

OPTIMASI SINTESIS METIL OLEAT MENGGUNAKAN BIOKATALIS LIPASE DARI KECAMBAH BIJI *Jatropha curcas* L.

Chusnul Hidayat¹, M. Danu P. Kuntoro¹, Pudji Hastuti¹, Djajeng Sumangat², dan Tatang Hidayat²

¹Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

² Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No.12A Bogor 16114.

Email : bb_pascapanen@litbang.deptan.go.id, bb_pascapanen@cbn.net.id

Biji jarak pagar (*Jatropha curcas*) menghasilkan lipase selama proses perkecambahan sehingga dapat digunakan sebagai sumber lipase yang relatif murah. Lipase ini telah digunakan untuk proses esterifikasi asam oleat dengan methanol. Namun demikian, kondisi optimum proses esterifikasi tersebut belum diketahui. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum proses esterifikasi menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM). Desain percobaan terdiri dari 3 faktor dan 3 taraf (Box-Behnken). Faktor yang dievaluasi adalah suhu, lama reaksi dan rasio molar substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa faktor suhu, lama reaksi dan rasio molar substrat berpengaruh signifikan terhadap *yield* metil ester. Faktor yang paling berpengaruh adalah rasio molar substrat. Efek interaksi dari ketiga faktor tidak signifikan terhadap *yield* metil ester. Kondisi optimum proses esterifikasi adalah suhu reaksi 39,5°C, selama 64,4 menit dengan rasio molar asam oleat dengan methanol 2:2. Jumlah metil ester yang terbentuk adalah 522 µmol. Hasil verifikasi menunjukkan bahwa *yield* mendekati hasil prediksi dengan RSM. Hal ini menunjukkan bahwa lipase jarak pagar berpotensi sebagai biokatalis pada sintesis metil ester.

Kata Kunci: Biji *Jatropha curcas* L., esterifikasi, lipase, metil ester, *Response Surface Methodology*

ABSTRACT. Chusnul Hidayat, M. Danu P. Kuntoro, Pudji Hastuti, Djajeng Sumangat and Tatang Hidayat. 2008. Optimization on synthesis of methyl oleate using indigenous biocatalyst from *Jatropha curcas* seeds. *Jatropha* seeds produce lipase during germination. It is useful as lipase resources. Lipase is used for the esterification of oleic acid with methanol. However, the optimum conditions of the process is not yet known. The objectives of the research was to determine the optimum conditions for the synthesis of methyl oleate from oleic acid and methanol using response surface methodology (RSM), and using Box-Behnken type of design with 3 factors. Factors such as molar substrate ratio of oleic acid to methanol, temperature and reaction time were evaluated. The results show that the effect of temperature, reaction time and substrate molar ratio on the yield of methyl oleate were significant. The most significant effect on yield was substrate molar ratio. The interaction effect of the factors on methyl ester yield was not significant. The optimum conditions for methyl oleate synthesis was at temperature of 39.5°C for 64.4 minutes and the molar ratio of oleic acid to methanol of 2:2. The produced methyl oleate was 522 µmol. From the verification data, the yield was not significantly different with the predicted data using RSM. It can also be concluded that the acetone-dried germinated *jatropha* lipase is a potential biocatalyst for the synthesis of methyl ester.

Keyword: *Jatropha curcas* seeds, Esterification, Lipase, Methyl ester, Response surface methodology

PENDAHULUAN

Proses ester sintesis metil oleat dari asam lemak dan alkohol dapat dilakukan dengan menggunakan katalis kimia (Canoir *et al.*, 2006) maupun biokatalis lipase (Kaieda *et al.*, 2000). Sintesis metil ester secara enzimatis dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, antara lain suhu, konsentrasi enzim, rasio molar substrat dan pH. Reaksi terjadi pada permukaan bidang antar fase (fase minyak dan fase alkohol) dalam sistem yang menggunakan pelarut ataupun tanpa pelarut (Hui, 1996).

Pada umumnya sintesis secara enzimatis dilakukan pada suhu relatif rendah yaitu 30°C-60°C. Lipase *Carica papaya* memiliki aktivitas optimum pada suhu 55°C

(Giordani *et al.*, 1991) dan lipase yang diisolasi dari kelapa (*Cocos nucifera* L.) memiliki aktivitas maksimum pada suhu 35°C (Ejedegba, 2007). Enujiugha *et al.* (2004) melaporkan bahwa lipase pada biji dorman kacang *African* mempunyai suhu optimum 30°C. Sagiroglu (2005) melakukan isolasi dan purifikasi terhadap lipase biji bunga matahari (*Heliantus annuus* L.), enzim ini mempunyai aktivitas lipolitik optimum pada kisaran suhu 35°C-50°C.

Konsentrasi enzim akan mempengaruhi jumlah ikatan kompleks antara enzim dan substrat. Pada konsentrasi optimal maka semua substrat akan terikat pada molekul enzim. Selanjutnya kenaikan konsentrasi enzim tidak akan menaikkan kecepatan reaksi (Whitaker, 1994). Palmer (1991) menyatakan bahwa konsentrasi enzim jauh lebih rendah

daripada konsentrasi substrat, karena pembentukan kompleks enzim-substrat bersifat reversibel. Disamping itu, rasio antara asam lemak bebas dengan metanol akan mempengaruhi sintesis metil ester. Hal ini disebabkan lipase tidak stabil pada konsentrasi metanol dalam substrat yang relatif tinggi (Chen dan Wu, 2003).

