

PENGEMBANGAN ZIRKONIA AGAROSA SEBAGAI MATRIK UNTUK BIOKATALIS PADA AMOBILISASI LIPASE *Candida Rugosa*

Development of Zirconia-Agarose Support Matrix for Immobilization of Candida rugosa Lipase

Chusnul Hidayat, Supriyadi, Probondari

Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada,
Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

ABSTRAK

Enzim merupakan biokatalis yang potensial untuk dikembangkan karena efektivitasnya yang tinggi dan bersifat spesifik serta mampu mengkatalisis reaksi kimia dengan efisien dan dengan kebutuhan energi yang rendah. Enzim amobil lebih stabil dibandingkan dengan enzim bebas dan dapat digunakan kembali. Oleh karena itu, berbagai metode amobilisasi dikembangkan melalui pengkajian penggunaan berbagai material support matrik, metode aktivasi matrik dan metode pengikatan enzim. Dalam penelitian ini, agarose-zirkonia dibuat sebagai support matrik untuk amobilisasi lipase *Candida rugosa*. Pengikatan lipase dilakukan secara kovalen menggunakan epiklorohidrin sebagai reagen bifungsional. Faktor yang dikaji adalah konsentrasi NaOH dalam sistem reaksi dan kandungan gugus epoksida pada matrik terhadap enzim amobil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi larutan sebesar 0,8 M NaOH menghasilkan gugus epoksida sebanyak 714 $\mu\text{mol/gr}$ matriks. Amobilisasi enzim terbaik diperoleh pada kondisi jumlah gugus epoksida sebanyak 327 $\mu\text{mol/gr}$ matriks yang menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi sebesar 0,35 U/mg protein. Efisiensi amobilisasi berdasar aktivitas enzim relatif terhadap total enzim terikat pada matriks sebesar 92,13 %. Estimasi umur simpan lipase amobil hingga aktivitas menurun 50 % adalah 7,16 minggu, dengan kondisi pH 8, pada suhu penyimpanan 4 °C. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa matriks zirkonia agarosa telah dapat digunakan dengan baik untuk amobilisasi enzim dan lipase amobil dapat digunakan untuk interesterifikasi minyak ikan dan asam laurat.

Kata kunci: Enzim amobil, lipase, zirkonia agarosa, biokatalis

ABSTRACT

Enzymes have an ability to catalyze specific chemical reactions with high efficiency and low energy cost. Since immobilized enzymes are more stable and reusable in comparison with free enzyme, then the developing of both the enzyme immobilized technique and their support matrices are very important. In this research, agarose-zirconia matrix was prepared for the immobilization of *Candida rugosa* lipase. Matrix was activated with epichlorohydrin, as bifunctional reagent, to prepare a covalent bridge between matrix and enzyme. Factors, such as NaOH concentration and epoxide groups at the surface of the matrix were investigated. The results show that the optimum NaOH concentration was 0,8 M, in which the epoxide content was 714 $\mu\text{mol/gr}$ matrix. Optimization of enzyme coupling resulted in that the optimum of epoxide content was 327 $\mu\text{mol/gr}$ matrix and the immobilized specific activity was 0,35 U/mg protein. The immobilization efficiency was 92,13 % based on relative activity of immobilized enzyme to total enzyme loading. Half life time estimation was 7,16 weeks in storage condition temperature at 4 °C and pH 8. Immobilized lipase was used for interesterification of commercial fish oil and lauric acid. It can be concluded that agarose zirconia matrix was suitable for enzyme immobilization.

Keywords: Immobilized enzyme, lipase, zirconia agarose, biocatalyst

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalis yang potensial untuk dikembangkan karena efektivitasnya yang tinggi dan bersifat spesifik serta mampu mengkatalisis berbagai reaksi kimia dengan efisien dan dengan kebutuhan energi yang rendah (Badr, 2005; Bezbradica dkk., 2006; Carr dan Bowers, 1990; Chibata, 1978). Lipase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan ester dari asil gliserol pada *interface* minyak dan air. Secara alamiah lipase hanya berperan dalam reaksi – reaksi hidrolisis di alam, namun dalam medium pelarut organik, lipase mengkatalisis pembentukan ester dan transesterifikasi gliserida (Herawan, 2004; Maia dkk., 1999). Kelebihan dari biokatalis lipase adalah sifatnya yang spesifik terhadap substrat tertentu. Hal ini dimanfaatkan untuk memodifikasi lemak sehingga mempunyai sifat fisik ataupun sifat fungsional yang diinginkan (Abigor dkk., 1995; Ghazali dkk., 1995; Hamam dan Shahidi, 2005; Kawashima dkk., 2003; Nagao dkk., 2001; Shimada dkk., 2003; Soumanou dkk., 1998). Lipase telah banyak digunakan dalam berbagai industri, seperti pembuatan detergen, oleokimia, biofuel, surfaktan dan sintesis polimer. Dalam industri pangan, lipase digunakan dalam pembuatan keju, butter, krim, margarin, cocoa butter equivalent, pembentukan aroma pada minuman dan modifikasi gliserida untuk makanan kesehatan. Dalam pengembangan produk margarin, interesterifikasi dengan biokatalis lipase memberikan alternatif untuk pembuatan margarin tanpa lemak trans (Hansen dan Eigtved, 1985), menggantikan produk margarin hasil hidrogenasi, sejalan dengan berkembangnya pengetahuan tentang efek negatif konsumsi lemak trans bagi kesehatan jantung.

