

## Optimasi Ekstraksi Lipid dari *Spirulina platensis* Menggunakan Tekanan Osmotik dengan Bantuan Gelombang Ultrasonik dan Produksi Metil Esternya Secara Enzimatis

*Optimization of Lipid Extraction from *Spirulina platensis* Using Osmotic Pressure Assisted by Ultrasonic Wave and Its Enzymatic Production of Methyl Ester*

Indrawan Adhy Pramono<sup>1\*</sup>, Winarto Haryadi<sup>2\*</sup>, Tri Joko Raharjo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UGM

<sup>2</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UGM

email: [indrawan\\_adhy@yahoo.com](mailto:indrawan_adhy@yahoo.com), telp./fax: 085640094778

email: [wnrt\\_haryadi@ugm.ac.id](mailto:wnrt_haryadi@ugm.ac.id), telp./fax: 085878620700

### Abstrak

Biodiesel dapat diproduksi dari lipid *Spirulina platensis* yang diekstraksi menggunakan cara kimiawi yaitu tekanan osmotik dengan bantuan gelombang ultrasonik yang dapat memecah membran semi permeabel sel. Ekstraksi menggunakan larutan NaCl pada berbagai konsentrasi dan pH larutan dengan bantuan gelombang ultrasonik. Lipid yang diperoleh pada kondisi optimum ekstraksi kemudian dikonversi menjadi biodiesel melalui reaksi transesterifikasi dengan katalis lipase pada aktivitas optimumnya. Enzim lipase diekstraksi dari biji wijen (*Sesamum indicum L.*) disertai pengukuran aktivitas dan kinetika reaksi esterifikasi berdasarkan variasi perbandingan mol substrat dan persentase penambahan enzim.

Hasil penelitian menunjukkan rendemen lipid optimum diperoleh saat ekstraksi menggunakan konsentrasi NaCl 20% yaitu sebesar 1,49% dan pada larutan dengan pH 2 sebesar 1,64%. Ekstrak lipase dari biji wijen memiliki aktivitas spesifik terukur sebesar 0,1042 U/mg protein dengan perbandingan mol substrat asam palmitat:metanol 1:2 dan penambahan enzim sebanyak 40% dari berat substrat. Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  terhadap ekstrak lipase tersebut secara berurutan sebesar 1,506  $\mu\text{mol}$  dan 0,02  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ . Rendemen biodiesel yang diperoleh dari konversi lipid hasil ekstraksi menggunakan larutan NaCl dan asam dengan bantuan ultrasonik masing-masing sebesar 68,61 dan 60,37%.

**Kata kunci:** *Spirulina platensis*, tekanan osmotik, ultrasonik, biji wijen, lipase.

### Abstract

Biodiesel can be produced from lipid of *Spirulina platensis* that can be extracted via osmotic pressure assisted ultrasonic wave to break down the membrane cell. Extraction using a solution of NaCl at various concentrations and pH of the solution with the assistance of the ultrasonic wave. Lipid obtained at the optimum condition of extraction is converted into biodiesel through transesterification with lipase catalyst at its optimum activity. Lipase extracted from sesame seeds (*Sesamum indicum L.*) with measurement of activity and kinetics of the esterification reaction based on variations in the mole ratio of substrate and enzyme additions percentage.

The results showed that the rendement of optimum lipid obtained using 20% NaCl concentration is 1.49% and in a solution with a pH 2 is 1.64%. Lipase extract from sesame seeds have a measurable, specific activity of 0.1042 U/mg protein with a mole ratio of palmitic acid substrate to methanol of 1:2 and the addition of enzyme as much as 40% of the weight of the substrate.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for the lipase extract are 1.506  $\mu\text{mol}$  and 0.02  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , respectively. The yield of biodiesel obtained from the conversion of lipid using a solution of NaCl and acid assisted with the ultrasonic wave 68.61 and 60.37%, respectively.

**Keywords:** *Spirulina platensis*, osmotic shock, ultrasonic, sesame seeds, lipase.

## 1. Pendahuluan

Keterbatasan sumber energi dari bahan bakar fosil telah mendorong banyaknya penelitian mengenai diversifikasi energi melalui pemanfaatan bahan baku terbarukan (*renewable*). Mikroalga merupakan salah satu biomassa yang dapat dijadikan sebagai bahan baku energi terbarukan seperti biodiesel. *Spirulina platensis*, salah satu jenis *cyanobacteria*/alga hijau biru yang mudah dikembangbiakkan dibandingkan jenis mikroalga lainnya karena reproduksinya mudah dan memiliki produktifitas yang tinggi (Kilic dkk., 2006). Selain itu, mikroalga jenis ini mampu menghasilkan lipid yang lebih banyak pada kondisi lingkungan yang ekstrim sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel. Untuk mendapatkan lipid tersebut maka diperlukan metode ekstraksi yang bermanfaat terhadap aspek lingkungan dan biaya yaitu dengan prinsip tekanan osmotik (Adam dkk., 2012).

Ekstraksi dengan tekanan osmotik telah dilakukan oleh beberapa peneliti menggunakan larutan NaCl, asam dan basa. Prabakaran dan Ravindran (2011) serta Lee dkk. (2010) melakukan ekstraksi lipid terhadap beberapa jenis mikroalga menggunakan metode tekanan osmotik dengan larutan NaCl 10%. Selain itu, Duraiarasan dan Vijay (2014) juga melakukan ekstraksi lipid dari mikroalga *Nannochloropsis oculata* menggunakan larutan NaCl 40% dan asam pada pH 2. Akan tetapi, penggunaan metode ini memerlukan waktu yang lama untuk perlakuannya dengan hasil yang kurang optimum. Selama proses ekstraksi, gelombang ultrasonik dapat digunakan untuk membantu mempercepat reaksi karena efek yang ditimbulkan mampu memberi efek kavitasi, efek panas, dan efek struktural yang membuat penetrasi zat terlarut ke dalam sel terjadi lebih cepat. Metode ini sudah dilakukan oleh Putri dkk. (2014) terhadap mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan HCl 5 M yang divariasikan waktu sonikasinya. Pada penelitian tersebut diperoleh kesimpulan bahwa penerapan gelombang ultrasonik tidak memberikan perbedaan hasil ekstraksi minyak *Chlorella sp.* yang signifikan apabila dibandingkan dengan pengadukan manual.

