



**SINTESA VITAMIN C-ESTER SECARA ENZIMATIS
DENGAN MENGGUNAKAN BIOKATALISATOR
LIPASE TERIMMOBILISASI**

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

**Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat untuk
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Budidaya Pertanian Program Studi Agronomi
Fakultas Pertanian Universitas Jember**

Oleh

**Asriyah Firdausi
NIM. 201510101047**



**Mark GPT Perpustakaan
UNIVERSITAS JEMBER**

**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS PERTANIAN**

Oktober 2004

S

Asal :	Hadiah Pembelian	Klass
Terima :	15 JAN 2005	616.394
No. Inven :		FIR
Pengkatalog :	fer	S

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**SINTESA VITAMIN C-ESTER SECARA ENZIMATIS
DENGAN MENGGUNAKAN BOKATALISATOR
LIPASE TERIMMOBILISASI**

Oleh

Asriyah Firdausi
Nim. 201510101047

Dipersiapkan dan disusun dibawah bimbingan:

Pembimbing Utama : Tri Agus Siswoyo, SP., M. Agr., Ph.D
NIP. 132 207 406
Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS
NIP. 132 095 706

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**SINTESA VITAMIN C-ESTER SECARA ENZIMATIS
DENGAN MENGGUNAKAN BIOKATALISATOR
LIPASE TERIMMOBILISASI**


Dipersiapkan dan disusun oleh

Asriyah Firdausi
NIM. 201510101047

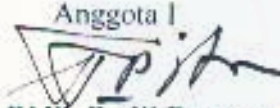
Telah diuji pada tanggal
21 Oktober 2004
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

TIM PENGUJI

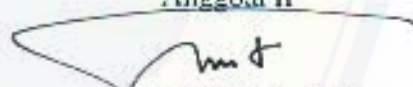
Kelua,


Tri Agus Siswoyo, SE., M. Agr., Ph.D
NIP. 132 207 406

Anggota I


Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS
NIP. 132 095 706

Anggota II


Jr. Slameto, MP
NIP. 131 658 010



MENGESAHKAN
Dekan,


Prof. Dr. Endang Budi Trisusilowati, MS
NIP. 130 531 982

Asriyah Firdausi, 201510101047, Sintesa Vitamin C-ester Secara Enzimatis dengan Menggunakan Biokatalisator Lipase Terimmobilisasi (dibimbing oleh Tri Agus Siswoyo, SP., M. Agr., Ph.D sebagai DPU dan Dr. Ir. Didik Pudji Restanto sebagai DPA)

RINGKASAN

Lipase (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) yang termasuk dalam famili esterase secara alami mengkatalitik terjadinya hidrolisis pada ikatan ester. Pemanfaatan lipase sebagai biokatalisator dibidang industri telah banyak dilaporkan seperti farmasi, kosmetik, makanan dan sintesa bahan aktif. Untuk meningkatkan kegunaan terutama pada substrat dan kondisi tertentu, perlu dilakukan pemurnian dan immobilisasi lipase. Tujuan dari penelitian ini adalah sintesa vitamin C-ester dengan meningkatkan kemampuan katalitik lipase dari *Aspergillus niger* dengan cara melakukan purifikasi dan immobilisasi enzim pada beberapa jenis solven yang berbeda berdasarkan nilai $\log P$ dari - 0,76 - 3,5. Purifikasi lipase dilakukan dengan menggunakan fraksinasi ammonium sulfat dan kombinasi kolom kromatografi seperti Sephadex G-25 dan DEAE cellulose.

Pada akhir purifikasi diperoleh total aktivitas sebesar 33×10^3 unit dengan aktivitas spesifik sebesar 2856,56 unit/mg protein. Setelah dirumuskan pada gel elektroforesis (SDS PAGE) pada konsentrasi 12,5%, protein lipase menunjukkan pita tunggal dengan berat molekul kurang lebih 29 kD setelah dibandingkan dengan marker protein.