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mempertahankan aktivitas enzim dengan cara amobilisasi. Berbagai metode amobilisasi telah dikembangkan melalui pengkajian penggunaan berbagai material support, metode aktivasi support dan metode pengikatan enzim. Hal yang menarik dari amobilisasi enzim terutama pada pemakaian berulang, efisien dan aktivitas katalitik yang terkendali (Carr dan Bowers, 1990; Chibata, 1978; Cardias dkk., 1999; Carlsson dkk., 1975; Castro dkk., 2000). Selain itu enzim amobil berpotensi mempunyai masa pakai yang panjang, laju deaktivasi yang dapat diprediksi dan aplikasi dalam reaksi dengan banyak tahap menjadikan reaksi lebih efisien (IUPAC, 1995). Kondisi optimal preparasi amobilisasi untuk suatu kombinasi enzim dan matriks sangat spesifik, sehingga selalu diperlukan tahap optimasi untuk setiap kombinasi enzim dan matriks. Dengan amobilisasi diharapkan enzim menjadi lebih stabil terhadap lingkungan dan perlakuan mekanis, dapat digunakan berulang sehingga dapat menekan biaya proses. Stabilitas enzim amobil meliputi stabilitas termal, stabilitas dalam penyimpanan dan stabilitas operasional (IUPAC, 1995;

Gaur dkk., 2006; Trevisan dkk., 1997; Zaborsky, 1973) yang menjadi hal penting dalam menentukan kualitas amobilisasi, dimana stabilitas tidak hanya ditentukan oleh karakter enzim tetapi juga ketahanan matriks.

Dalam penelitian ini dilakukan amobilisasi enzim lipase *Candida rugosa* pada matriks zirkonia agarosa yang diaktivasi gugus epoksida. Agarosa yang kaya akan gugus hidroksil memberikan kapasitas yang tinggi bagi pengikatan enzim pada matriks. Zirkonia dalam matriks berperan meningkatkan densitas matriks yang memberikan kekuatan pada matriks supaya lebih tahan terhadap kompresi dan perlakuan mekanis. Amobilisasi dengan metode ikatan kovalen ini menggunakan epiklorohidrin sebagai reagen bifungsional. Epiklorohidrin sebagai reagen bifungsional mempunyai gugus reaktif pada kedua ujungnya. Efek sterik dan polaritas ikatan cincin tiga anggota membuat gugus epoksida menjadi sangat reaktif, sementara di ujung yang lain epiklorohidrin mempunyai gugus klorida yang akan berikatan dengan agarosa. Hal ini dapat dimanfaatkan untuk mengikat enzim pada matriks secara kovalen.

METODE PENELITIAN

Bahan

Minyak ikan omega-3 produksi dari Prince of Peace Enterprise Inc. (USA). Asam laurat, Bovine Serum Albumin dan enzim *Candida rugosa* lipase diperoleh dari Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Zirkonia oksida, agarosa, epiklorohidrin, asam bromida, asam perklorat, kloroform, asam asetat glasial, indikator kristal violet, Follin, NaOH, Na₂CO₃, Na-K-Tartrat, asam oleat, isooktana, kupri asetat anhidrat, piridin, plat silika gel GF 254, petroleum eter, dietil eter dan asam asetat glasial diperoleh dari Merck KGaA (Darmstadt, German).

Preparasi Matriks Zirkonia Agarosa

Preparasi matriks zirkonia agarosa diadaptasi dari metode yang sudah dilakukan sebelumnya (Hidayat dkk., 2003). Zirkonia oksida (10 gr) yang telah dipanaskan hingga 80 °C, ditambahkan pada agarosa 6 % (1,5 gr agarosa/ 25 ml aquades) dalam keadaan panas, diaduk kemudian diemulsikan kedalam 300 ml minyak sawit dengan 4 gr *emulsifier* Span 85, kemudian dihomogenisasi dengan kecepatan 2000 RPM selama 1 menit untuk mendapatkan dispersi zirkonia agarosa. Emulsi kemudian direkristalisasi dengan *icebath*, hingga suhu turun dibawah 15 °C. Matriks dicuci dengan larutan detergen hingga bersih dari minyak.

Aktivasi Matriks dengan Epiklorohidrin

Aktivasi matriks zirkonia agarosa dilakukan berdasarkan metode yang diadaptasi dari penelitian yang sudah dilakukan

sebelumnya (Wang dkk., 2006). Sebanyak 2 gram matriks zirkonia agarosa yang telah dikeringkan secara vakum filtrasi diinkubasi dalam NaOH 0,2 – 0,8 M dengan 1 ml epiklorohidrin dalam waterbath shaker dengan kecepatan 120 stroke/menit pada suhu 45 °C selama 4 jam. Matriks yang telah teraktivasi gugus epoksi dicuci dengan aseton dingin dan akuades, kemudian disimpan dalam buffer fosfat pH 7. Gugus epoksida terikat dianalisa secara kualitatif menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) dengan melihat serapan karakteristik gugus epoksida pada bilangan gelombang 800 – 890 cm⁻¹ (Coates, 2000). Penentuan gugus epoksida terikat dilakukan dengan cara titrasi (Jay dkk., 1964).

Amobilisasi Lipase *Candida rugosa*

Sebanyak 2 gr matriks zirkonia agarosa yang telah diaktivasi dicampur dengan 20 ml larutan enzim dengan konsentrasi 1 mg/ml dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7. Inkubasi selama 8 jam pada 30°C dalam waterbath shaker dengan kecepatan 120 stroke/ menit. Matriks disaring, kemudian dicuci dengan buffer fosfat pH 7 (Wang dkk., 2006). Efisiensi pengikatan enzim, efisiensi amobilisasi, dan aktivitas enzim relatif terhadap total enzim terikat pada matriks ditentukan berdasarkan uji aktivitas metode spektroskopi (Marseno dkk., 1998).