Optimasi kondisi proses perlu dilakukan untuk memperoleh proses yang efisien. Salah satu metode optimasi kondisi proses adalah *Response surface methodology* (RSM) (Nogales et al. 2005; Linder et al., 2005; Rao et al., 2002). RSM digunakan untuk mempelajari hubungan antara respons dengan beberapa faktor yang berpengaruh. Nogales et al. 2005 melakukan optimasi proses esterifikasi etanol dan asam butirat menggunakan lipase terimobilisasi *Candida antarctica* dengan metode RSM. Kondisi optimum reaksi diperoleh pada konsentrasi substrat 0,04 M, konsentrasi enzim 7% dan suhu 34°C selama 96 jam. Linder et al., 2005 melakukan optimasi sintesis enzimatis asilgliserol terhadap konsentrasi gliserol dan asam lemak *n*-3 pada preparasi minyak salmon. Parameter yang diteliti adalah suhu, kadar air, rasio molar gliserol-asam lemak, dan rasio enzim-substrat. Produk yang diperoleh sebesar 97 % pada kondisi rasio gliserol-minyak 1,2, suhu 46°C dan rasio enzim-substrat 8,1.

Sennayake dan Shahidi (2002) mengevaluasi pengaruh variabel jumlah enzim, suhu reaksi dan waktu reaksi menggunakan RSM terhadap kemampuan lipase Novozym 435 dari *Candida antarctica* pada penggabungan *docosahexaenoic acid* (DHA) ke dalam komposisi asam lemak minyak *borage* (*Borago officinalis* L) dalam pelarut heksana. Hasil evaluasi mengindikasikan bahwa persamaan regresi RSM mampu untuk memprediksi tingkat penggabungan DHA terhadap kombinasi variabel. Kondisi optimum menghasilkan penggabungan DHA hingga 34,1 % pada kondisi konsentrasi enzim 165 unit dan 25 jam reaksi pada suhu 50°C.

Pada penelitian ini dilakukan esterifikasi asam oleat dengan metanol dan dikatalisis oleh lipase kecambah *Jatropha curcas*. Untuk memperoleh *yield* maksimal maka dilakukan optimasi kondisi proses dengan metode *Response Surface Methodology* (RSM). Faktor yang dievaluasi adalah suhu, lama waktu reaksi dan rasio molar substrat.

BAHANDAN METODE

A. Bahan

Biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) diperoleh dari kota Madiun, Jawa Timur. Biji jarak dikirimkan ke laboratorium dalam keadaan kering. Biji yang telah dikecambahkan disimpan pada suhu -18°C dan dikeluarkan apabila akan dianalisis atau dibuat bubuk lipase kasar. Bubuk lipase

kasar disimpan dalam kantung plastik kedap udara pada suhu -18°C. Bahan kimia yang digunakan meliputi 2,2,3-Trimethylpentane, Aceton, Oleic Acid, Ethanol, Methanol, Pyridin, Copper (II) Acetate, yang merupakan *analytical grade* yang diperoleh dari Merck & Co. Inc (Whitehouse Station, NJ, USA).

B. Metode

Biji jarak dikecambahkan sesuai dengan metode Abigor et al., 2002 yang dimodifikasi. Biji yang telah disortasi direndam ke dalam larutan 0,1 M *buffer* fosfat pH 6 yang ditambahkan fungisida *Daconil* (1,5 g/l) selama 12 jam pada suhu ruang. Setelah 12 jam, biji ditiriskan tanpa dicuci agar fungisida tidak hilang dari permukaan biji jarak. Biji jarak dikeringanginkan selama ± 1 jam sampai permukaan biji jarak terlihat kering. Selanjutnya, biji dikecambahkan diatas kapas yang dilapisi kasa dan dibasahi untuk menjaga kelembaban media pertumbuhan biji jarak. Selama perkecambahan, media ditutup dengan kain basah. Penyemprotan dilakukan dengan aquades 2 kali sehari. Kecambah yang telah tumbuh pada tingkat pertumbuhan yang telah ditetapkan (panjang 2 - 2,5 cm) dipanen dan disimpan pada suhu -18°C.

1. Pembuatan Bubuk Lipase Kasar

Bubuk lipase kasar (BLK) disiapkan dengan metode *Acetone Powder* (Enujiugha et al., 2004) yang dimodifikasi. Kecambah jarak pagar tanpa cangkang (20 g) dihancurkan dalam 35 ml aseton dingin (-18°C) menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 5200 rpm selama 10 menit. Bubur lalu dimasukkan dalam kolom dan dibiarkan mengendap. Padatan dalam kolom dicuci dengan aseton dingin hingga cucian tidak berwarna. Padatan dikeluarkan dari kolom dan dikeringanginkan hingga seluruh aseton menguap. Padatan tersebut digunakan sebagai BLK.

2. Reaksi Esterifikasi

Reaksi esterifikasi dilakukan menggunakan metode Bezbradica et al. (2006) yang dimodifikasi. Reaksi dilakukan dalam Erlenmeyer 50 ml berisi 4 ml larutan 0,5 M asam oleat dan 0,5 M metanol dalam isooktan. Reaksi dimulai dengan menambahkan 0,1 g bubuk lipase kasar ke dalam Erlenmeyer dan diinkubasi dalam *waterbath shaker* (120 *stroke* per menit) pada suhu dan selama periode tertentu sesuai dengan rancangan percobaan. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 ml aseton-etanol (1:1) dan didinginkan dalam *icebath* selama 5 menit. Selanjutnya diambil 100 μ l larutan dan ditambah dengan isooktan (1900 μ l) dan *cupri-asetat pyridin* (400 μ l). Larutan dicampur menggunakan vortex selama 5 detik, dan didiamkan selama 10 menit. Larutan ditera absorbansinya pada panjang gelombang 715 nm untuk menentukan kadar asam lemak bebas dalam larutan. Metil ester yang

terbentuk dihitung berdasarkan penurunan kadar asam lemak bebas dalam larutan.