Immobilisasi lipase dilakukan dengan menggunakan diatomaceous earth sebagai *carrier agent* / celite 545. Etyl Methyl Ketone (EMK) dengan $\log P$ 0,29 merupakan media yang baik untuk terjadinya sintesa vitamin C-ester dengan kondisi suhu reaksi 40°C selama 24 jam. *Rate of flow* (RF) dari hasil sintesa sebesar 0,82, nilai ini sama dengan nilai RF pada standart Vitamin C-ester, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa yang tersintesa adalah Vitamin C-ester.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas semua rahmat dan hidayahNya sehingga Karya Ilmiah Tertulis yang berjudul "Sintesa Vitamin C-ester Secara Enzimatis dengan Menggunakan Biokatalisator Lipase Terimmobilisasi" dapat terselesaikan dengan baik dan digunakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu Pada Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyelesaian Karya Ilmiah Tertulis ini mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, Penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Orang tua dan keluarga atas doa restu, dukungan dan ridhonya selama dalam menuntut ilmu,
2. Prof. Dr. Ir Endang Budi Trisusilowati, MS selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember,
3. Dr. Ir. Srihartatik, MS selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember,
4. Tri Agus Siswoyo, SP., M. Agr., Ph.D selaku DPU yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama melaksanakan penelitian,
5. Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS selaku Ketua Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember dan DPA yang telah memberikan kemudahan selama proses penelitian,
6. Ir Slameto, MP selaku anggota II yang telah memberikan bimbingan hingga terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis ini,
7. Dosen beserta staff Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember yang telah banyak memberikan bantuan selama melaksanakan penelitian,
8. Teman-teman AGRO 2000 atas semua dukungannya,
9. Mbak Ida, Ado, mbak faiq, Nina, Fendik dan semua pihak yang telah memberikan dukungan selama masa kuliah.

Tiada kesempurnaan dalam diri manusia, oleh karena itu adanya kritik dan saran sangat penulis harapkan dan semoga Karya Ilmiah Tertulis ini dapat

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Kegunaan Penelitian	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Minyak Nabati	3
2.2 Vitamin C	3
2.3 Enzim Katalisator Esterifikasi	5
2.4 Immobilisasi Enzim	6
2.5 Vitamin C-Ester	6
III. METODE PENELITIAN	7
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	7
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	7
3.3 Metode Penelitian	7
3.3.1 Partial Purifikasi Lipase dari <i>Aspergillus niger</i>	7
3.3.2 Pembuatan Immobilisasi Enzim	8
3.3.3 Sintesa Vitamin C-Ester	8
3.3.4 Analisa Vitamin C-Ester Menggunakan TLC	8
3.3.5 Pengukuran Total Protein Terlarut	9
3.3.6 Sodium Dodekasil Sulfat Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)	9
3.3.7 Pengukuran Kandungan Vitamin C pada Buah Jeruk	9
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	10
4.1 Partial Purifikasi Enzim Lipase dari <i>Aspergillus niger</i>	10
4.2 Immobilisasi Lipase	13
4.3 Sintesa Vitamin C-Ester	15

V. KESIMPULAN	19
DAFTAR PUSTAKA	20



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
1.	Grafik pemurnian lipase	11
2.	Grafik pemurnian lipase	11
3.	SDS-PAGE Elektrograph hasil purifikasi protein lipase	13
4.	Kemampuan absorpsi celite terhadap protein lipase.....	14
5.	Kemampuan absorpsi celite terhadap protein lipase kasar	14
6.	Kandungan Vitamin C pada buah Jeruk	16
7.	Reaksi Sintesa Vitamin C-ester	16
8.	Hasil analisis Vitamin C-ester dengan menggunakan TLC	17
9.	Hasil Analisa TLC	18

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
1.	Tahapan Purifikasi dari <i>Aspergillus niger</i>	12
2.	Pengaruh jenis larutan terhadap reaksi sintesa	17



I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Permasalahan

Indonesia merupakan negara produsen kelapa yang potensial. Luas pertanaman pada tahun 1997 sebesar 2.270.215 Ha dengan total produksi mencapai 1.594.879 ton kopra. Daging buah kelapa merupakan bagian yang paling banyak dimanfaatkan sebagai sumber lemak yaitu diolah menjadi minyak kelapa. Hampir 34% dari berat basah adalah minyak. Kandungan *unsaturated* pada minyak kelapa sebesar 12% mempunyai potensi untuk terjadinya oksidasi. Sehingga diupayakan suatu cara untuk mengurangi atau menghambat terjadinya oksidasi dengan menggunakan antioksidan alami pada campurannya. Hal ini dapat dilakukan untuk menghambat kerusakan ataupun mempertahankan mutu dari minyak kelapa selama dalam penggunaan atau dalam penyimpanan. Selain itu dapat juga sebagai upaya untuk meningkatkan nilai gizi pada minyak kelapa dengan menambahkan senyawa alami sebagai antioksidan seperti vitamin C.