Uji Stabilitas Lipase Amobil dalam Berbagai Suhu

Uji stabilitas thermal lipase amobil dan lipase bebas dilakukan pada temperatur 40, 50 dan 65 °C dalam buffer fosfat 0,05 M pH 8,0 dengan interval waktu pengujian 0, 30, 60, 90 dan 120 menit. Stabilitas ditentukan berdasarkan aktivitas hidrolitik yang tersisa setelah inkubasi yang diuji berdasarkan metode spektroskopi (Marseno dkk., 1998).

Uji Stabilitas Lipase Amobil dalam Penyimpanan

Uji stabilitas lipase amobil dan lipase bebas dilakukan pada temperatur 4 °C dalam buffer fosfat 0,05 M pH 8,0 dengan interval waktu pengujian 0–5 minggu. Stabilitas ditentukan berdasarkan aktivitas hidrolitik yang tersisa setelah inkubasi yang diuji berdasarkan metode spektroskopi (Marseno dkk., 1998).

Reaksi Asidolisis Minyak Ikan dengan Asam Laurat

Lipase yang telah diamobilisasi digunakan sebagai biokatalisator dalam reaksi asidolisis antara minyak ikan dengan asam laurat. Untuk menentukan suhu optimum reaksi asidolisis dilakukan preparasi sebagai berikut: 1 gram minyak ikan dilarutkan dalam 8 ml heksana, ditambahkan 3 gram asam laurat, diaduk dengan *vortex mixer* hingga asam laurat larut sempurna, kemudian ditambahkan 2 gram lipase amobil. Inkubasi dilakukan dalam waterbath shaker dengan kecepatan

120 *stroke*/menit selama 24 jam dengan suhu inkubasi 35, 40, 45, 50, dan 55 °C.

Untuk menentukan rasio substrat optimum untuk reaksi asidolisis yaitu mol minyak ikan: mol asam laurat yang menghasilkan inkorporasi laurat tertinggi, dilakukan preparasi sebagai berikut: Minyak ikan sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 8 ml heksana, ditambahkan asam laurat 0,5 – 3 gram, diaduk dengan *vortex mixer* hingga asam laurat larut sempurna, kemudian ditambahkan 2 gram lipase amobil. Inkubasi dilakukan pada suhu 45 °C selama 24 jam dalam waterbath shaker dengan kecepatan 120 *stroke*/menit.

Pada akhir inkubasi, lipase amobil dipisahkan dari hasil reaksi dengan cara disaring. Suatu campuran etanol dan aseton dengan rasio 1:1 (v/v) sebanyak 20 ml ditambahkan untuk mencegah terjadinya emulsi saat penetralan asam lemak bebas sekaligus bersifat racun bagi enzim sehingga inaktif. Pemisahan asam lemak bebas dilakukan dengan cara: campuran reaksi dititrasi dengan 0,5 M larutan KOH dengan indikator phenolphthalein (PP) sampai warna larutan menjadi merah jambu. Heksana 35 ml ditambahkan ke dalam campuran untuk mengekstrak asilgliserol. Campuran dicampur dengan seksama dan dipindah ke dalam corong pemisah. Dua lapisan (fraksi air dan fraksi heksana) akan terpisah, dan lapisan air dibuang. Fraksi heksana kemudian ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk menghilangkan sisa air. Heksana selanjutnya dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C tekanan vakum 335 mmHg sehingga diperoleh fraksi asilgliserol. Fraksi asilgliserol kemudian dianalisis dengan menggunakan gas kromatografi untuk menentukan jumlah inkorporasi asam laurat ke dalam gliserida.

Analisis Gliserida Produk Asidolisis

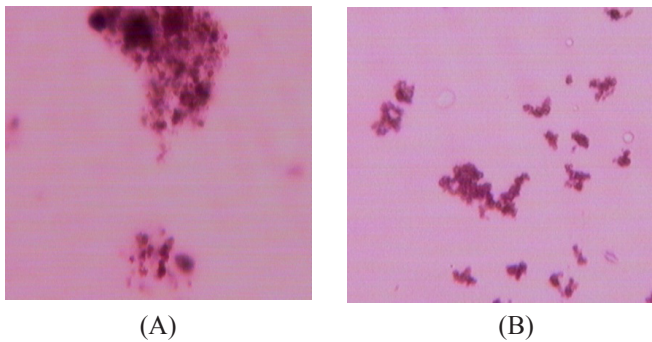
Profil gliserida hasil asidolisis dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (TLC) untuk mengetahui komponen monogliserida, digliserida, dan trigliserida dari fraksi asilgliserol yang dihasilkan. Plat TLC silika gel sebelum digunakan terlebih dahulu diaktivasi dalam oven 105 °C selama 2 jam. Sampel diaplikasikan pada plat TLC 1,5 cm dari dasar plat. Setelah mengering, plat dikembangkan dalam tangki pengembangan yang telah dijenuhkan dengan campuran petroleum eter : dietil eter : asam asetat (60:40:1). Pengembangan dilakukan sampai 1 cm dari tepi atas plat. Plat TLC selanjutnya dikeripkan dan divisualisasi dengan uap iodine sehingga terlihat spot-spot dari komponen asilgliserol berwarna coklat. Analisis kuantitatif dilakukan dengan TLC Scanner Camag.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Matriks Zirkonia Agarosa