Biodiesel merupakan senyawa kimia metil ester yang diperoleh melalui reaksi transesterifikasi antara lipid (trigliserida) dengan metanol dan suatu katalis untuk mempercepat laju reaksinya. Reaksi secara enzimatik lebih menarik karena hasil reaksi yang diperoleh lebih berkualitas, kondisi reaksi yang lembut dan memiliki resiko yang kecil terhadap dampak lingkungan. Salah satu sumber lipase adalah biji wijen (*Sesamum indicum L.*). Pemanfaatan biji wijen sebagai lipase telah dilakukan oleh Arbianti dkk. (2008) untuk reaksi esterifikasi gliserol dengan asam laurat selama 18 jam pada pembuatan agen pengemulsi lesitin dan Suhendra dkk. (2006) melakukan ekstraksi lipase dari biji wijen yang telah dikecambahkan diperoleh nilai respon hidrolisis mencapai 6  $\mu\text{mol}$  FFA/menit dan nilai respon esterifikasi 7  $\mu\text{mol}$  FFA. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah optimalisasi ekstraksi lipid dari *Spirulina platensis* (*S. platensis*) dengan metode tekanan osmotik menggunakan bantuan gelombang ultrasonik dalam larutan NaCl dan asam yang divariasikan konsentrasinya serta penggunaan biokatalis enzim lipase dari biji wijen (*S. indicum L.*) untuk reaksi transesterifikasinya.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Alat

*Ultrasonic bath* merk Branson 47 kHz, Soxhlet, buret, vortek, sentrifuge Beckmen, evaporator Buchi, mikroskop fluoresen VanGuard 1282 ECM, kromatografi gas-spektrofotometer massa (GC-MS, Shimadzu QP-2010S), Shimadzu UV-1800 *spectrophotometer*, *shaker incubator*.

### 2.2 Bahan

*Spirulina platensis* basah dan kering diperoleh dari BBPBAP Jepara, biji wijen, asam palmitat, akuades, NaOH, HCl, NaCl, n-heksana, kloroform, metanol, aseton, sukrosa, KCl, EDTA, MgCl<sub>2</sub>, *Bovine Serum Albumine* (BSA), reagen *nile red*, reagen biuret, piridin, Cu(II) asetat, buffer fosfat 0,15 M pH 7,5, alkohol netral 95%, indikator pp.

### 2.3 Prosedur Kerja

#### Analisis *Spirulina platensis*

Bahan baku mikroalga dianalisa kadar air, kadar lipid, dan deteksi lipid melalui pewarnaan menggunakan reagen *nile red*.

#### Penentuan waktu ekstraksi lipid dengan sonikator dalam larutan air

Satu gram biomassa basah dalam 10 mL air diekstraksi dengan waktu 0 atau tanpa ultrasonik, 5, 10, 15, 20 dan 25 menit menggunakan *sonicator bath*. Selanjutnya, rendemen dihitung untuk menentukan waktu optimumnya. Waktu optimum yang diperoleh kemudian digunakan untuk ekstraksi dengan pelarut kloroform:metanol (2:1) dengan langkah kerja yang sama sebagai pembanding

#### Ekstraksi lipid menggunakan metode tekanan osmotik dengan bantuan ultrasonik

Mikroalga basah masing-masing sebanyak 1 g dalam 10 mL larutan NaCl (0, 10, 20, 30, dan 40%) dan larutan asam (pH 2, 3, 4, 5, dan 7) diekstraksi dengan bantuan ultrasonik pada waktu optimum berdasarkan penelitian sebelumnya. Rendemen lipid tertinggi berdasarkan tiap variasi tersebut dikonversi menjadi metil ester melalui reaksi transesterifikasi menggunakan katalis enzim lipase.

#### Isolasi enzim lipase dari biji wijen

Biji wijen dihaluskan dan dihomogenisasi selama 10 menit dengan 0,15 M larutan buffer fosfat pH 7,5 dingin (5 mL/g berat wijen) yang di dalamnya terkandung 0,6 M sukrosa, 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Homogenat yang diperoleh kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 4 °C. Lapisan supernatan digunakan untuk pengujian aktivitas esterifikasi lipase. Ekstrak enzim lipase disimpan pada suhu 4 °C selama menunggu dilakukan pengujian.

#### Penentuan kandungan protein lipase

Kurva standar BSA dibuat dengan menggunakan larutan BSA. Konsentrasi yang dibutuhkan adalah 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 mg/mL. Variasi konsentrasi tersebut dibuat dengan menggunakan larutan standar BSA 20 mg/mL, larutan tersebut diambil sebanyak 1; 2; 3; 4; 5; 6 mL lalu diencerkan dengan buffer fosfat sampai 10 mL. Selanjutnya larutan tersebut diambil sebanyak 7 mL dan ditambah 3 mL reagen biuret. Selanjutnya divortek dan didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Blanko yang digunakan adalah larutan buffer fosfat sebanyak 7 mL yang ditambah 3 mL reagen biuret.

Kandungan protein sampel diukur dengan menambahkan reagen biuret 3 mL ke dalam 7 mL sampel, lalu campuran divortek dan didiamkan selama 20 menit. Campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm sebanyak dua kali. Hasil absorbansi yang diperoleh dikonversikan pada persamaan garis dari kurva standar BSA yang telah dibuat sehingga diperoleh konsentrasi protein enzim lipase.