3. Response Surface Methodology

Kondisi proses dioptimasi menggunakan metode RSM. Metode RSM digunakan untuk mengevaluasi level suhu (x_1), waktu (x_2) dan rasio molar substrat (x_3) yang menghasilkan *yield* (Y) yang maksimal. *Yield* (Y) merupakan fungsi dari level suhu, waktu dan rasio molar substrat yang dapat dinyatakan sebagai

$$Y = f(x_1, x_2, x_3) + \varepsilon, \quad (1)$$

dalam hal ini ε menunjukkan kesalahan dalam proses. Jika respons merupakan perkiraan $E(Y) = f(x_1, x_2, x_3) = h$, dalam hal ini h adalah *response surface*, maka dapat ditulis sebagai berikut:

$$\eta = f(x_1, x_2, x_3) \quad (2)$$

Pada dasarnya analisis *response surface* sama dengan analisis regresi yaitu menggunakan prosedur pendugaan parameter fungsi respon berdasarkan metode kuadrat terkecil (*least squares method*). Dalam analisis *response surface* diterapkan teknik-teknik matematika untuk menentukan titik-titik optimum agar dapat ditemukan respon yang optimal. Respon optimal dapat berupa grafik maksimum, minimum, dan *saddle point* (Myers, 1971).

Dalam RSM biasanya digunakan model matematika polinomial orde satu atau orde dua. Persamaan umum untuk model matematika polinomial adalah sebagai berikut:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + e \quad (3)$$

(orde pertama)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

(orde kedua)

Persamaan (4) merupakan model matematika yang lazim digunakan untuk metode RSM. Persamaan tersebut bila dibuat dalam persamaan matrik menjadi sebagai berikut:

$$\hat{Y} = \hat{\beta}_0 + X'b + X'BX \quad (5)$$

dalam hal ini:

$$X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \frac{\beta_{12}}{2} & \dots & \frac{\beta_{1k}}{2} \\ \cdot & \beta_{22} & \cdot & \frac{\beta_{2k}}{2} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \text{sym} & \cdot & \cdot & \beta_{kk} \end{bmatrix} \quad (6)$$

Titik stasioner dari persamaan (4) atau (5) dapat berupa: titik maksimum, titik minimum, atau titik pelana (*saddle point*).

Kondisi optimum yang diinginkan dicari dengan cara mencari nilai turunan pertama dari model matematika orde dua (persamaan 5) yang didapat dengan syarat turunan model matematika tersebut sama dengan nol. Persamaan matematika yang mengekspresikan hal ini adalah:

$$\frac{\partial \hat{Y}}{\partial X} = b + 2BX = 0 \quad (7)$$

sehingga titik stasioner atau titik optimum adalah:

$$X_0 = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (8)$$

dalam hal ini:

X_0 = prediksi variabel yang menghasilkan Y optimum (Y_0).

Nilai respon yang optimum atau Y_0 , dapat dicari dengan menggabungkan persamaan (8) ke persamaan (5) sehingga didapat:

$$\hat{Y}_0 = \beta_0 + \frac{1}{2} X_0' b \quad (9)$$

Model persamaan (9) dapat ditransformasikan ke dalam sistem koordinat yang baru dengan mengambil titik pusat pada titik stasioner X_0 , dan kemudian memutar sumbu utama dari sistem ini sampai sejajar terhadap sumbu utama dari permukaan respon yang telah ditetapkan. Transformasi ini, digunakan untuk analisis kanonik.

Persamaan kanonik yang diperoleh adalah:

$$\hat{y} = \hat{y}_0 + w_k \lambda_k \quad (10)$$

Akar ciri λ merupakan akar ciri dari persamaan determinan matrik B. Persamaan determinan matrik B adalah:

$$|B - \lambda I| = 0 \quad (11)$$

Untuk mengetahui apakah nilai X_0 (persamaan 8) merupakan variabel optimum dalam bentuk nilai maksimum, minimum atau *saddle*, dapat dilihat dari nilai λ hasil analisis kanonik. Bila semua nilai λ adalah positif maka nilai optimum X_0 adalah minimum, jika λ semua negatif maka nilai optimum X_0 adalah maksimum, jika nilai λ ada yang positif dan negatif maka nilai optimum X_0 berupa *saddle*.

4. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan ini terdiri dari 3 faktor (x_1, x_2, x_3) dan 3 taraf (-1, 0, +1) yang dikemukakan oleh Box-Behnken (Montgomery, 1984) dengan tiga ulangan pada titik

Tabel 1. Rancangan percobaan.
Table 1. Experimental design.