Penggunaan senyawa sintetik antioxdan sebagai agen untuk mencegah oksidasi lipid telah banyak digunakan secara luas. Degradasi senyawa sintetik antioksidan mempunyai efek toksik dan bersifat karsinogen. Untuk menghindari efek negatif tersebut telah banyak dilakukan penelitian yang bertujuan untuk memperoleh senyawa antioxdan yang aman dan alami. L-ascorbic acid (Vitamin C) adalah salah satu senyawa alami yang berpotensi sebagai *dietary antioxidants*, yang berperan mendukung fungsi fisiologi tubuh. Penambahan secara langsung antara vitamin C kedalam minyak mengakibatkan terbentuk struktur amphiphilik yang mempunyai daya solubiliti rendah dan dapat meningkatkan *radical scavenging* (oksidasi). Dengan melakukan penggabungan secara struktur antara kedua senyawa (esterifikasi) tersebut secara enzimatik diharapkan dapat mengatasi permasalahan yang ada.

I.2 Rumusan Masalah

Kandungan *unsaturated* pada minyak kelapa mempunyai potensi untuk mengalami oksidasi atau ketengikan. Sehingga diupayakan suatu cara untuk

mengurangi atau menghambat terjadinya oksidasi dengan cara menambahkan hasil sintesa vitamin C-ester (vit.C-ester) dengan menggunakan biokatalisator lipase terimmobilisasi sebagai bahan antioksidan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah meningkatkan kemampuan katalitik lipase dari *Aspergillus niger* dalam mensintesa vit.C-ester dengan cara melakukan partial purifikasi dan immobilisasi enzim.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini yaitu sebagai informasi dasar dalam pengembangan biokatalisator lipase terimmobilisasi pada proses sintesa vit. C-ester. Hal ini merupakan salah satu upaya pemanfaatan vit. C-ester untuk menghambat terjadinya oksidasi atau ketengikan pada beberapa jenis minyak nabati (minyak kelapa sawit, minyak kelapa serta minyak wijen).



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Minyak Nabati

Indonesia merupakan negara produsen kelapa yang potensial. Luas pertanaman pada tahun 1997 sebesar 2.270.215 Ha dengan total produksi mencapai 1.594.879 ton kopra. Daging buah kelapa merupakan bagian yang paling banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan, utamanya digunakan sebagai sumber lemak yaitu diolah menjadi minyak (Ketaren, 1986).

Minyak nabati adalah minyak yang berasal dari tumbuh-tumbuhan seperti kelapa, kelapa sawit, kedelai, jagung, wijen dan bunga matahari. Kelapa sawit mengandung *unsaturated fatty acid* yang terdiri dari 39% asam oleic dan 10% asam linoleic (Willet, 1994). Selain itu, minyak kelapa kaya akan kandungan *fatty acid saturated* dengan rantai sedang dan medium. Hampir 70% kandungan minyaknya terdiri dari rantai sedang dengan kandungan asam laurat yang tertinggi sekitar 52%. Kandungan *fatty acid unsaturated* sekitar 12% dengan kandungan asam oleat tertinggi sekitar 5%. Kandungan *fatty acid unsaturated* ini sangat berpotensi mengalami oksidasi dan hidrolisis. Proses oksidasi dapat berlangsung bila terjadi kontak antara oksigen dengan minyak. Asam lemak pada umumnya bersifat reaktif terhadap oksigen dengan bertambahnya jumlah ikatan rangkap. Terjadinya reaksi oksidasi akan mengakibatkan bau tengik pada minyak. Oksidasi biasanya dimulai dengan pembentukan peroksida dan hidroperoksida. Tingkat selanjutnya adalah terurainya hidroperoksida menjadi aldehid dan keton. Ketengikan terbentuk oleh aldehid bukan oleh peroksida (Ketaren, 1986).

2.2 Vitamin C

L-ascorbic acid (Vitamin C) adalah salah satu senyawa alami yang berpotensi sebagai dietary antioxidants, yang berperan mendukung fungsi fisiologi tubuh khususnya pada formasi collagen, penyerapan iron anorganik, menurunkan kandungan kolesterol dalam plasma dan meningkatkan ketahanan sistem tubuh. Dan tidak kalah pentingnya lagi bahwa vitamin C dapat

menurunkan resiko terjadinya penyakit *arteriosclerosis, cardiovascular* dan kanker (Harris, 1996).