### **Uji aktivitas lipase**

#### **Penentuan panjang gelombang maksimum Cu(II)asetat/piridin**

Larutan stok asam palmitat 5 mM sebanyak 4 mL ditambah 1 mL reagen Cu(II)asetat/piridin. Campuran tersebut divortek selama 90 detik dan disentrifuge 5 menit. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 600-800 nm sebanyak tiga kali sehingga diperoleh  $\lambda_{maks}$  yang digunakan untuk pengukuran selanjutnya. Larutan blanko menggunakan n-heksana sebanyak 4 mL ditambah 1 mL reagen Cu(II)asetat/piridin.

#### **Pembuatan kurva standar asam palmitat**

Konsentrasi asam palmitat yang dibutuhkan adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 mM. Variasi konsentrasi larutan tersebut dibuat dengan larutan standar asam palmitat 10 mM, larutan tersebut diambil sebanyak 2; 4; 6; 8; 10 mL lalu diencerkan dengan n-heksana sampai 10 mL. Selanjutnya campuran diambil 4 mL dan ditambahkan reagen Cu(II)asetat/piridin sebanyak 1 mL lalu divortek 90 detik dan disentrifuge 5 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{maks}$  hasil pengukuran.

#### **Penentuan aktivitas lipase**

Penentuan Aktivitas lipase terhadap reaksi esterifikasi yang pertama dilakukan yaitu variasi perbandingan mmol substrat metanol:asam palmitat (1:1; 2:1; 3:1; 4:1 dan 5:1). Asam palmitat 0,1 mmol (25,642 mg) dilarutkan dalam 20 mL n-heksana. Metanol ditambahkan sesuai dengan variasi mmol. Campuran ditambah ekstrak lipase sebanyak 100 % volume substrat dan diinkubasi pada inkubator bergoyang pada suhu 37 °C selama 18 jam. Campuran sebelum dan sesudah reaksi esterifikasi diambil sebanyak 4 mL dan ditambahkan 1 mL reagen Cu(II)asetat/piridin. Campuran divortek selama 90 detik dan disentrifuge serta dilanjutkan pengukuran konsentrasi asam palmitat menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda_{maks}$ . Variasi mol metanol juga digunakan untuk menentukan kinetika reaksi enzimatik ( $K_m$  dan  $V_{maks}$ ). Penentuan aktivitas lipase dilanjutkan dengan variasi penambahan enzim lipase (20, 40, 60, 80, dan 100 %) terhadap variasi substrat yang memiliki aktivitas lipase tertinggi dan langkah kerja yang dilakukan sama dengan penentuan aktivitas sebelumnya.

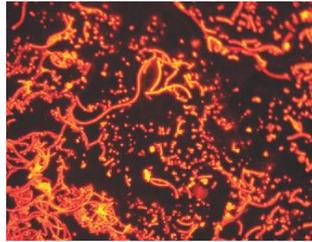
#### **Konversi lipid menjadi metil ester secara enzimatik**

Lipid *S. platensis* sebanyak 10 mg (hitung jumlah mol lipid) masing-masing berasal dari kondisi optimal hasil ekstraksi pada variasi pH dan NaCl kemudian dilarutkan dengan n-heksana sebanyak 20 mL. Sejumlah metanol dan ekstrak lipase ditambahkan ke dalam campuran reaksi berdasarkan kondisi terbaik perbandingan mol substrat dan persentase penambahan ekstrak lipase. Campuran diinkubasi dengan inkubator bergoyang pada suhu 37 °C selama 18 jam. Hasil transesterifikasi ditambahkan akuades sehingga terbentuk 2 lapisan, lapisan atas merupakan metil ester yang terlarut pada n-heksana. Rendemen dihitung dengan membandingkan jumlah metil ester terhadap lipid. Komposisi metil ester dianalisis dengan GC-MS.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1 Analisis *Spirulina platensis*

Analisis kadar air terhadap *S. platensis* dilakukan dengan metode termogravimetri dan diperoleh kadar air pada penelitian ini sebesar 88,08%. Reagen pewarna 9-dietilamino-5-H-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazine-5-on atau disebut juga *Nile Red* adalah pewarna fluoresens terhadap lipid terlarut yang dapat digunakan untuk menganalisis kandungan lipid pada sel hewan dan mikroorganisme seperti mikroalga (Bertozzini dkk., 2011). Gambar 1 menunjukkan biomassa dari sel *S. platensis* yang diuji dengan reagen *Nile Red*.



**Gambar 1.** Pewarnaan *nile red* terhadap *S. platensis* dengan mikroskop fluoresens

Pada biomassa terlihat adanya sedikit perpendaran warna kuning di bawah mikroskop fluoresen dan didominasi adanya warna merah. Hal ini mengindikasikan bahwa dalam biomassa tersebut tidak terlalu banyak mengandung lipid netral. Perpendaran warna merah menunjukkan bagian dari sel yang tidak terkena noda dari *Nile Red* karena sifatnya yang polar dan memiliki range panjang gelombang  $>590$  nm. Bagian yang bersifat polar dapat berupa lipid polar maupun pigmen dari *S. platensis* (klorofil dan fikosianin). Penelitian kadar lipid menggunakan metode Folch (Folch dkk., 1957) sehingga mampu mengekstrak semua jenis lipid. Dari hasil analisa dapat diketahui bahwa kandungan lipidnya sebesar 10,68% dan hasil ini sesuai dengan data penelitian dari Dragone dkk. (2010) yang menunjukkan kandungan total lipid Cyanobacterium *Spirulina sp.* antara 4-11% berat.