Pada penelitian ini matriks dengan densitas tinggi (Gambar 1A) dibuat dengan melapisi zirkonia (densitas 4.000

kg/m³) dengan agarose. Gambar 1B menunjukkan bahwa seluruh permukaan zirkonia telah dilapisi oleh agarose. Zirkonia dalam matriks agarosa berperan meningkatkan densitas matriks dan memberikan kekuatan pada matriks supaya lebih tahan terhadap kompresi serta perlakuan mekanis. Agarosa [(1→4)-3,6-anhidro-α-L-galaktopiranosil-(1→3)-β-D-galaktopiran] merupakan polisakarida yang berpotensi sebagai *carrier* dalam amobilisasi enzim (Carr dan Bowers, 1990; Chibata, 1978; Carlsson dkk., 1975; Zaborsky, 1973; Hidayat dkk., 2003; Hansen dan Eigtyed, 1985; Matsumoto dan Mizuno, 1978; Trevan, 1980) karena mempunyai banyak gugus hidroksil sepanjang rantai polisakarida. Gugus hidroksi mudah diaktivasi dengan gugus fungsional tertentu. Pelapisan zirkonia dengan agarose dimaksudkan agar matrik (gugus hidroksil) mudah direaksikan dengan gugus fungsional tertentu (epiklorohidrin) sehingga dapat digunakan untuk amobilisasi enzim.



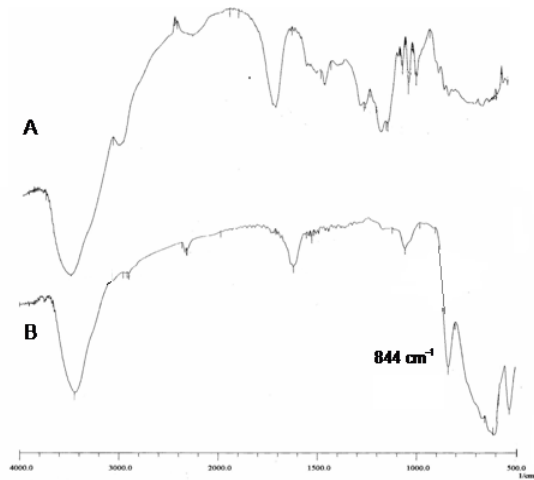
Gambar 1. Hasil mikroskopik partikel Zirkonia oksida (A) dan Zirkonia agarosa (B) dengan perbesaran 100 kali

Aktivasi Matriks

Epiklorohidrin merupakan salah satu reagen bifungsional (Carr dan Bowers, 1990; Carlsson dkk., 1975; Hidayat dkk., 2003; Wang dkk., 2006; Matsumoto dan Mizuno, 1978; Mateo dkk., 2000) sehingga dapat digunakan untuk aktivasi matriks. Analisa kualitatif terikatnya gugus epoksida pada matriks zirkonia agarosa ditentukan berdasar spektra infra merah (FTIR) pada bilangan gelombang 800 – 890 cm⁻¹ yang merupakan serapan karakteristik untuk cincin epoksida (Coates, 2000). Gambar 2 (A) menunjukkan spektra dari *native* agarosa yang tidak menunjukkan serapan kuat pada kisaran bilangan gelombang dibawah 1000 cm⁻¹. Matriks yang telah teraktivasi gugus epoksida (Gambar 2 B) menunjukkan serapan karakteristik epoksida pada bilangan gelombang 844 cm⁻¹.

Perubahan pola spektra dari *native* agarosa (Gambar 2A) pada daerah bilangan gelombang 800 – 890 cm⁻¹ muncul serapan baru pada 844 cm⁻¹ (Gambar 2B) menunjukkan bahwa secara kualitatif, reaksi antara gugus hidroksil agarosa dengan epiklorohidrin telah berhasil membuat gugus epoksida terikat pada matriks. Dalam reaksi ini gugus klorida berlaku sebagai

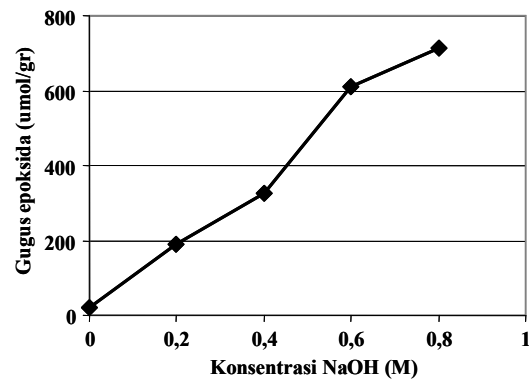
gugus yang terlepas (*leaving group*) (Carr dan Bowers, 1990; Fessenden dan Fessenden, 1986).



Gambar 2. Spektra FTIR dari agarosa (A) dan zirkonia agarosa teraktivasi epoksida (B)

Pengaruh Naoh Terhadap Gugus Epoksida Terikat

Kenaikkan konsentrasi NaOH menyebabkan meningkatnya konsentrasi gugus epoksida dalam matriks (Gambar 3). Hal ini disebabkan basa kuat NaOH dalam sistem reaksi berperan meningkatkan polaritas ikatan O – H dari agarosa yang bermuatan parsial negatif dan atom C sekunder dari epiklorohidrin yang bermuatan parsial positif (Carlsson dkk., 1975; Fessenden dan Fessenden, 1986), yang mendukung terbentuknya ikatan kovalen antara agarosa dan epiklorohidrin. Jadi semakin tinggi konsentrasi NaOH mengakibatkan polaritas ikatan O – H dan O – C semakin besar sehingga mendukung terjadinya reaksi yang menghasilkan epoksida terikat.