No No.	Suhu (°C)/ Temperature (°C)	Waktu reaksi (menit)/ Reaction time (minutes)	Rasio molar asam oleat : metanol/ Molar substrate ratio of oleic acid to methanol.
	X1	X2	X3
1	30	40	2 : 2
2	50	40	2 : 2
3	30	80	2 : 2
4	50	80	2 : 2
5	30	60	2 : 1
6	50	60	2 : 1
7	30	60	2 : 4
8	50	60	2 : 4
9	40	40	2 : 1
10	40	80	2 : 1
11	40	40	2 : 4
12	40	80	2 : 4
13	40	60	2 : 2
14	40	60	2 : 2
15	40	60	2 : 2

tengah, dan 15 kombinasi perlakuan yang masing-masing digunakan untuk analisis metil ester. Variabel bebas (x_1) pada percobaan ini adalah suhu reaksi (x_1), lama waktu reaksi (x_2), dan rasio molar substrat (asam oleat : metanol) (x_3). Kombinasi variabel bebas dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum terhadap *yield* metil oleat (Y). Rancangan percobaan yang digunakan terdapat pada Tabel 1.

Tahap verifikasi dilakukan pada setiap model sesuai prediksi kondisi optimum. Hasil dari esterifikasi ini dibandingkan dengan hasil prediksi untuk menentukan kelayakan model dalam memprediksi respons.

5. Analisis

Biji jarak kering, kecambah biji jarak dan BLK dianalisis kadar air, lemak dan proteinnya. Analisis kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri (AOAC, 1990). Analisis total lemak dilakukan menggunakan metode alat ekstraksi Soxhlet. Analisis total protein dilakukan menggunakan metode Mikro Kjeldahl.

6. Analisis Asam Lemak Bebas dan Metil Ester

Analisis asam lemak bebas dilakukan menggunakan metode Marseno *et al.*, (1998) yang dimodifikasi. Larutan hasil proses esterifikasi (100 ml) ditambah dengan isooktan sebanyak 1.900 ml serta cupri-asetat pyridin 400 ml. Setelah itu larutan dicampur dengan menggunakan vortex selama 5 detik, dan didiamkan selama 10 menit, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 715 nm. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan kadar asam lemak bebas melalui kurva standar. Metil ester ditentukan berdasarkan pengurangan jumlah asam lemak bebas awal dengan jumlah asam lemak bebas setelah reaksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Biji, Kecambah dan Bubuk Lipase Kasar Jarak Pagar

Analisis terhadap biji, kecambah, dan bubuk lipase kasar jarak pagar meliputi analisis kadar air, kadar lemak/minyak, dan kadar protein. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui kondisi dari biji, kecambah, dan bubuk lipase kasar jarak pagar yang digunakan sebagai biokatalis dalam sintesis metil oleat. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2, kadar air biji jarak kering adalah 5,79%, setelah dikecambahkan kadar air meningkat menjadi 47,16%. Peningkatan kadar air ini diakibatkan adanya proses perendaman dimana biji dapat berkecambah jika memiliki kadar air antara 40-60% (Soetopo 2002). Air berfungsi untuk melunakkan kulit biji, memfasilitasi masuknya O_2 dalam biji, dan alat transportasi sari makanan dari endosperm ke titik tumbuh (Soetopo 2002). Kadar air pada bubuk lipase kasar adalah 15,39% (Tabel 2) lebih rendah dari kadar air kecambah (47,16%). Selama proses produksi tidak hanya terjadi penurunan kadar minyak yang disebabkan ekstraksi oleh aseton tetapi juga penurunan kadar air yang disebabkan air dari dalam jaringan ikut terbawa oleh aseton. Air pada bubuk lipase kasar masih relatif besar untuk dijadikan katalis proses esterifikasi. Menurut Muderhwa, *et al.* (1998), kadar air yang dibutuhkan lipase untuk aktivasi adalah sekitar 1-4%. Keberadaan air yang terlalu besar dapat mengganggu reaksi esterifikasi karena keberadaan air dapat memicu reaksi hidrolisis yang dapat menurunkan *yield* metil ester (Whitaker, 1994).

Berdasarkan Tabel 2, protein biji jarak selama perkecambahan mengalami penurunan dari 18,19%(db) menjadi 16,93%(db). Biji jarak memerlukan energi yang sangat besar untuk berkecambah. Untuk memenuhi kebutuhan energi ini protein digunakan setelah cadangan karbohidrat menipis. Protein dirombak oleh enzim proteolitik menghasilkan asam-asam amino bebas yang akan ditranslokasikan ke embrio (Sutopo, 2002). Kadar protein pada bubuk lipase kasar adalah 34,92 %(db), lebih tinggi dibandingkan kadar protein pada kecambah (16,93 %).

Tabel 2. Komposisi proksimat *Jatropha curcas* L.
Table 2. Proximate composition of *Jatropha curcas* L.

Parameter/ Parameters	Biji Kering/ Dried seeds	Kecambah/ Germinated seeds	Bubuk Lipase Kasar/ Crude lipase powder
Air/ Moisture content (%)	5,79	47,16	15,39
Protein/Protein (% db)	18,19	16,93	34,92
Lemak/Fat (% db)	56,81	26,02	18,33

Lemak merupakan cadangan makanan terbesar dalam biji jarak pagar. Berdasarkan Tabel 2, jumlah lemak menurun setelah biji dkecambahkan. Biji yang sedang berkecambah memiliki aktivitas lipolitik yang tinggi sehingga selama proses perkecambahan, terjadi perombakan lemak dalam rangka memenuhi kebutuhan energi. Penurunan kadar lemak juga terjadi pada bubuk lipase kasar. Pada proses produksi bubuk lipase kasar, minyak pada hancuran kecambah akan terekstrak oleh aseton sehingga jumlah minyak dalam bubuk lipase kasar akan berkurang.