#### 3.2 Penentuan Waktu Ekstraksi Lipid dengan Sonikator dalam Pelarut Air

Lama waktu sonikasi memiliki pengaruh terhadap hasil ekstraksi lipid yang optimum. Tabel 1 menunjukkan seiring dengan peningkatan waktu ekstraksi maka rendemen yang dihasilkan akan semakin besar. Namun, peningkatan rendemen lipid terlihat lebih signifikan pada waktu sonikasi selama 20 menit yang dibandingkan dengan waktu sonikasi sebelumnya meskipun waktu sonikasi selama 25 menit adalah yang terbaik sehingga waktu sonikasi yang akan digunakan untuk proses ekstraksi selanjutnya adalah 20 menit.

**Tabel 1.** Pengaruh waktu sonikasi terhadap rendemen lipid yang terekstraksi dengan pelarut air

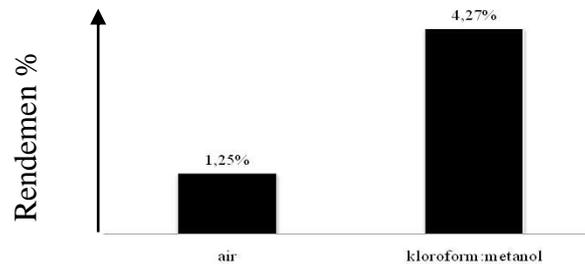
Waktu (menit)	Berat lipid (mg)	Rendemen (%)
0	2,67	0,27
5	3,70	0,37
10	5,57	0,56
15	7,06	0,71
20	12,50	1,25
25	16,10	1,61

Hal tersebut terjadi karena semakin lamanya waktu sonikasi akan meningkatkan suhu reaksi dan menaikkan tekanan uap dalam medium sehingga efek kavitasasi akan mudah

terbentuk tetapi pada suhu yang terlalu tinggi, gelembung-gelembung dihasilkan secara bersamaan. Hal ini dapat menjadi *barrier* (penghalang) transmisi suara yang masuk ke media sehingga mengurangi efektifitas ultrasonik (Siti, 2004).

### 3.3 Penentuan Kadar Lipid dengan Sonikator dalam Pelarut Kloroform:Metanol

Penelitian selanjutnya adalah membandingkan hasil ekstraksi lipid menggunakan metode *Folch* dengan waktu sonikasi 20 menit. Pelarut yang digunakan adalah metanol untuk mengikat lipid polar dan pelarut kloroform untuk mengikat tidak hanya senyawa lipid netral tetapi juga menarik pigmen warna pada mikroalga (Kawaroe dkk., 2012) dengan perbandingan kloroform-metanol (2:1). Hasil ekstrak lipid dengan pelarut kloroform-metanol memberikan hasil yang lebih tinggi apabila dibanding proses ekstraksi menggunakan pelarut air seperti terlihat pada Gambar 2.



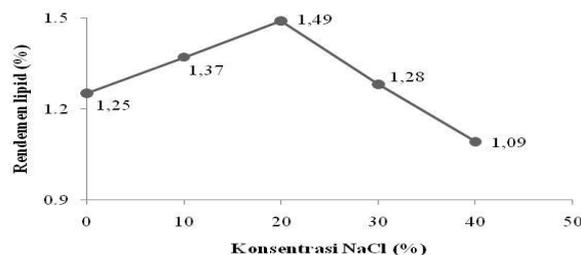
**Gambar 2.** Pengaruh jenis pelarut terhadap rendemen lipid yang terekstraksi dengan sonikator

Ekstraksi lipid dengan pelarut air lebih sedikit karena pelarut air bersifat polar sehingga hanya mampu untuk mengikat lipid polar (fosfolipid, glikolipid dan kolesterol) meskipun lipid jenis ini memiliki porsi yang lebih besar dari seluruh kandungan lipid dalam mikroalga (Volkman dan Jeffrey, 1989; Seto dan Kumasaka, 1992; Fredriksson dan Elwinger, 2006). Selain itu, viskositas dan tegangan permukaan yang tinggi dapat menyebabkan kavitasi sulit terbentuk sehingga efisiensi proses menjadi berkurang (Mason, 1992).

### 3.4 Ekstraksi Lipid Menggunakan Metode Tekanan Osmotik dengan Bantuan Ultrasonik

#### Penentuan kadar lipid optimum berdasarkan variasi konsentrasi larutan NaCl

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan melakukan analisis pengaruh konsentrasi larutan NaCl terhadap persentase lipid yang terekstraksi. Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi NaCl yaitu 0, 10, 20, 30, dan 40% yang dibantu dengan tenaga ultrasonik dari *sonicator bath* sebagai pengganti pengadukan secara manual. Rendemen lipid dari penggunaan larutan NaCl ditunjukkan sebagai grafik pada Gambar 3.

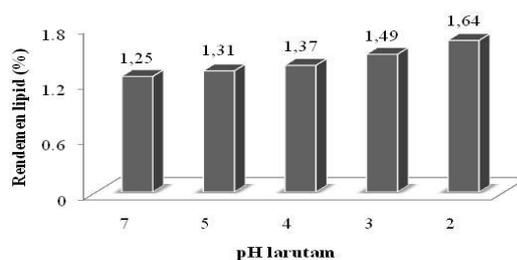


**Gambar 3.** Pengaruh konsentrasi larutan NaCl terhadap rendemen lipid pada *S. platensis* yang terekstraksi

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa konsentrasi NaCl berpengaruh terhadap rendemen lipid yang diperoleh dengan hasil optimal saat konsentrasi NaCl sebesar 20%. Proses osmotik dengan NaCl untuk mendapatkan lipid dapat terjadi karena terganggunya aktivitas sel akibat perbedaan konsentrasi garamnya. Namun, lipid yang diperoleh mengalami penurunan pada konsentrasi 30% dan 40% karena berhubungan dengan viskositas dari larutan osmotik. Viskositas berbanding lurus dengan konsentrasi larutan karena konsentrasi larutan dinyatakan sebagai banyaknya partikel zat terlarut tiap satuan volume sehingga banyaknya partikel yang terlarut menyebabkan gesekan antar partikel semakin tinggi dan viskositasnya semakin tinggi pula. Viskositas yang tinggi membuat kavitasi akan semakin sulit terbentuk, sehingga efisiensi proses sonikasi menjadi berkurang.