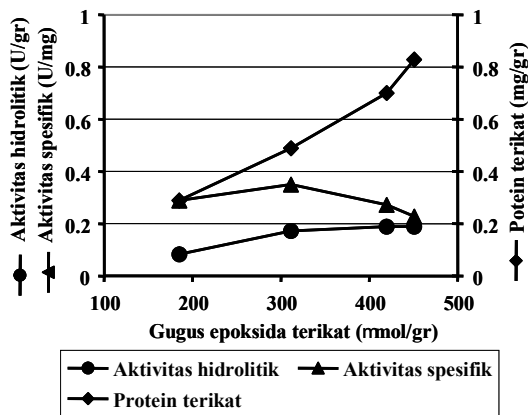


Gambar 3. Pengaruh konsentrasi NaOH terhadap konsentrasi gugus epoksida terikat pada matriks

Pengaruh Gugus Epoksida Terikat Terhadap Protein Terikat dan Aktivitas Lipase Amobil

Total protein yang terikat pada matriks cenderung meningkat dengan kenaikan jumlah gugus epoksida (Gambar 4).

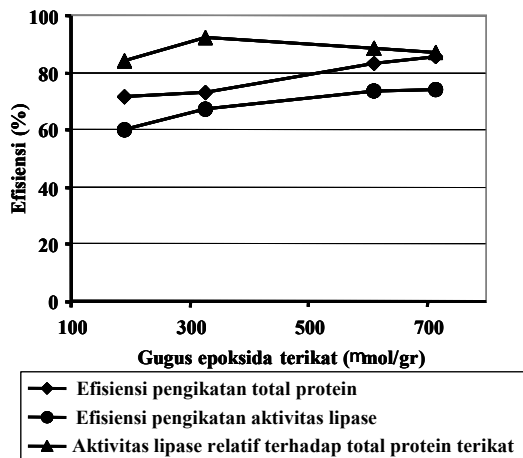
Meskipun total protein terikat tinggi, namun aktivitas spesifik justru menurun. Hal ini disebabkan semakin meningkatnya protein yang terikat pada matriks tidak diikuti oleh kenaikan aktivitas enzim yang cukup tinggi. Aktivitas hidrolitik cenderung konstan dengan meningkatnya ketersediaan gugus epoksida. Hal ini dapat terjadi karena orientasi tertentu dari molekul enzim dan ketersediaan gugus epoksida yang tinggi menyebabkan enzim terikat di banyak titik (Carr dan Bowers, 1990; Matsumoto dan Mizuno, 1978; Mateo dkk., 2000) termasuk meningkatnya probabilitas terikatnya sisi aktif enzim pada gugus epoksi yang berakibat enzim kehilangan aktivitasnya. Aktivitas spesifik yang tertinggi sebesar 0,35 U/mg protein diperoleh pada enzim lipase amobil dengan kandungan gugus epoksida sebanyak 311 $\mu\text{mol/gr}$ matriks.



Gambar 4. Pengaruh gugus epoksida terikat terhadap konsentrasi protein terikat dan lipase amobil

Efisiensi Pengikatan dan Efisiensi Amobilisasi Enzim

Efisiensi terikatnya enzim pada matriks dengan berbagai konsentrasi gugus epoksida terikat ditampilkan dalam Gambar 5. Lipase amobil dengan kandungan gugus epoksida 331 $\mu\text{mol/gr}$ matriks, yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi

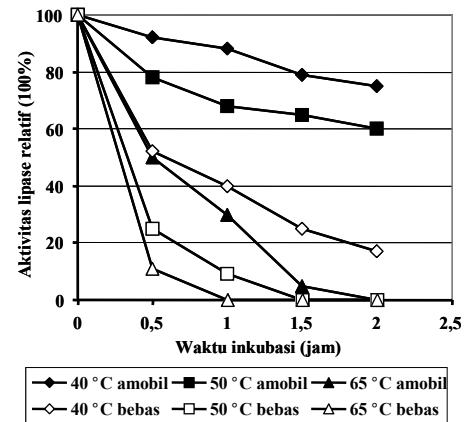


Gambar 5. Pengaruh konsentrasi gugus epoksida pada matriks terhadap efisiensi terikatnya enzim pada matriks

yaitu 0,35 U/mg protein, menunjukkan efisiensi yang tinggi berdasar aktivitas enzim relatif terhadap total enzim terikat pada matriks yaitu sebesar 92,13 %. Sementara itu penurunan aktivitas enzim relatif terhadap total enzim terikat pada matriks yang disebabkan oleh kenaikan gugus epoksida dikarenakan gugus epoksida berlebih mengikat enzim pada banyak titik (Mateo dkk., 2000; Fernandez-Lorente dkk., 2001) termasuk meningkatnya kemungkinan terikatnya gugus aktif enzim.

Stabilitas Thermal Lipase Amobil dan Lipase Bebas

Aktivitas relatif lipase amobil dalam berbagai suhu dibandingkan dengan lipase bebas dengan kondisi yang sama. Secara umum dapat dikatakan bahwa pada kisaran temperatur 40 – 65 °C stabilitas thermal lipase meningkat karena proses amobilisasi (Gambar 6). Dengan amobilisasi, pergerakan molekul enzim dibatasi sehingga tidak mudah terjadi perubahan konformasi yang drastis (Carr dan Bowers, 1990). Namun demikian terjadi penurunan aktivitas yang cukup tajam untuk lipase amobil pada suhu 50 °C dan 65 °C yang mengarah pada denaturasi (Jencks, 1986) menunjukkan lipase amobil telah melampaui batas ketahanannya terhadap suhu.