B. Sintesis Metil Ester

Esterifikasi asam oleat dengan metanol dilakukan untuk memperoleh metil oleat. Reaksi dikatalisis oleh lipase *indigenus* kecambah *Jatropha curcas*. Tabel 3 menunjukkan hasil kombinasi faktor suhu, waktu dan rasio molar substrat. Metil oleat yang terbentuk (Y) pada proses ini berkisar antara 197 dan 521 μmol . Nilai *yield* tertinggi didapatkan berdasarkan hasil reaksi esterifikasi pada suhu 40°C selama 60 menit reaksi dengan rasio molar substrat 2:2. Nilai konversi substrat menjadi produk lebih kurang sebesar 25%. Nilai konversi tersebut dinilai kecil, oleh karena itu perlu adanya upaya untuk meningkatkan jumlah *yield*. Untuk meningkatkan *yield* metil oleat maka dilakukan evaluasi dari ketiga faktor suhu, waktu dan rasio molar substrat secara bersamaan menggunakan RSM (Nogales *et al.*, 2005; Linder *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2002). Dengan melakukan *fitting* dari data yang diperoleh (Tabel 3), dengan persamaan RSM orde dua didapat persamaan sebagai berikut:

$$Y = 515,01 - 8,56x_1 + 50,00x_2 - 22,20x_3 - 113,11x_1^2 - 118,60x_2^2 - 136,57x_3^2 - 12,69x_1x_2 - 6,55x_1x_3 - 18,39x_2x_3$$

dalam hal ini Y adalah metil oleat yang dibentuk (μmol). Dari Model (Y) didapat nilai determinasi (R^2) sebesar 99%, yang menjelaskan bahwa 99% *yield* dipengaruhi oleh parameter perlakuan dan 1% dipengaruhi oleh adanya faktor luar.

Berdasarkan Anova pada Tabel 4 untuk persamaan regresi orde dua (*regression*) diperoleh nilai P (0,000) < 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa persamaan pada Model (Y) adalah signifikan untuk digunakan sebagai persamaan regresi orde dua. Pengujian *Lack-of-Fit* diperoleh nilai P (0,063) > 0,05, berarti ketidakcocokan ditolak. Hal ini menunjukkan persamaan orde dua pada Model (Y) mempunyai kelayakan atau kemampuan untuk memprediksi respon pada variabel perlakuan. Model (Y) merupakan persamaan regresi orde dua dan mempunyai kemampuan untuk memprediksi *yield* dari parameter suhu, waktu reaksi dan rasio molar substrat pada esterifikasi asam oleat dengan metanol menggunakan lipase *indigenus* dari *Jatropha curcas*.

Tabel 3. *Yield* metil oleat pada berbagai kombinasi kondisi proses
Table 3. *Yield of methyl oleate at various combination of process conditions.*

No. No.	Suhu/ Temperature (°C) X1	Waktu/ Reaction time (minutes) X2	Rasio molar substrat/ Molar substrate ratio of oleic acid to methanol X3	Yield metil oleat/ Methyl oleat yield (μmol) Y
1	30	40	2:2	220
2	50	40	2:2	250
3	30	80	2:2	342
4	50	80	2:2	321
5	30	60	2:1	293
6	50	60	2:1	291
7	30	60	2:4	277
8	50	60	2:4	200
9	40	40	2:1	219
10	40	80	2:1	336
11	40	40	2:4	197
12	40	80	2:4	288
13	40	60	2:2	512
14	40	60	2:2	512
15	40	60	2:2	521

Berdasarkan Tabel 4, nilai kuadrat dari perlakuan P (0,000) < 0,05. Hal ini menunjukkan pengaruh kuadrat masing-masing perlakuan terhadap respon signifikan. Pengaruh kuadrat perlakuan suhu terhadap *yield* metil oleat (Y) signifikan. Enzim mempunyai suhu optimum dalam mengkatalisis reaksi, apabila enzim tidak berada pada suhu optimum maka kecepatan reaksi akan menurun (Whitaker, 1994). Kenaikan suhu akan meningkatkan laju pembentukan *yield* metil oleat (Y) hingga laju maksimum lalu apabila suhu terus dinaikkan maka akan menurunkan laju pembentukan *yield* metil oleat (Y).

C. Kombinasi Suhu dan Waktu Terhadap Respon Metil Oleat

Pengaruh kombinasi suhu dan waktu dievaluasi untuk memperoleh respon metil ester yang optimal. Gambar 1 menunjukkan pada kisaran waktu reaksi selama 57-74 menit dan pada kisaran suhu 35,5-43,5°C dengan rasio molar substrat 2:2 menghasilkan metil oleat yang tertinggi yaitu pada 420 μmol . Hal ini menunjukkan bahwa kisaran suhu optimum enzim lipase kecambah jarak pagar adalah 35,5-43,5°C. Penurunan suhu menjadi 30°C dengan kisaran waktu reaksi selama 57-74 menit dan rasio molar substrat