### Penentuan kadar lipid optimum berdasarkan variasi pH larutan

Proses ekstraksi lipid selanjutnya dengan menggunakan air yang divariasikan pH-nya menggunakan HCl. Adapun variabel penelitian yang diteliti adalah pengaruh pH larutan (2, 3, 4, 5, dan 7) terhadap jumlah lipid yang dihasilkan. Metode ekstraksi yang digunakan masih sama dengan penelitian sebelumnya yaitu tekanan osmotik dibantu gelombang ultrasonik dari *sonicator bath*. Perolehan rendemen dari ekstraksi dengan variasi pH larutan dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Pengaruh pH larutan terhadap rendemen lipid *S. platensis* yang terekstraksi

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut asam menunjukkan peningkatan rendemen lipid sejalan dengan peningkatan pH larutan yang digunakan. Tingginya kandungan asam (zat terlarut) dalam pelarut akan mempengaruhi tekanan osmotik sel *S. platensis*. Rendemen optimum diperoleh pada penggunaan larutan dengan pH 2 yaitu sebesar 1,64%. Selain berpengaruh pada tekanan osmotik, penelitian oleh Zemke-White dkk. (2000) terhadap 4 jenis makroalga diperoleh kesimpulan bahwa proses osmosis pada pH 2 selama 60 menit menyebabkan ukuran pori dinding sel keempat spesies alga meningkat menjadi 13,5 nm dari ukuran normalnya yaitu 8,8 nm. Ukuran pori dinding sel yang melebar mengakibatkan selnya rentan rusak atau pecah terlebih apabila terkena efek kavitasi dari gelombang ultrasonik sehingga akan meningkatkan rendemen yang diinginkan.

## 3.5 Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Lipase dari Biji Wijen

### 3.5.1 Produksi dan karakterisasi lipase

Isolasi enzim dilakukan dengan metode ekstraksi yang bertujuan untuk mengeluarkan enzim dari dalam sel-sel jaringan biji wijen. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dipisahkan sebagai ekstrak kasar lipase. Ekstrak kasar umumnya mempunyai aktivitas yang rendah karena enzim ini masih merupakan campuran dari beberapa enzim dan kemungkinan masih mengandung senyawa-senyawa yang bukan enzim. Karakterisasi

lipase dilakukan dengan menentukan kandungan proteinnya dan aktivitas lipase terhadap reaksi esterifikasi secara spektrofotometri.

Kandungan protein di dalam enzim sangat berpengaruh terhadap daya katalitik enzim tersebut. Pada umumnya dengan meningkatnya kadar protein dalam suatu enzim, maka daya katalitiknya akan meningkat. Penelitian ini menggunakan metode Biuret untuk menentukan kadar protein lipase dari biji wijen. Pengukuran untuk larutan enzim dilakukan sebanyak dua kali dan didapatkan nilai absorbansi yaitu 0,173 dan 0,172 dengan nilai rata-rata 0,173.

Hasil absorbansi yang diperoleh dikonversikan pada persamaan garis dari kurva standar BSA yang telah dibuat sehingga diperoleh konsentrasi protein enzim lipase yang terukur sebesar 3,943 mg/mL. Kandungan protein yang tinggi diduga menunjukkan enzim yang tinggi pula, namun enzim yang terbentuk belum dapat dipastikan merupakan lipase. Untuk mengetahui protein tersebut adalah lipase maka perlu diketahui aktivitasnya dan hubungan antara aktivitas lipase dan protein yang dihasilkan dinyatakan sebagai aktivitas spesifik.

### 3.5.2 Aktivitas esterifikasi ekstrak kasar lipase

Penentuan aktivitas enzim lipase terhadap reaksi esterifikasi dilakukan secara kolorimetri menggunakan reagen kupri(II)asetat/piridin. Asam lemak akan membentuk kompleks garam/sabun kupri berwarna biru oleh  $\text{Cu}^{2+}$  yang dapat diserap oleh spektrofotometer tampak pada  $\lambda_{\text{maks}} = 706 \text{ nm}$ . Aktivitas enzim lipase diukur berdasar pada berkurangnya konsentrasi asam lemak (asam palmitat) yang telah bereaksi menjadi ester oleh katalis lipase ekstrak biji wijen dengan mengkonversi absorbansi yang diperoleh terhadap persamaan regresi dari kurva standar asam palmitat yang telah dipersiapkan. Aktivitas enzim lipase dinyatakan dalam unit. Satu unit didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk mengubah 1  $\mu\text{mol}$  asam palmitat menjadi ester tiap menit.

### 3.5.3 Penentuan aktivitas lipase didasarkan pada perbandingan mol substrat dan kinetika reaksi esterifikasinya

Hasil perhitungan yang ditampilkan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim lipase yang dihasilkan dari biji wijen tercapai saat perbandingan mol reaktan 1:2 dan menurun dengan perbandingan yang lebih besar.