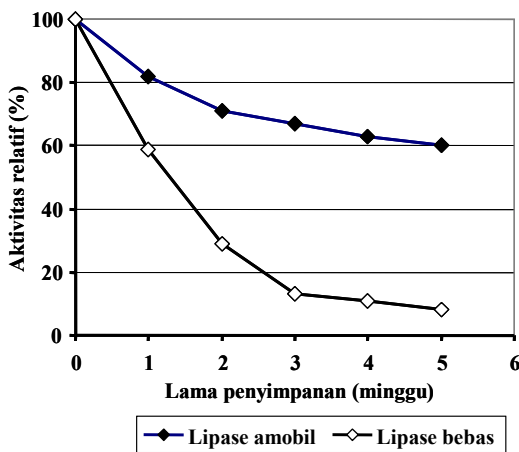
Gambar 6. Stabilitas thermal lipase amobil dan lipase bebas

Stabilitas Lipase Amobil dalam Penyimpanan

Gambar 7 menunjukkan bahwa proses amobilisasi meningkatkan stabilitas lipase dalam penyimpanan. Hasil ini sesuai juga dengan penelitian sebelumnya (Carr dan Bowers, 1990; Wang dkk., 2006; Trevan, 1980). Sedangkan penurunan aktivitas lipase bebas lebih tajam (4,5 kali lebih cepat) dibandingkan dengan lipase amobil. Hal ini disebabkan medium penyimpanan berupa larutan aqueous yang mempunyai kekuatan ion dapat berpengaruh besar terhadap konformasi aktif dari lipase yang dalam keadaan bebas bergerak dapat membentuk konformasi yang inaktif (Deng dkk., 2004; Wang dkk., 2006). Sedangkan lipase dalam keadaan amobil yang aktif dapat mempertahankan konformasi aktifnya karena adanya ikatan enzim – matriks. Selain itu, stabilitas penyimpanan di-

pengaruhi oleh kekuatan ikatan antara enzim dengan matriks. Enzim yang merupakan makromolekul akan terikat lebih kuat bila ikatan kovalen enzim – matriks terbentuk dibanyak titik dalam satu molekul enzim (Dijkstra, 2006). Semakin banyak ikatan terbentuk, stabilitas enzim amobil terhadap *leaching* semakin tinggi tetapi dilain pihak probabilitas terikatnya sisi aktif enzim juga meningkat.

Berdasar plot logaritmik reaksi orde pertama dari penurunan aktivitas lipase amobil selama penyimpanan diperoleh estimasi waktu paruh 7,16 minggu. Waktu paruh enzim amobil berbeda-beda tergantung pada konsentrasi enzim terikat (Herawan, 2004) dan kondisi penyimpanan seperti pH dan suhu (Wang dkk., 2006).

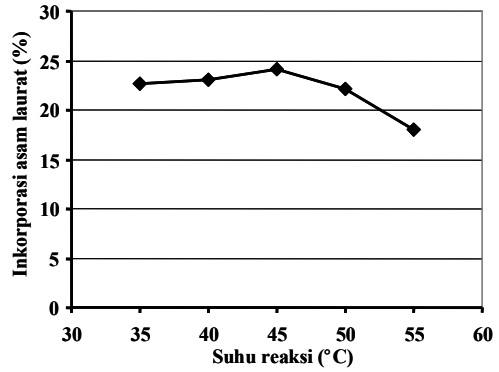


Gambar 7. Stabilitas lipase amobil dan lipase bebas dalam penyimpanan

Pengaruh Suhu Reaksi Asidolisis dan Rasio Substrat Terhadap Inkorporasi Asam Laurat

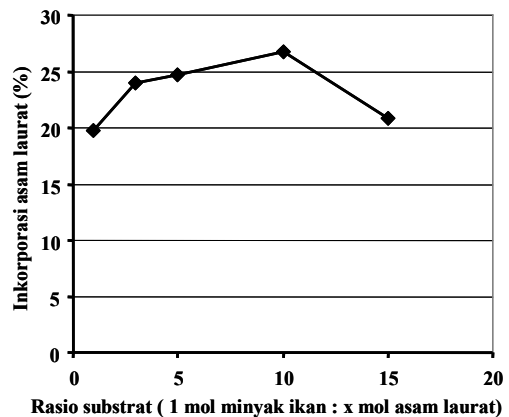
Gambar 8 menunjukkan bahwa hasil inkorporasi asam laurat pada proses asidolisis antara minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai suhu reaksi. Suhu optimum reaksi asidolisis adalah pada suhu 45 °C. Kenaikan suhu reaksi akan menurunkan viskositas sistem campuran reaksi (Rao dkk., 2002) sehingga membantu molekul substrat lebih mudah melakukan mobilisasi. Suhu reaksi juga membantu sistem reaksi mencapai energi aktivasi (Jencks, 1986). Kedua faktor tersebut dapat menyebabkan peningkatan inkorporasi asam laurat. Namun suhu yang terlalu tinggi (55 °C) menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga aktivitasnya turun.