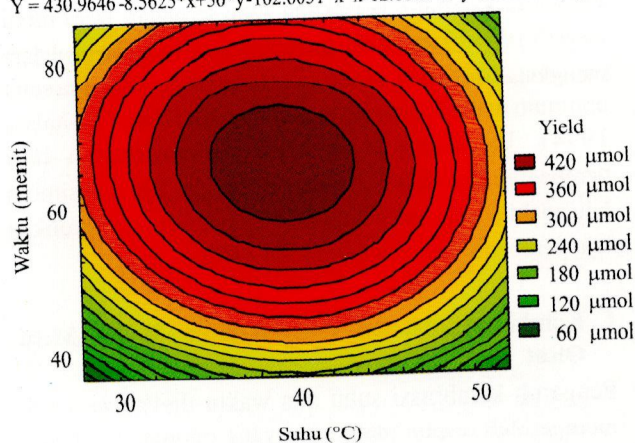
Tabel 4. Anova dan estimasi koefisien yield metil ester (Y)
Table 4. Anova and coefficient estimate of methyl ester yield

Sumber/ Source	DB/ DF	Estimasi koefisien atau jumlah kwadrat/ Coefficient estimate or Sum of squares	Kwadrat rata-rata atau standar eror/ Mean square or standard error	Nilai F/ F value	Nilai P/ P value
Regresi /Regression	9	172580	19175,6	77,47	0,000
Linier/Linier	3	24529	8176,4	33,03	0,001
Kwadrat/ Square	3	145882	48627,3	196,46	0,000
Interaksi/Interaction	3	2169	722,9	2,92	0,139
Error residu/ Residual Error	5	1238	247,5		
Lack-of-Fit	3	1185	394,9	14,92	0,063
Error murni/Pure Error	2	53	26,5		
Total	14	173818			

DB/ DF: Derajat bebas/Degrees of freedom.

2:2 menghasilkan *yield* yang lebih rendah yaitu 360 μmol . Kenaikan suhu menjadi 50°C menghasilkan *yield* yang lebih rendah yaitu 300 μmol . Hal ini disebabkan enzim mulai mengalami perubahan struktur tiga dimensinya oleh pengaruh panas sehingga reaksi cenderung berjalan lambat. Pengaruh panas terhadap aktivitas enzim juga dilaporkan oleh Tuter (1998) pada esterifikasi antara gliserol dan asam lemak yang dikatalisis oleh lipase dari biji jarak kepyar (*castor*). Reaksi esterifikasi pada suhu 40°C membentuk trigliserida paling banyak sedangkan pada suhu dibawah atau diatas 40°C trigliserida yang terbentuk lebih rendah jumlahnya. Meningkatnya trigliserida disebabkan karena lipase biji *castor* berada pada kondisi yang sesuai. Staubmann *et al.*, (1999) juga melaporkan bahwa suhu 45°C adalah suhu optimum lipase *Jatropha curcas* mengkatalisis reaksi hidrolisis pada *p-nitrophenyl butyrate*.

$$Y = 430.9646 - 8.5625 * x + 50 * y - 102.6031 * x * x - 12.6875 * x * y - 108.0981 * y * y$$



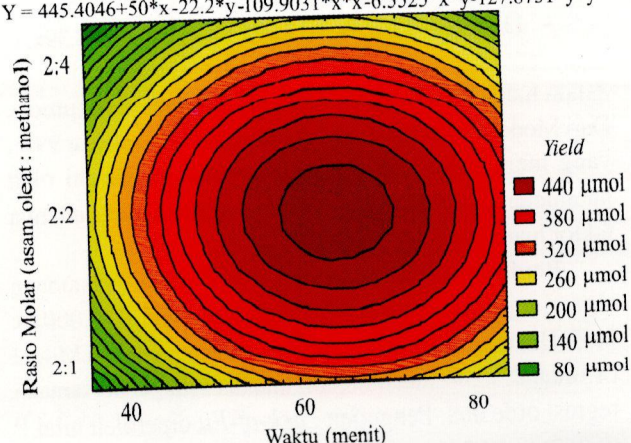
Gambar 1 Contour plot pengaruh antara suhu dengan waktu terhadap yield metil ester yang dibentuk (Y) pada rasio molar substrat 1:1.

Figure 1. Contour plot of temperature and time on yield of methyl ester at substrate molar ratio 1:1.

D. Kombinasi Waktu dan Rasio Molar Substrat Terhadap Respon Metil Oleat

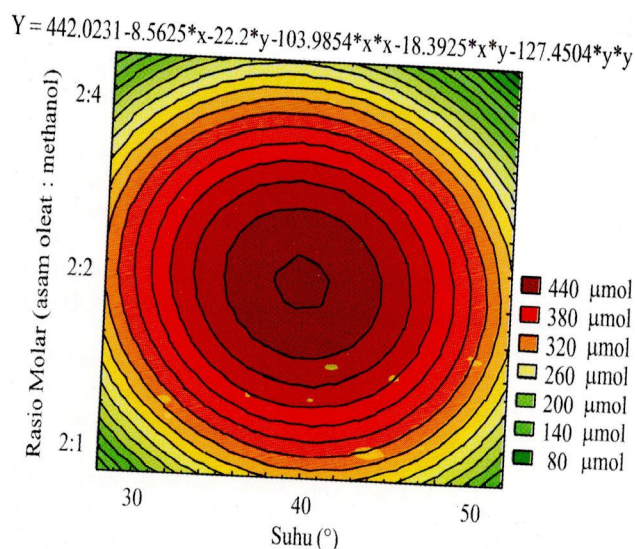
Pengaruh kombinasi waktu dan rasio molar substrat dievaluasi untuk memperoleh respon metil ester yang optimal. Berdasarkan Gambar 2, esterifikasi pada suhu 40 °C dengan rasio molar substrat 2:2 menghasilkan *yield* maksimum setelah 58 menit reaksi dan jumlah ini tidak meningkat hingga 70 menit. Hal ini mungkin disebabkan oleh reaksi esterifikasi telah mencapai kesetimbangan (*equilibrium*). Hal serupa dilaporkan oleh Mat-Radzi, *et al.* (2005) pada sintesis enzimatis oleil oleat menggunakan lipase amobil dari *Candida antarctica*. Setelah reaksi berjalan lima menit, persentase dari *yield* relatif konstan karena reaksi sudah mencapai kesetimbangan (*equilibrium*). Pada Gambar 2, memperlama waktu reaksi melebihi 70 menit memiliki kecenderungan jumlah metil ester turun. Hal ini mungkin disebabkan terbentuknya