**Tabel 2.** Aktivitas lipase pada variasi mol reaktan

Perbandingan Mol Reaktan (as. palmitat:methanol)	Aktivitas Lipase	
	Aktivitas (U/mL enzim)	Aktivitas Spesifik (U/mg protein)
1:1	0,4886	0,1239
1:2	0,4990	0,1265
1:3	0,4723	0,1198
1:4	0,3508	0,0889
1:5	0,2927	0,0742

Konsentrasi substrat yang tinggi akan menghasilkan jumlah produk yang besar sampai pada konsentrasi substrat tertentu. Kecepatan reaksi setelah itu akan mencapai maksimum dan tidak meningkat lagi karena enzim menjadi jenuh terhadap substrat (Lehninger, 1995). Selain itu, dalam suatu literatur menyatakan bahwa reaksi dengan pelarut organik memerlukan sejumlah alkohol berlebih untuk mendapatkan laju reaksi dan hasil *Fatty Acid Alkyl Esters* yang diharapkan tetapi alkohol yang terlalu berlebih dapat menyebabkan

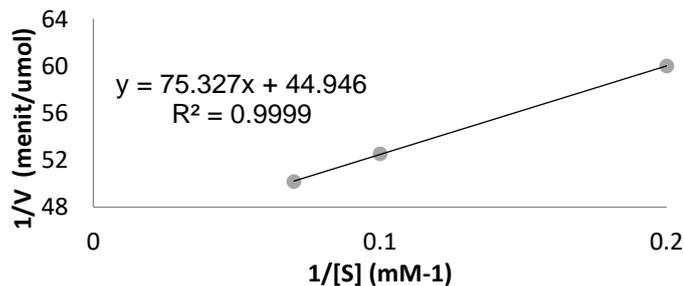
penghambatan atau deaktivasi kerja enzim karena enzim terlapisi oleh alkohol (Antczak dkk., 2009).

$V_{maks}$  merupakan salah satu parameter kinetika enzim (Wiesman, 1989). Parameter kinetika enzim yang lain adalah konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ). Menurut Fox (1991), nilai  $K_m$  menentukan ukuran afinitas enzim-substrat (E-S), yang merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks E-S atau suatu tetapan keseimbangan untuk disosiasi kompleks E-S menjadi E dan S. Nilai  $K_m$  kecil berarti kompleks E-S mantap, afinitas enzim tinggi terhadap substrat, sedangkan bila  $K_m$  besar berlaku kebalikannya.

Penentuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  didasarkan atas persamaan garis regresi grafik hubungan antara  $1/[S]$  dan  $1/V$  (Tabel 2), seperti disajikan pada Gambar 5. Selanjutnya dari persamaan regresi  $Y = 75,32 x + 44,94$  maka diperoleh  $1/V_{maks} = 44,94$  sehingga  $V_{maks} = 0,02 \mu\text{mol}/\text{menit}$  dan  $K_m/V_{maks} = 75,32$  sehingga  $K_m = 1,506 \mu\text{mol}$ .

**Tabel 3.** Nilai  $1/[S]$  dan  $1/V$  dari substrat methanol yang divariasikan terhadap konsentrasi FAME yang dihasilkan

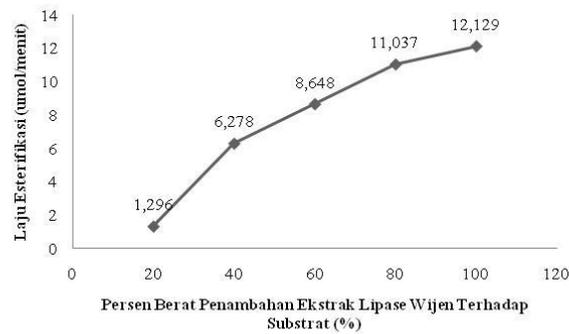
Vol. metanol ( $\mu\text{L}$ )	Konsentrasi metanol [S] (mM)	$1/[S]$ [ $\text{mM}^{-1}$ ]	Konsentrasi FAME (mM)	$\mu\text{mol}$ FAME	V ( $\frac{\mu\text{mol}}{\text{menit}}$ )	$1/V$
<b>4,05</b>	5	0,20	0,900	18,00	0,0167	60,00
<b>8,09</b>	10	0,10	1,208	20,56	0,0190	52,53
<b>12,14</b>	15	0,07	1,076	21,52	0,0199	50,18



**Gambar 5.** Grafik hubungan antara  $1/V$  dan  $1/[S]$

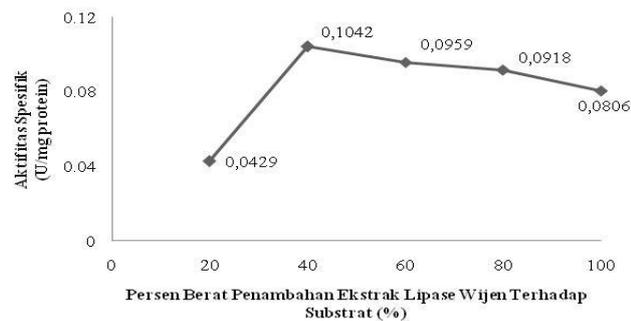
### 3.5.4 Penentuan aktivitas lipase didasarkan pada persentase penambahan ekstrak lipase

Penelitian selanjutnya adalah mengetahui kondisi optimum dari persentase penambahan ekstrak lipase terhadap aktivitas spesifik esterifikasinya. Substrat menggunakan perbandingan mol asam palmitat dan metanol sebesar 2:1 sebagai hasil optimum dari penelitian sebelumnya. Sebelum menentukan kondisi optimum aktivitas spesifik esterifikasinya maka ditentukan dahulu laju esterifikasi terhadap peningkatan konsentrasi enzim seperti ditunjukkan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Pengaruh persen berat penambahan ekstrak lipase wijen terhadap laju esterifikasi

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik, laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994). Akan tetapi, konsentrasi enzim yang terlalu tinggi menyebabkan pemborosan karena aktivitas enzim akan mencapai maksimum pada konsentrasi enzim tertentu (Saktiwansyah, 2001). Pernyataan ini dibuktikan pada Gambar 7 yang merupakan grafik pengaruh persen berat penambahan ekstrak lipase dari biji wijen dalam reaksi esterifikasi-enzimatis terhadap aktivitas katalitiknya.