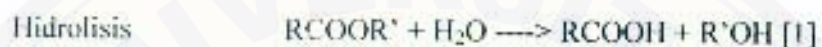
Vitamin C dapat ditemukan pada jaringan tanaman yang aktif dalam masa pertumbuhan dan perkembangan, jumlah kandungan vitamin C sangat bervariasi antara spesies dan kultivar. Beberapa jenis tanaman hortikultural akumulasi vitamin C tertinggi terdapat pada acerola/cerry (*Malpighia glabra* L.) sekitar 1% perberat basahnya (Loewus and Loewus, 1987). Buah jeruk dan kentang merupakan sumber utama vitamin C karena jumlahnya yang cukup banyak tersedia (Ball, 1998). Kebutuhan ideal vitamin C untuk dapat dikonsumsi secara baik sebanyak 100-200 mg per harinya. Buah jeruk banyak mengandung jenis vitamin, terutama vitamin C dan vitamin A. Sehubungan dengan tingginya kadar vitamin C pada buah jeruk, maka buah jeruk banyak diolah menjadi tablet vitamin C atau dimakan langsung untuk menyembuhkan penyakit ging givatis (gusi berdarah) dan influenza (AAK, 1994).

Vitamin C sangat sensitive terhadap kerusakan selama masa penyimpanan. Kerusakan dapat terjadi pada temperatur yang tinggi, kelembaban yang rendah, kerusakan fisik dan kerusakan karena pendinginan. Vitamin C sangat mudah mengalami oksidasi terutama pada larutan dengan kandungan air yang tinggi dan tingginya kadar oksigen, logam berat (Cu, Ag dan Fe). L-dehydroarsobic acid dapat direduksi menggunakan reduksi a. en menjadi vitamin C dan juga sebaliknya terjadinya oksidasi mengakibatkan terbentuk diketogulonic acid, dimana kemampuan aktivitas tidak ada (Parviainen and Nyyssonen, 1992). Ascorbate oxidase adalah enzim yang sangat berperan terhadap oksidase vitamin C menjadi L- dehydroarsobic acid (Saari *et al.*, 1995).

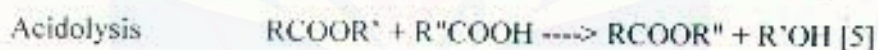
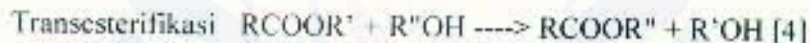
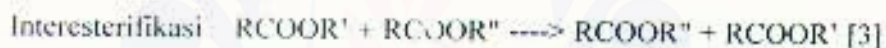
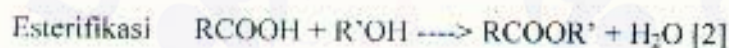
Pada bidang pangan dan kosmetik vitamin C dapat digunakan sebagai bahan aditif karena sifat hydrophiliknya. Beberapa aplikasi pemanfaatan vitamin C dapat dilakukan secara bersama-sama dengan fatty acid tapi pada medium tertentu dapat mengakibatkan struktur yang berbentuk amphiphilik, mengakibatkan daya solubiliti menjadi kurang baik dan ketidakteraturan pada lingkungan hydrophobik dan juga dapat mengakibatkan peningkatan *radical scavenging* (Liu *et al.* 1996).

2.3 Enzim Katalisator esterifikasi

Enzim lipolitik atau lipase (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) yang termasuk dalam famili esterase sangat bertanggung jawab terhadap hidrolisis triacylglicerida telah lama dipelajari (Schmid dan Verger, 1998). Lipase dapat ditemukan pada berbagai jaringan yang berasal dari hewan, tanaman dan mikrobia (Wooley dan Peterson, 1994). Lipase dapat aktif pada dua sistem (hidrophobik dan hidrophilik) yang mengakibatkan enzim ini, sangat baik pada larutan organik (Yokoseki *et al.*, 1982; Zaks dan Klibanov, 1985; Brinks *et al.*, 1988; Cernia *et al.*, 1998). Reaksi enzim ini bersifat reversible pada larutan organik dan terbagi menjadi 2 kategori di antaranya, hidrolisis [1]:



dan reaksi sintesis [2-5]:



Telah banyak dilaporkan bahwa enzim ini digunakan dalam bidang farmasi, kosmetik, kulit, detergen, makanan dan sintesa bahan organik aktif (Gandhi, 1997). Mikrobia lipase dapat dipisahkan menjadi 2 group besar berdasarkan spesifikasinya terhadap substrat: 1) non-spesifik, dimana aktivitasnya tidak tergantung dengan posisi ester dari molekul gliserida, sebagai contoh lipase yang dihasilkan oleh *Candida cylindracea*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* dan *Pseudomonas* sp; 2) 1-3 spesifik, dimana aktivitas katalisis reaksinya hanya pada posisi *sn-1* dan *sn-3* dari gliserida, sebagai contoh lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*, *Macor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* dan *Penicillium roquefortii*. Pada saat ini beberapa saja yang dapat diproduksi secara komersial diantaranya

adalah *Candida antarctica* (Novozyme 435, Novo Nordisk); *Hemicola lanuginosa* (ILL, Genencor International B.V.); *Pseudomonas glumae* (PGL, Boehringer-Mannheim).