$$Y = 445.4046 + 50 * x - 22.2 * y - 109.9031 * x * x - 6.5525 * x * y - 127.8731 * y * y$$



Gambar 2. Contour plot pengaruh antara waktu dengan rasio molar substrat terhadap metil ester yang dibentuk pada suhu 40°C.

Figure 2. Contour plot of time and substrate molar ratio on yield of methyl ester at 40°C.



Gambar 3. Contour plot pengaruh antara suhu dengan rasio molar substrat terhadap metil ester yang dibentuk pada lama reaksi 60 menit.

Figure 3. Contour plot of temperature and substrate molar ratio on yield of methyl ester in 60 minutes

molekul air yang terus bertambah hingga jumlah yang memadai untuk terlaksananya proses hidrolisis (Virto dan Adlercreuz, 2000).

E. Kombinasi Suhu dan Rasio Molar Substrat Terhadap Respon Metil Oleat

Rasio molar substrat merupakan variabel yang paling berpengaruh diantara variabel suhu dan waktu. Methanol merupakan salah satu dari substrat. Kenaikan jumlah methanol akan menggeser stokiometri reaksi ke arah kanan sehingga metil ester akan meningkat (Liu, 1994). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 3 bahwa reaksi esterifikasi dengan rasio molar substrat 2:1 selama 60 menit pada suhu 40°C menghasilkan 360 μmol metil oleat, dengan menaikkan rasio molar substrat menjadi 2:2 meningkatkan *yield* menjadi 440 μmol. Pada kisaran suhu 38 – 41°C dengan rasio molar substrat 2:2 selama 60 menit reaksi menghasilkan metil oleat terbanyak yaitu 440 μmol. Pada rasio molar substrat 2:4 terjadi penurunan jumlah *yield* metil oleat pada kondisi reaksi yang sama (suhu 40°C,

waktu 60 menit). Metanol dapat mengakibatkan terjadinya denaturasi dari enzim sehingga pada jumlah yang berlebih, metanol dapat menghambat aktivitas dari lipase (Kaieda *et al.*, 2000; Chen dan Wu, 2003). Kaieda *et al.*, (2000) melaporkan bahwa lipase dapat terdenaturasi oleh tingginya rasio molar methanol terhadap minyak, sehingga penambahan methanol dilakukan bertahap untuk menghindari inaktivasi lipase.

F. Pengaruh Interaksi Antar Perlakuan

Interaksi antara suhu dan waktu tidak berpengaruh secara signifikan terhadap terhadap *yield* metil oleat (Y). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kecepatan awal reaksi dari tiap perlakuan suhu berbeda-beda, namun lama reaksi mencapai waktu kesetimbangan (*equilibrium*) relatif sama. Interaksi antara suhu dan rasio molar tidak berpengaruh terhadap terhadap *yield* metil oleat (Y). Hal ini kemungkinan disebabkan inaktivasi enzim oleh metanol tidak dipengaruhi suhu. Pada Gambar 3 terlihat bahwa pola dari besarnya *yield* pada tiap perlakuan suhu adalah sama. *Yield* meningkat hingga rasio molar substrat 2:2 lalu turun ketika rasio molar substrat menjadi 2:4. Berdasarkan perhitungan *eigen value* dan *eigen vector* diperoleh persamaan kanonis :

$$Y = 521,79 - 108,6930 W_1^2 - 118,0591 W_2^2 - 141,5278 W_3^2$$

Berdasarkan persamaan tersebut terlihat bahwa ketiga bilangan *eigen* bernilai negatif yang berarti titik optimum berada pada daerah maksimum. Pada perhitungan titik optimum rendemen menggunakan RSM diperoleh prediksi kondisi optimum suhu reaksi 39.5°C, waktu reaksi 64.4 menit dan rasio molar substrat 2:2 dengan prediksi jumlah metil ester yang terbentuk 522 μmol.

G. Verifikasi Prediksi Kondisi Proses

Tahap verifikasi bertujuan untuk menegaskan kondisi optimum untuk reaksi esterifikasi dengan melakukan verifikasi terhadap prediksi kondisi optimum. Model RSM dianggap memadai apabila nilai prediksi respon saat

Tabel 5. Hasil verifikasi nilai prediksi *yield* menggunakan metode RSM pada optimasi sintesis metil ester
Table 5. Results of verification of yield prediction value using RSM at optimization of methyl ester synthesis.