Sedangkan pengaruh rasio substrat dapat dilihat pada Gambar 9. Kenaikan jumlah mol asam laurat dalam rasio substrat sampai 1 : 10 menyebabkan kenaikan kenaikan inkorporasi asam laurat. Hal ini kemungkinan disebabkan asidolisis merupakan proses interesterifikasi yang *reversible* dan hanya membutuhkan 3 mol asam laurat untuk bereaksi dengan 1 mol gliserida. Penggunaan asam laurat dalam jumlah berlebih akan menggeser kesetimbangan reaksi ke arah sintesis. Namun pada peningkatan jumlah mol asam laurat dalam ra-



Gambar 8. Pengaruh suhu asidolisis terhadap inkorporasi asam laurat

sio substrat lebih lanjut (dari 1 : 10 ke 1 : 15) menyebabkan penurunan inkorporasi asam laurat. Hal ini dapat terjadi karena konsentrasi asam lemak bebas yang berlebih menurunkan laju reaksi karena menghambat mekanisme hidrolisis dalam proses transfer gugus asil. Dalam hal ini terjadi inhibisi (Badr, 2005) terhadap aktivitas enzim oleh substrat yang dinyatakan oleh Michaelis–Menten sebagai inhibisi substrat non kompetitif. Tingginya konsentrasi asam lemak bebas akan menghasilkan gugus karboksilat yang terionisasi dan akan meningkatkan keasaman mikroaqueus (Badr, 2005; Dijkstra, 2006) di sekitar enzim atau menyebabkan desorpsi air dari *interface* (Marangoni dan Rousseau, 1995). Hasil inkorporasi maksimum sebesar 26,7 % diperoleh pada rasio mol substrat 1 : 10.



Gambar 9. Pengaruh rasio substrat terhadap inkorporasi asam laurat

Profil Gliserida Hasil Asidolisis

Proses interesterifikasi menyebabkan terjadinya perubahan komposisi monogliserida, digliserida dan trigliserida dari minyak. Bahan dasar minyak ikan terdapat monogliserida sebanyak 14,5 %. Setelah proses interesterifikasi, monogliserida tidak terdeteksi pada produk asidolisis (Tabel 1). Hal ini kemungkinan disebabkan monogliserida yang merupakan produk *intermediate* dengan cepat dapat diubah menjadi dig-

liserida dan trigliserida selama proses (Ghazali dkk., 1995). Asam lemak bebas yang berikatan dengan monogliserida sebagian dari hasil hidrolisis trigliserida sehingga terjadi peningkatan digliserida sebesar 3 kali yang diikuti dengan penurunan trigliserida. Penataan ulang asam-asam lemak penyusun gliserida dalam reaksi interesterifikasi juga dilaporkan oleh peneliti lain (Abigor, dkk, 2003; Christophe, 1995; Ghazali, dkk, 1995; Hammam dan Shahidi, 2005; Kawashima, dkk, 2002; Rao, dkk, 2002). Sedangkan komposisi hasil asidolisis dipengaruhi oleh faktor-faktor lamanya inkubasi (Rao, dkk, 2002) dan rasio substrat (Kawashima, dkk, 2002).

Tabel 1. Profil gliserida dari minyak ikan (bahan dasar) dan lipid termodifikasi hasil asidolisis

	Minyak ikan	Lipid terstruktur
Monogliserida (%)	14,50	ND
Digliserida (%)	15,10	45,48
Trigliserida (%)	70,40	54,52

Rasio mol minyak ikan : asam laurat = 1 : 10, dengan penambahan *molecular sieves* dan lama inkubasi 24 jam pada suhu 45 °C.

KESIMPULAN

Amobilisasi enzim dilakukan dengan metode ikatan kovalen dengan epiklorohidrin sebagai reagen bifungsional yang mengaktivasi matriks zirkonia agarosa untuk dapat mengikat lipase *Candida rugosa* secara kovalen. Aktivitas spesifik yang tertinggi sebesar 0,35 U/mg protein pada enzim lipase amobil dengan kandungan gugus epoksida sebanyak 331 µmol/gr matriks. Efisiensi amobilisasi berdasar aktivitas enzim relatif terhadap total enzim terikat pada matriks sebesar 92,13 %. Estimasi umur simpan lipase amobil hingga aktivitas menurun 50 % adalah 7,16 minggu, dengan kondisi pH 8, pada suhu penyimpanan 4°C. Penggunaan lipase amobil dalam reaksi interesterifikasi antara minyak ikan dengan asam laurat dengan rasio mol minyak ikan : asam laurat = 1 : 10 menghasilkan inkorporasi laurat sebesar 16,7 % dengan suhu reaksi 45 °C dan durasi inkubasi 24 jam. Profil gliserida dari hasil reaksi interesterifikasi adalah 45,48 % trigliserida; 54,52 % digliserida dan tidak terdeteksi adanya monogliserida.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan ditujukan kepada almarhum Prof. Tranggono, Ph.D, atas ide dasar penelitian yang sekarang ini telah dapat diwujudkan.

DAFTAR PUSTAKA

Abigor, R., Marmer, W., Foglia, T., Jones, K., DiCiccio, R., Ashby, R. dan Uadia, P. (2003). Production of cocoa

butter-like fats by the lipase-catalyzed interesterification of palm oil and hydrogenated soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **80**: 1193-1196.

Badr, A. (2005). *Studies on Enzymatic Synthesis of Natural Ethyl Acetate in Non-Conventional Media*. Ph.D Dissertation, Reseach Institute of Chemical and Process Engineering, Vespren

Bezbradica, R., Karalazic, I., Ognjanovic, N. dan Mijin, D. (2006). Studies on specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media, *Journal of the Serbian Chemical Society* **71**: 31-41.