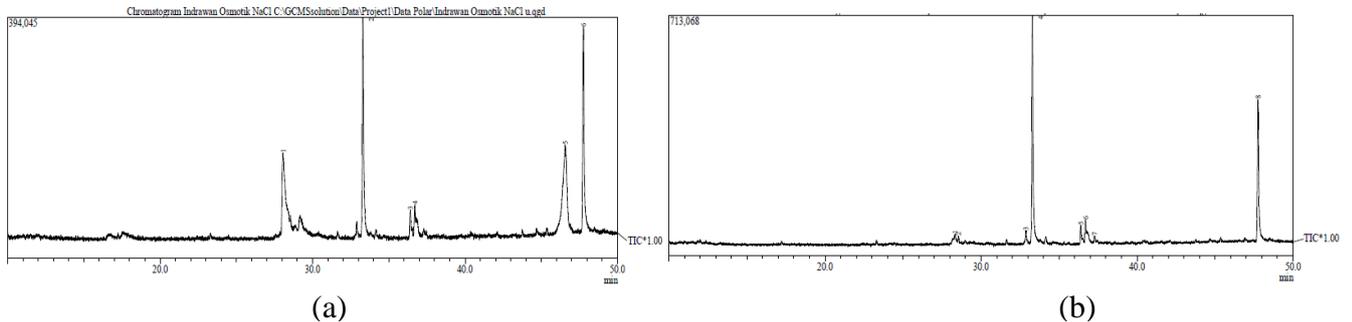
**Gambar 7.** Pengaruh persen berat penambahan ekstrak lipase wijen terhadap aktivitas spesifik esterifikasi

### 3.6 Konversi Lipid Menjadi Biodiesel dan Hasil Analisis dengan GC-MS

Reaksi transesterifikasi terhadap kedua sampel lipid hasil ekstraksi dengan larutan yang berbeda (NaCl dan asam) dilakukan pada kondisi optimum aktivitas lipase dengan perbandingan mol substrat 1:2 (lipid:metanol) dan lipase yang ditambahkan sebanyak 40% dari berat substrat serta pelarut n-heksana sebanyak 20 mL. Rendemen dihitung berdasarkan beratnya senyawa yang terlarut dalam pelarut organik (n-heksana) terhadap berat awal. Hasil konversi metil ester terhadap lipid hasil ekstraksi dengan metode tekanan osmotik berbantuan ultrasonik menggunakan larutan NaCl dan asam adalah sebesar 68,61% dan 60,37%.

Komposisi biodiesel dianalisis menggunakan kromatografi gas spektrofotometri massa (GC-MS), dengan memanfaatkan volatilitas ester. Analisis dilakukan terhadap hasil transesterifikasi secara enzimatik pada lipid yang diekstraksi dengan metode *osmotic shock* berbantuan ultrasonik menggunakan larutan NaCl dan asam yang hasilnya ditunjukkan pada Gambar 8 a dan b.

Kandungan metil ester pada biodiesel ditunjukkan pada tabel 4 a dan b. Berdasarkan data dari tabel tersebut, kandungan metil ester terbesar pada biodiesel adalah metil ester palmitat sebesar 30,40% untuk lipid hasil ekstraksi dengan larutan NaCl dan 53,32% untuk ekstraksi lipid dengan asam. Konversi biodiesel dari ekstrak lipid *S. platensis* yang diperoleh dari metode osmotik berbantuan ultrasonik dengan larutan NaCl mengandung asam lemak bebas 13,64% sedangkan dengan larutan asam memiliki FFA 12,37%. Angka asam tersebut tidak sesuai dengan syarat mutu biodiesel yang telah ditetapkan sehingga reaksi transesterifikasi secara enzimatik dengan enzim lipase dari biji wijen masih perlu dikembangkan. Angka asam yang tinggi dapat menyebabkan endapan dalam sistem bahan bakar dan juga merupakan indikator bahwa bahan bakar tersebut dapat berfungsi sebagai pelarut yang dapat mengakibatkan penurunan kualitas pada sistem bahan bakar (Markopala, 2010).



**Gambar 8.** Kromatogram biodiesel dari konversi lipid *S. platensis* yang diekstraksi menggunakan metode tekanan osmotik dengan bantuan gelombang ultrasonik dalam larutan NaCl (a) dan asam (b)

**Tabel 4.** Jenis senyawa metil ester dalam biodiesel dari lipid *S. platensis* yang diekstraksi menggunakan metode tekanan osmotik dengan bantuan gelombang ultrasonik dalam larutan NaCl (a) dan asam (b)

Jenis senyawa	% senyawa	
	A	b
Metil palmitoleat	-	1,43
Metil palmitat	30,40	53,32
Metil linolenat	2,44	2,56
Metil linoleat	1,97	3,18
Metil stearat	-	1,19

#### 4. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh berdasarkan hasil penelitian ini adalah penerapan gelombang ultrasonik selama 20 menit mampu meningkatkan rendemen lipid dari *Spirulina platensis* yang diekstraksi dengan metode tekanan osmotik. Ekstraksi lipid dengan larutan NaCl diperoleh rendemen optimum 1,49% pada konsentrasi NaCl 20% dan pada larutan asam diperoleh rendemen optimum 1,64% pada larutan dengan pH 2.