Model	Prediksi kondisi optimum/ Optimum condition prediction			Nilai prediksi yield/ Prediction value of yield	Hasil verifikasi yield/Verified value of yield
Model	Suhu/ Temperature (°C)	Waktu/ Times (minutes)	Rasio molar substrat/ Substrate molar ratio	(μmol)	(μmol)
Y	39,5	64,4	02:02	522	529 ± 26

kondisi optimum mendekati nilai verifikasi (Madamba, 2005). Verifikasi dilakukan pada model sesuai prediksi kondisi optimum. Hasil verifikasi pada kondisi optimum faktor suhu, waktu reaksi dan rasio molar substrat terhadap *yield* metil oleat (Y) menunjukkan nilai hasil verifikasi yaitu $529 \pm 26 \mu\text{mol}$ mendekati dengan prediksi yaitu $522 \mu\text{mol}$ (Tabel 5). Hal ini mengindikasikan bahwa model yang dihasilkan layak memprediksi *yield* metil oleat. Oleh karena hasil dari verifikasi model menunjukkan kelayakan untuk memprediksi respon maka optimasi esterifikasi asam oleat dan metanol menggunakan lipase *indigenous Jatropha curcas* dengan metode *Response Surface Methodology* telah berhasil.

KESIMPULAN

Dengan menggunakan metode RSM dapat ditentukan kondisi optimum reaksi esterifikasi asam oleat dengan metanol menggunakan lipase *indigenous* kecambah *Jatropha curcas* ditinjau dari jumlah metil oleat yang terbentuk pada suhu $39,5^\circ\text{C}$ selama 64,4 menit dengan rasio molar asam oleat terhadap metanol sebesar 2:2. Prediksi jumlah metil ester yang terbentuk sebesar $522 \mu\text{mol}$. Hasil verifikasi dari model menunjukkan kelayakan untuk memprediksi respon. Hal ini menunjukkan bahwa lipase jarak pagar berpotensi sebagai biokatalis pada sintesis metil ester.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan ditujukan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui program Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) sehingga penelitian yang sekarang ini telah dapat diwujudkan. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Ir. Wisnu Broto, MS selaku Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor atas dukungan dan kerjasamanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigor, R.D., P.O. Uadia., T.A. Foglia, M.J. Hass, K. Scott and B.J. Savary, 2002. Partial and properties of lipase from germaning seeds of *Jatropha curcas*, L., *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79:1123-1126.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Bezradica, R., I. Karalazic, N. Ognjanovic and D. Mijin, 2006. Studies on specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media, *Journal of the Serbian Chemical Society* 71 (1): 31 – 41.
- Canoira, L. R. Alcantara, M.J. Garcya-Martínez, and J. Carrasco, 2006. Biodiesel from Jojoba oil-wax: Transesterification with methanol and properties as a fuel. *Biomass and Bioenergy*, 30: 76–81.
- Chen, J.W., and W.T. Wu, 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 466-469.
- Ejedegba, B.O., 2007. Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera* Linn) seed under different nutrient treatments. *African Journal of Biotechnology* 6 (6): 723-727.
- Enujiugha, V.N., F.A. Thani, T.M. Sanni, and R.D. Abigor, 2004. Lipase activity in dormant seeds of the African Oil Bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth.). *Food Chemistry* 88: 405-410.
- Giordani, R., A. Moulin and R. Verger 1991. Tributyrorylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices. *Phytochemistry* 30: 1069-1072.
- Hui, Y.H., 1996. Baileys Industrial Oils and Fat Product Edisi V, Volume II. John Wiley and Sons Inc, New York.
- Kaieda, M., T. Samukawa, A. Kondo and H.Fukuda., 2000. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalized by various lipase in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (1) : 12-15.
- Linder, M., N.Kochanowski and Parmentier. 2005. Response surface optimisation of lipase-catalysed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acids from salmon oil. *Process Biochemistry* 40: 273-279.
- Madamba, P.S. 2005. Determination of optimum intermittent drying conditions for rough rice (*Oryza sativa*, L.), *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 38: 157-165.
- Marseno, D.W., R. Indarti and Y. Ohta. 1998. A Simplified Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay. *Indonesian Food and Nutrition Progress* 5: 79-83.
- Mat-Radzi, S., M. Basri, A.B. Salleh, A. Ariff, R. Mohammad, M.B.A Rahman and R.N.Z.R.A. Rahman 2005. High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilized lipase from *Candida antarctica*. *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 291 - 298.
- Montgomery, D.C., 1984, Design and Analysis Experiment, 2nd edition, John Wiley and Sons, New York.
- Muderhwa, J.M., M.Pina and J.Graille. 1998. Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3. *Oléagineux* 43 : 427-32.
- Myers, R.H., 1971. Response Surface Methodology. Allyn and Bacon, Inc., Boston.
- Nogales, J.M.R., E. Roura and E. Contreas, 2005. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: A statistic approach. *Process Biochemistry* 40: 63-68.
- Palmer, T., 1991. Understanding Enzymes. Ellis Harwood, England
- Rao, R.B., K. Manohar, Sambiah and B.R. Lokesh. 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 (9): 885 - 890.

- Sagiroglu, A., 2005. Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 35: 37-51.
- Sennayake, S.P.J.N. and F. Shahidi. 2002. Lipase-catalyzed incorporation of docosahexanoic acid (DHA) into borage Oil: optimization using response surface methodology. *Food Chemistry* 77: 115-123.
- Soetopo, L.2002. Teknologi Benih. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Staubmann, R., I. Ncube, G.M. Gubitz, W.Steiner and J.S. Read 1999. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology* 75 : 117-126.
- Tuter, M.1998. Castor bean lipase as biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75:417-420.
- Whitaker, J.R, 1994. Principles of Enzimology for The Food Science. Marcel Dekker, Inc., New York.