Cardias, H.C.T., Grininger, C.C., Trevisan, H.C., Guisan, J.M. dan Giordano, R.I.C. (1999). Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **16**: 141-148.

Carlsson, J., Axen, R. dan Unge, T. (1975). Reversible, covalent immobilization of enzymes by thiol-disulphide interchange. *European Journal of Biochemistry* **59**: 567-572.

Carr, P. dan Bowers, L. (1990). *Immobilized Enzyme in Analytical and Clinical Chemistry: Fundamental and Application*. Wiley-Interscience Publication, New York.

Castro, H.F., Silva, M.L.C.P. dan Silva, G.L.J.P. (2000). Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **17**: 4-7.

Chibata, I. (1978). *Immobilized Enzyme*. Halsted Press Book, New York

Christophe, A. (1995). *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*. AOCS Press, Illinois

Coates, J. (2000). *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley and Sons Ltd, Chichester

Deng, H., Xu, K., Liu, Z., Wu, J. dan Ye, P. (2004). Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides. *Enzyme and Microbial Technology* **35**: 437-443.

Dijkstra, Z. (2006). *The Potential of Enzymatic Catalysis in Supercritical Fluids*. Ph.D. Dissertation, Eindhoven University of Technology

Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S. (1986). *Organic Chemistry*. Wadsworth, USA

Gaur, R., Pant, H., Jain, R. dan Khare, S.K. (2006). Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Asper-*

- gillus oryzae* β -galactosidas. *Food Chemistry* **97**: 426-430.
- Ghazali, H.M., Hamidah, S. dan Che Man, Y.B. (1995). Enzymatic transesterification of Palm Olein with non specific and 1,3 – specific lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72**: 633 – 639.
- Hamam, F. dan Shahidi, F. (2005). Structured lipids from high-laurate canola oil and long-chain omega-3 fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **82**: 731-736.
- Hansen, T.T. dan Eigtved, P. (1985). A new immobilized lipase for oil and fat modification. *AOCS Proceeding* 365-369.
- Herawan, T. (2004). *Lipase-Catalized Transesterification of Plat Oils with Dialkyl Carbonates*. Ph.D. Disertation, Von der Fakultat fur Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch – Westfalischen Technischen Hochschule Aachen.
- Hidayat, C., Nakajima, M., Takagi, M. dan Yoshida, M. (2003). Development of new dye metal Agarose-coated alumina matrix and elution strategy for purification of Alcohol dehydrogenase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**: 133-138.
- IUPAC. (1995). Classification and chemical characteristics of immobilized enzyme (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **67**: 597-600.
- Jay, R.R., Lucas, H.L. dan Pressman, D. (1964). Direct titration epoxy compound. *Analytical Chemistry* **36**: 667-668.
- Jencks, W.P. (1986). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. Dover, New York.
- Maia, M. de M.D., Morais, M.M.C., Morais Jr, M.A. dan Melo, E.H.M. (1999). Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium Solani* FS1. *Revista de Microbiologia* **30**: 304-309.
- Kawashima, A., Shimada, Y., Nagao, T., Ohara, A., Matsuhisa, T., Sugihara, A. dan Tominaga, Y. (2003). Production of structured TAG Rich in 1,3-Dicaproyl-2- γ -linolenoyl glycerol from borage oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **79**: 867-872.
- Lorente, G.F, Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Lafuente, R.F., Dalmases, P., Hugueta, J. dan Guisan. (2001). Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* **28**: 389-396.
- Marangoni, A.G. dan Rousseau, D. (1995). Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends in Food Science and Technology* **6**: 329-335.
- Marseno, D., Indrati, R. dan Ohta, Y. (1998). A Simplified method for determination of free fatty acids for soluble and immobilized lipase assay. *Indonesian Food and Nutrition Progress* **5**: 79-84.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez, R. dan Guisan (2000). Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy - activated support by favoring additional multipoint covalent attachment. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* **26**: 509-515.
- Matsumoto, I. dan Mizuno, I. (1978). Activation of sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent. *Journal of Biochemistry* **85**: 1091-1098.
- Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., Murata, A., Kome-mushi, S. dan Tominaga, Y. (2001). Use of thermostable *Fusarium heterosporum* lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in organic solvent-free system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**: 167-172.
- Rao, R.B. Manohar, K., Sambiah dan Lokesh, B.R. (2002). Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil: Optimization of reactions by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**: 885-890.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Kawashima, A., Akimoto, K., Fujikawa, S., Tominaga, Y. dan Sugihara, A. (2003). Enzymatic fractionation and enrichment of n-9 PUFA. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **80**: 37-42.
- Soumanou, M.M., Borncheuer, U.T. dan Schmid, R.D. (1998). Two-step enzymatic reaction for synthesis of pure structured triacylglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**: 703-710.
- Trevan, M.D. (1980). *Immobilized Enzyme, An Introduction and Application in Biotechnology*. Wiley, New York
- Trevisan, C.H., Bergamo, E.P., Contiero, J., Hojo, O. dan Monti, R. (1997). β -Galaktosidase immobilization on controlled pore silica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **14**, doi: 10.1590/S0104-66321997000400003.
- Wang, T., Li, H., Nie, K. dan Tan, T. (2006). Immobilization of lipase on epoxy activated (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucan isolated from *Penicillium chrysogenum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **70**: 2883-2888.
- Zaborsky, O.R. (1973). *Immobilized Enzymes*. CRC Press, Claveland.