Aktivitas spesifik optimum ekstrak lipase dari biji wijen terhadap reaksi esterifikasi sebesar 0,1042 U/mg protein dengan perbandingan mol substrat 1:2 (asam palmitat:metanol) dan berat persentase lipase 40%. Parameter kinetika isolat enzim lipase dari biji wijen adalah  $V_{maks}$  sebesar 0,02  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dan  $K_m$  sebesar 1,506  $\mu\text{mol}$ . Besar konversi lipid menjadi metil ester dengan metode transesterifikasi secara enzimatik

menggunakan lipase dari biji wijen sebesar 68,61% untuk lipid dari larutan NaCl dan 60,37% untuk lipid dari asam. Akan tetapi, hasil uji angka asam terhadap kedua biodiesel belum memenuhi standar sehingga perlu pengembangan terhadap aktivitas transesterifikasinya.

## Daftar Pustaka

- Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., and Chemat, F., 2012, "Solvent-free" Ultrasound-assisted Extraction of Lipids From Fresh Microalgae Cells : a Green, Clean and Scalable Process, *Bioresour. Technol.*, 114, 457-465.
- Antczak, M.S., Kubiak, A., Antczak, T., and Bielecki, S., 2009, Enzymatic Biodiesel Synthesis-key Factors Affecting Efficiency of The Process, *Renew. Energ.*, 34, 1185-1194.
- Arbianti, R., Utami, T.S., Hermansyah, H., dan Handayani, W., 2008, Pemanfaatan Biji Wijen Sebagai Sumber Enzim Lipase Untuk Reaksi Esterifikasi Gliserol-Asam Laurat pada Pembuatan Agen Pengemulsi, *Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses*, 13-14 Agustus 2008, UNDIP Semarang.
- Bertozzini, E., Galluzi, L., Penna, A., and Magnani, M., 2011, Application of the Standard Addition Method for the Absolute Quantification of Neutral Lipids in Microalgae Using Nile Red, *J. Microbiol. Meth.*, 87, 17-23.
- Dragone, D., Fernandes, B., Vicente, A.A., and Teixeira, T.A., 2010, Third Generation Biofuels from Microalgae, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1355-1366.
- Duraiarasan, S., and Vijay, M., 2014, Effect of Various Pretreatment for Extracting Intracellular Lipid from *Nannochloropsis oculata* under Nitrogen Replete and Depleted Conditions, *ISRN Chem. Eng.*, 1-9.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane, S.G.H., 1957, A Simple Method for The Isolation and Purification of Total Lipids From Animal Tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Fox, P.F., 1991, *Food Enzymology*, Vol. 1, Elsevier Applied Science, London.
- Fredriksson, S. and Elwinger, K., 2006, Fatty Acid and Carotenoid Composition of Egg Yolk as an Effect of Microalgae Addition to Feed Formula for Laying Hens, *Food Chem.*, 99(3), 530-537.
- Kawaroe, M., Ayi, R., dan Abdul, H., 2012, Optimalisasi Seleksi Spesies Mikroalga Potensial Penghasil Minyak Mikroalga Untuk Menunjang Kelayakan Ekonomi Produksi Biodiesel, *Prosiding Insentif Riset SINas*, 29-30 November 2012, Bandung.
- Kilic, C., Gokhan, S.A., and Gokpınar, S., 2006, Comparing to The Vomit of In Two Different *Spirulina platensis* Growth Features, *Fish Aquat. Sci.*, 23, 189-192.
- Lee, J.Y., Yoo, C., So-Young, J., Chi-Young, A., and Hee-Mock, O., 2010, Comparison of Several Methods for Effective Lipid Extraction From Microalgae, *Bioresour. Technol.*, 101, 575-577.
- Lehninger, 1995, *Dasar-Dasar Biokimia*, Jilid 1, Erlangga, Jakarta.
- Markopala, P., 2010, Studi Efektivitas Transesterifikasi In-situ pada Ampas Kelapa Untuk Produksi Biodiesel, *Tesis*, ITB, Bandung.
- Mason, T.J., 1992, *Practical Sonochemistry User's Guide to Applications in Chemistry and Chemical Engineering*, Ellis Horwood Ltd., New York.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, UI Press, Jakarta.
- Prabakaran, P. and Ravindran, A.D., 2011, A Study on Effective Lipid Extraction Methods From Certain Fresh Water Microalgae, *Elixir Bio Tech.*, 39, 4589-4591.
- Putri, S.R., Musthofa, L., dan Bambang, S., 2014, Ekstraksi Minyak dari Mikroalga Jenis *Chlorella sp.* dengan Menggunakan Metode Osmotik Berbantuan Ultrasonik, *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, 2(3), 198-204.
- Saktiwansyah, E., 2001, Karakterisasi Enzim Lipase Intraseluler dengan Aktivitas Esterifikasi dari Kapang *Rhizopusoryzae* TR 32, *Tesis*, IPB, Bogor.
- Seto, A. and Kumasaka, K., 1992, Production of Eicosapentaenoic Acid by a Marine Microalgae and Its Commercial Utilization for Aquaculture, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 219-234.

- Siti, W., 2004, Pemanfaatan Ultrasonik dalam Bidang Kimia, *Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan*, 7 September 2004, Serpong.
- Suhendra, L., Tranggono dan Hidayat, C., 2006, Aktivitas Hidrolisis dan Esterifikasi Lipase Ekstrak Kecambah Biji Wijen (*Sesamun indicum*), *J. Teknol. Pangan dan Hasil Pertanian*, UGM, Yogyakarta.
- Volkman, J. K. and Jeffrey, S.W., 1989, Fatty Acid and Lipid Composition of 10 Species of Microalgae Used in Marine Culture, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 128(3), 219-240.
- Wiseman, A., 1989, Handbook of Enzymes Biotechnology, 2<sup>nd</sup> Ed., *Ellis Howard*, New York.
- Zemke-White, W.L., Clement, K.D., and Harris, P.J., 2000, Acid Lysis of Macroalgae by Marine Herbivorous Fishes: Effect of Acid pH on Cell Wall Porosity, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 245(1), 57-68.