2.4 Immobilisasi Enzim

Immobilisasi dan encapsulasi enzim pada material anorganik padat secara intensif diteliti karena kemampuan material dalam mendukung kemampuan katalitik dan biosensor. Diameter dan keseragaman porus dari bahan yang digunakan sebagai carrier agent mempengaruhi tingkat penyerapan bahan terhadap enzim, oleh karena itu hal tersebut harus disesuaikan dengan ukuran enzim agar immobilisasi dapat maksimal (Kato, *et al.*, 2003). Lipase yang diimmobilisasi lebih stabil dari pada yang tidak diimmobilisasi dengan temperatur optimum 40°C dan juga suhu kamar selama 12 hari (Rahman *et al.*, 1999).

2.5 Vitamin C-Ester

Penggabungan antara vitamin C dan fatty acid merupakan bentuk senyawa yang dapat menawarkan antioksidan jenis baru pada bidang pangan dan kosmetik (Liu *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1996). Dan sekarang ini, palmitoyl ascorbic acid dapat diproduksi secara kimia dan sudah dikomersialkan secara bebas. Vitamin C-ester mempunyai peran yang potensial sebagai bahan antioksidan, *surfactant* pada makanan dengan kandungan minyak yang tinggi, dan juga sebagai anti radang (Perricone, 2001; Song and Wei, 2002).

Vitamin C-ester di produksi secara komersial dengan menggabungkan L-ascorbic acid (vitamin C biasa) dengan fatty acid dengan cara memanaskannya (Harris, 2000). Proses enzimatik dapat menjadikan sebagai salah satu cara untuk mensintesa senyawa tersebut. Sintesa derivate ascorbyl dapat dikatalisis dengan menggunakan lipase yang telah diimmobilisasi dan secara efektif telah dipelajari dengan menggunakan lipase yang berasal dari *Candida antartica*. Penggunaan enzim ini dapat mengkonversi sekitar 40% vitamin C ke ascorbyl palmitate setelah diinkubasi selama 5 jam. (Humeau *et al.*, 1998 dan Stamatidis *et al.*, 1999).



III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember dimulai pada bulan Januari sampai dengan September 2004.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain sentrifuse, inkubator, mikropipet, eppendorf, desicator, *chill chamber*, vortex dan lain-lain. Bahan yang digunakan adalah adalah lipase kasar diperoleh dari Amano Pharmaceutical Co., Ltd (Nagoya), dan cetite 545 (merk), Vitamin C dari sigma, palmitic acyl ester, DEAE-cellulose dan Sephadex G-25 dari Pharmacia, massa molekul protein standar dari Danchi Chemical dan bahan kimia lain yang digunakan merupakan *analytical reagent grade*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Partial Purifikasi Lipase dari *Aspergillus niger*

Partial purifikasi enzim lipase dari *Aspergillus niger* dilakukan dengan melarutkan 10 g crude enzim pada 0.01 M buffer phosphate pH 6.8 setelah dilakukan pemisahan dengan cara mensentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan dipersipitaskan dengan menggunakan amonium sulfate pada konsentrasi 30-80 % dan selanjutnya sampel yang diperoleh dilarutkan pada buffer yang sama dan diaplikasikan pada kolom gel filtrasi (Sephadex G-25), protein elusi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm, protein aktif dikumpulkan dan selanjutnya diaplikasikan pada kolom ion exchange I (DEAE selulose) dengan gradien elusi NaCl 0-1 M, selanjutnya dilewatkan pada kolom ion exchange II (DEAE selulose) dengan gradien elusi 0.3 - 0.6 M. Protein aktif dikumpulkan untuk selanjutnya diimmobilisasi. Kontrol aktifitas lipase diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm, menggunakan lauric acid 4-nitrophenyl ester sebagai substratnya (Chang *et al.*, 1996).

