiesel using Immobilized Lipase-a Critical Review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28, 253-64.
- Krajewska, B., 2004, Application of Chitin and Chitosan-Based Materials for Enzyme Immobilizations : A Review. *Enz. Microb. Technol.*, 35, 126-139.
- Kuo, C.H., Liu, Y.C., Chang, C.M.J., Chen J.H., Chang C., and Shieh, C.J., 2012, Optimum Conditions for Lipase Immobilization on Chitosan-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles, *J. Carb. Pol.*, 87, 2538-2545.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., and Waldron, K.C., 2004, Glutaraldehyde : Behavior in Aqueous Solution, Reaction with

- Protein and Application to Enzym Crosslinking, *BioTechnique*, 37, 790-802.
- Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Maruyama, T.M., Furusaki, S., and Seki, M., 2000, Oil-Water Interfacial Activation of Lipase for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 1121-1126.
- Nasratun, M., Said, H. A., Noraziah, A., and Adl Alla, A. N., 2009, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification, *Am. J. Appl. Sci.*, 6 (9), 1653-167.
- Orrego, C.E., Salgado, N., Valencia, J.S., Giraldo, O.H., and Cardona, C.A., 2010, Novel Chitosan Membranes as Support for Lipases Immobilization : Characterization Aspects, *J. Carb. Pol.*, 79, 9-16.
- Pereira, E.B., Zanin, G.M., and Castro, H.F., 2003, Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reaction, *Braz. J. Chem. Eng.*, Vol.20 (4), 343-355.
- Romdhane, I.B.B., Romdhane, Z.B., Gargouri, A., and Belghith, H., 2011, Esterification Activity and Stability of *Talaromyces thermophilus* Lipase Immobilized onto Chitosan, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 68, 230-239.
- Shah, S., and Gupta, M.N., 2007 Lipase Catalyzed Preparation of Biodiesel from Jatropha Oil in a Solvent Free Sistem, *Process Biochem.*, 42, 409-14.
- Silva, J. A., Macedo, G.P., Rodrigues, D.S., Giordano, R.L.C., and Goncalves, L.R.B., 2012, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by Covalent Attachment on Chitosan-Based Hydrogels Using Different Support Activation Strategies, *J. Biochem. Eng.*, 60, 16-24.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., and Wang, F., 2010, Biodiesel Production with Immobilized Lipase : A Review, *J. Biotech. Adv.*, 28, 628-634.
- Xie W., and Wang J., 2012, Immobilized Lipase on Magnetic Chitosan Microspheres for Transesterification of Soybean Oil, *J. Biom. Bioe.*, 36, 373-380.
- Yücel, S., Terzioğlu, P., and Özçimen, D., 2013, Lipase Application in Biodiesel Production, *Lecensee InTech*, 210-250.