3.3.2 Pembuatan Immobilisasi Enzim

Lipase kasar (crude lipase) diimmobilisasi menggunakan diatomaceous earth sebagai "carrier agent". 0.5 g lipase kasar dilarutkan pada larutan 0.02 M acetate buffer pH 6.5 mengandung 0.02 M CaCl_2 (20 ml) setelah disentrifuge dan dipisahkan dengan larutan yang tidak larut, "carrier agent" (2 g) ditambahkan pada supernatan. Campuran diaduk (orbital shaker) selama 24 jam pada suhu 27 °C. Selanjutnya campuran larutan ditambah dengan acetone dingin (-20°C) dan lipase yang telah di immobilisasi disaring, dicuci beberapa kali dengan menggunakan acetone, kemudian dikeringkan dalam desiccator selama 2 jam. Aktivitas lipase diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm, dengan menggunakan lauric acid 4-nitrophenyl ester sebagai substratnya (Chang *et al.*, 1996). Satu unit aktivitas enzim sama dengan 1 μmol of *p*-nitrophenyl yang dibebaskan setiap menitnya pada kondisi yang sama.

3.3.3 Sintesa Vitamin C-Ester

Campuran reaksi yang terdiri dari vitamin C, lipase terimmobilisasi, molekuler sieves, dan larutan organik. Reaksi dimulai dengan menambahkan fatty acid vinyl ester. Campuran reaksi tersebut di inkubasikan pada suhu 45°C dan distirrer dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Pada suhu 45°C diharapkan produk acetaldehid yang dihasilkan dapat dievaporasikan selama esterifikasi. Hasil reaksi yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Thin Layer Chromatography* (TLC).

3.3.4 Analisa Vitamin C- Ester Menggunakan TLC

Analisa TLC menggunakan silica gel plates 60F240 (Merck) dengan *development system* menggunakan ethylacetate:methanol:air (80:20:5, v/v/v). Visualisasi spots menggunakan Cer-reagents (25 g molybdophosphoric acid dan 10 g Cer(IV)-sulfate dilarutkan pada 300 ml air dan 80 ml H_2SO_4 pekat dengan air volume akhir 1 L) setelah itu dipanaskan pada suhu 110°C selama 5 min.

3.3.5 Pengukuran Total Protein Terlarut

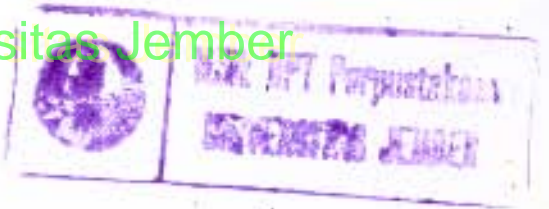
Pengukuran total protein terlarut dilakukan sesuai dengan metode Bradford (1976) dengan Bovin Serum Albumin sebagai standarnya. Konsentrasi protein ukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 595 nm. Sedangkan untuk memonitor kandungan protein selama dalam purifikasi menggunakan panjang gelombang 280 nm.

3.3.6 Sodium Dodekyl Sulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis dilakukan sesuai dengan metode Laemmli (1970) dengan konsentrasi acrylamide 12.5%. Pewarnaan perak dilakukan menggunakan *silver stain II kit* wako. Standart massa molekul protein yang digunakan antara lain myosin, β -galactosidase, albumin, aldolase, carbonic anhydrase dan myoglobin.

3.3.7 Pengukuran kandungan Vitamin C pada buah jeruk

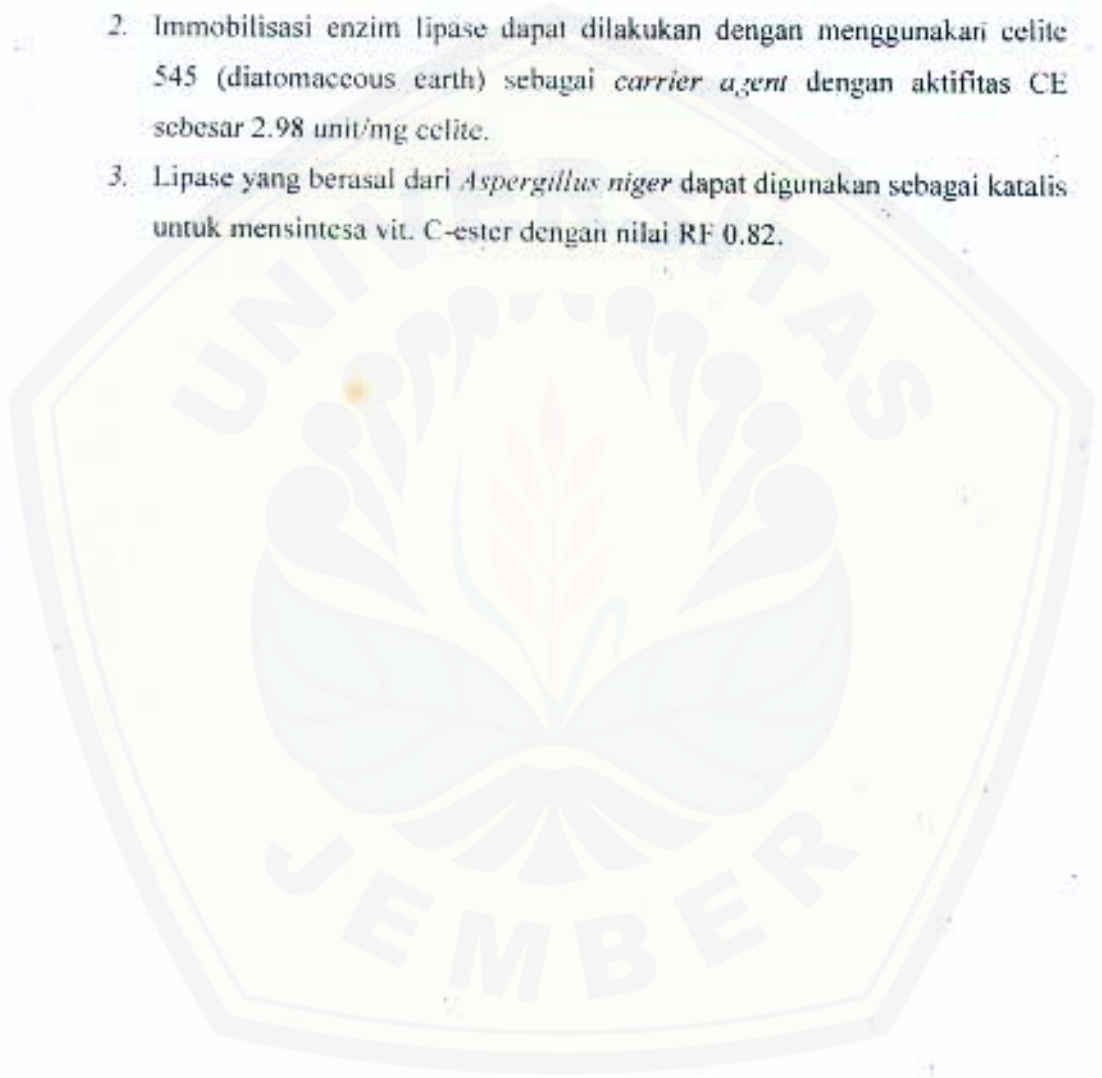
Vitamin C pada beberapa buah jeruk diketahui dengan menggunakan prosedur dari R.W Ramette, yaitu dengan titrasi menggunakan 0.01 M KIO₃. Buah jeruk diperas dan diambil airnya sebanyak 50 ml, 1 g KI, 5 ml 1 M HCl, dan 3 ml Indikator amilum ditambahkan kedalam erlenmeyer, selanjutnya dilakukan titrasi. Jumlah Vitamin C dapat dihitung dengan mengetahui banyaknya KIO₃ yang diperlukan. (massa molar asam askorbat = 176,13 g/mol).



V. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa :

1. *Partial purifikasi* dapat dilakukan dengan cara mengkombinasikan kolom kromatografi gel filtrasi (Sephadex G25), kolom ion exchange (DEAE sellulose I dan II). Pada akhir purifikasi didapatkan aktifitas spesifik sebesar 2856.56 unit/mg.
2. Immobilisasi enzim lipase dapat dilakukan dengan menggunakan celite 545 (diatomaceous earth) sebagai *carrier agent* dengan aktifitas CE sebesar 2.98 unit/mg celite.
3. Lipase yang berasal dari *Aspergillus niger* dapat digunakan sebagai katalis untuk mensintesa vit. C-ester dengan nilai RF 0.82.



DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1994. **Budidaya Tanaman Jeruk**. Kanisius. Yogyakarta.
- Bradford, M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brinks, L. E. S., Tramper, S., Luyben, K., Van't Riet, K. 1988. **Biocatalysis in organic media**. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 736-743.
- Cao, L., Bornscheuer, U.T., Schmid, R.D. 1999. **Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme**. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 6, 279-285.
- Casimir, C., Lisa, N. Y. 1998. **Lipase catalyzed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organic media**. *J. Mol. Cat. B: 4*, 149-153
- Chang R.C., Chen, J.C., Shaw, J.F. 1996. **Studying the active site pocket of *Staphylococcus hyicus* lipase by site directed mutagenesis**. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 229, 6-10.
- Cernia, E., Palocci, C., Soro, S. 1998. **The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and trans esterifications**. *Chem. Phys. of Lipids*, 93, 157-168.
- Gandhi, N. N. 1997. **Applications of lipase**. *JAOCS*, 74, 621-633.
- Harris, J.R. 1996. **Subcellular Biochemistry, Ascorbic Acid**. *Biochemistry and Biomedical Cell Biology*, vol. 25. Plenum, New York.
- Harris, S. 2001. **Ester C**. http://varchive.net/med/vitamin_c.htm Diakses pada 8 Oktober 2004.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B., and Mielo, A. 1998. **Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Ascorbil Esters**. *J.Mol Catal B.B:Enzymatic* 5, 19-23.
- Kato, K., Irimescu, R., Saito, T., Yokogawa, Y., Takahasi, H. 2003. **Catalytic Properties of Lipase Immobilized on Various Mesoporous Silicates**. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 67(1) 203-206.
- Khare, S.K, Nakajima M. 2000. **Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil**. *Food Chem.* 68, 153-157.

- Kato, K., Immescu, R., Saito, I., Yokogawa, Y., Takahashi, H. 2003. **Catalytic Properties of Lipase Immobilized on Various Mesoporous Silicates**. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(1) 203-206.
- Ketaren, S (1986) **Minyak dan lemak pangan**. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- Khare, S.K, Nakajima M. 2000. **Immobilization of Rhizopus japonicus lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil**. *Food Chem.* 68, 153-157.
- Laemmli, U.K. 1970 **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature.* 227, 680-685.
- Liu, G.T., Zhang, T.M., Wang, B.E., and Wang, Y.W. 1992. **Protective Action of Seven Natural Phenolic Compounds Against Peroxidative Damage to Biomembranes**. *Biochem Pharmacol* 43:147-152.
- Liu, Z.Q, Ma, L.P, Liu, Z.L. 1996. **Making vitamin C lipophilic enhances its protective effect against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein**. *Chem Phys Lipids.* 95, 49-57.
- Loewus, F.A., Loewus, M.W., 1987. **Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants**. *Crit. Rev. Plant Sci.* 5, 101-119.
- Montero, S., Blanco, A, Virto, M.D., Landeta, I.C., Agud, I, Solozabal, R., Lascaray, J.M., Renohales, M, Serra, J.L. 1993. **Immobilization of Candida rugosa lipase and some properties of the immobilized enzyme**. *Enzyme Microb Technol. Mar.* 15, 239-247.
- Parvianen, M.T., Nyssonen, K., 1992. Ascorbic acid. In: Leenheer, A.P.D., Lambert, W.E., Nelis, H. (Eds.), **Modern Chromatographic Analysis of Vitamins**. Marcel Dekker, New York.
- Perricone 1999. **Vitamin C Ascorbyl Palmitate**. <http://optimalnutrients.com>. diakses pada 8 Oktober 2004.
- Rahman, M.B.A., Basri, M., Hussein, M.Z., Zaliha, R.N., Rahman, R.A., Yan, Y.K., Salleh, A.B. 1999. **Activated Carbon as Support for lipase Immobilization**. Universiti Putra Malaysia, Malaysia.
- Saari, N.B., Fujita, S., Miyazoe, R., Okugawa, M., 1995. **Distribution of ascorbate oxidase activities in the fruits of family cucurbitaceae and some of their properties**. *J. Food Biochem.* 19, 321-327.

- Song, Q. X. Wei, D.Z. 2002. **Study of Vitamin C Ester Synthesis by Immobilized Lipase From *Candida* sp** *J Mol Catal B: Enzymatic* 18:261-266
- Stamatis H., Xenakis, A. 1999. **Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase** *J Mol. Cat. B: Enzymatic* 6, 399-406.
- Schmid, R. D., Verger, R. 1998. **Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 1608-1633.
- Willet, W. C. 1994. **Palm Oil Increases Cholesterol Level : a Misconception** <http://store.yahoo.com/Diakses.pac> a 8 Oktober.
- Wooley, P., Peterson, S.B. 1994 **Lipases :Their Structure, Biochemistry, and Application**. Cambridg : University Press. Cambridge.
- Yokoseki, K., Yamanaka, S., Takinami, K., Hirose, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K., Fukui, S. 1982. **Enzyme activity in organic solvents** *Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol.* 14, 1-5
- Zaks, A., Klibanov, A. M. 1985. **Enzyme-catalyzed processes in organic solvents**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3192-3196.