

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Reaksi kimia yang terjadi dalam sistem biologis selalu melibatkan katalis. Katalis ini dikenal sebagai katalis biologis (biokatalisator) berupa protein yang sangat spesifik yang disebut enzim (Winarno, 1986), merupakan katalis yang sedang dikembangkan dalam industri kimia. Pengembangan katalis biologis ditujukan untuk mengurangi konsumsi energi proses serta menghilangkan terikutnya senyawa-senyawa pengotor dalam produk suatu proses. Katalis ini digunakan sebagai alternatif katalis anorganik seperti natrium, kalium atau kalsium hidroksida.

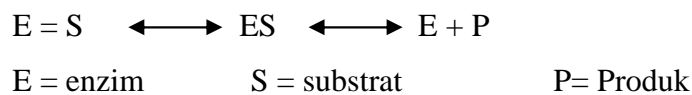
Enzim merupakan biokatalisator yang sangat efektif yang akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik secara nyata, dimana reaksi ini tanpa enzim akan berlangsung lambat (Lehninger, 1995). Sifat-sifat istimewa enzim adalah kapasitas katalitik dan spesifisitasnya yang sangat tinggi. Disamping itu enzim mempunyai peran dalam transformasi berbagai jenis energi (Winarno, 1986).

2.1 Enzim

Kata enzim berasal dari bahasa Yunani "*enzyme*" yang berarti "di dalam sel". Willy Kuchne (1876) mendefinisikan enzim sebagai fermen (ragi) yang bentuknya tidak tertentu dan tidak teratur, yang dapat bekerja tanpa adanya mikroba dan dapat bekerja di luar mikroba. Definisi tersebut berubah setelah dilakukan penelitian lanjutan oleh Buchner pada tahun 1897. Enzim dapat diproduksi oleh mikroba atau bahan lainnya seperti hewan dan tumbuhan. Enzim juga dapat diisolasi dalam bentuk murni (Winarno, 1986).

Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam sistem biologis. Semua enzim murni yang telah diamati sampai saat ini adalah protein. Aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim dapat mempercepat reaksi biologis, dari reaksi yang sederhana, sampai ke reaksi yang sangat rumit. Enzim bekerja dengan cara

menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi sehingga mempercepat proses reaksi. Percepatan reaksi terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Enzim mengikat molekul substrat membentuk kompleks enzim substrat yang bersifat sementara dan lalu terurai membentuk enzim bebas dan produknya (Lehninger, 1995)



Enzim memiliki keunggulan sifat, antara lain mempunyai aktivitas yang tinggi, efektif, spesifik dan ramah lingkungan (Lidya dan Djenar, 2000), sedangkan menurut (Saktiwansyah, 2001), enzim memiliki sifat yang khas, yaitu sangat aktif walaupun konsentrasinya amat rendah, sangat selektif dan bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*), yaitu tanpa temperatur atau tekanan tinggi dan tanpa logam yang umumnya beracun. Hal inilah yang menyebabkan reaksi yang dikatalisis secara enzimatik menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalis kimia (August, 2000).

Enzim mempunyai kekhususan aktivitas, yaitu peranannya sebagai katalis hanya terhadap satu reaksi atau beberapa reaksi yang sejenis saja. Jadi dapat melibatkan beberapa jenis substrat (Winarno, 1986). Sifat spesifik (spesifisitas enzim) didefinisikan sebagai kemampuan suatu enzim untuk mendiskriminasikan substratnya berdasarkan perbedaan afinitas substrat-substrat untuk mencapai sisi aktif enzim (August, 2000). Sifat spesifinitas ini dapat dimanfaatkan untuk tujuan reaksi atau jenis produk yang diharapkan. Sifat ini sangat menguntungkan karena tidak akan dijumpai reaksi-reaksi samping, sehingga lebih ramah lingkungan.

Berdasarkan biosintesisnya, enzim dibedakan menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada dalam jumlah sel yang tidak tetap, tergantung pada adanya induser. Enzim induktif ini jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi,

terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Lidya dan Djenar, 2000).

Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam 2 golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim disebut juga enzim intraseluler, dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya (Soedigdo, 1988).

Penggolongan enzim secara internasional telah dilakukan secara sistematis. Sistem ini menempatkan semua enzim ke dalam enam kelas utama, masing-masing dengan sub kelas, berdasarkan atas jenis reaksi yang dikatalisa (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim secara Internasional berdasarkan reaksi yang dikatalisis

No	Kelas	Jenis Reaksi yang dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Pemindahan elektron
2	Transferase	Reaksi pemindahan gugus fungsional
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis (pemindahan gugus fungsional ke air)
4	Liase	Penambahan gugus ke ikatan ganda atau sebaliknya
5	Isomerase	Pemindahan gugus di dalam molekul menghasilkan bentuk isomer
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP

Sumber : Lehninger (1990)

Saat ini enzim sebagai biokatalis telah banyak diaplikasikan secara komersial untuk proses-proses industri. Terdapat beberapa enzim penting yang digunakan pada dunia industri dalam jumlah yang besar, yaitu enzim yang menghidrolisis karbohidrat, enzim yang bekerja pada pektin, enzim yang bekerja pada minyak dan lemak serta enzim pengurai protein.

Jenis enzim yang banyak digunakan di industri antara lain amilase, protease, katalase, isomerase dan penicillin asilase. Enzim yang digunakan untuk keperluan analitik antara lain *glucose oxidase*, *galactose oxidase*, *alcohol dehydrogenase*, *hexokinase*, *muramidase* dan *cholesterol oxidase*. Enzim yang digunakan untuk obat-obatan antara lain asparaginase, protease, lipase, dan streptokinase (Crueger dan Crueger, 1984).

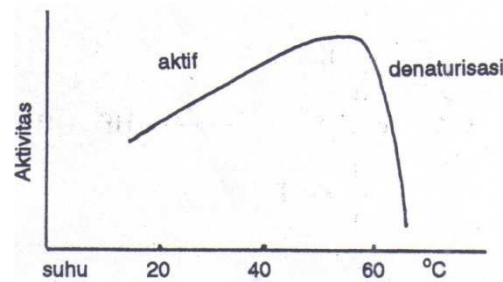
2.1.1 Enzim dan Lingkungan

Enzim merupakan golongan protein, sehingga mempunyai sifat fisik dan kimia yang mirip dengan protein. Beberapa enzim tidak stabil dan mudah terdenaturasi, sehingga aktifitas enzimnya hilang. Setiap enzim mempunyai suhu dan pH optimum untuk aktivitasnya. Dalam melakukan aktivitasnya, enzim dipengaruhi oleh lingkungannya. Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim sehingga menjadi masalah yang sering dihadapi dalam industri. Stabilitas merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis. Stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam, basa) dan oleh pengaruh temperatur dan pH ekstrim.

Terdapat dua prinsip utama untuk memperoleh enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil. Menurut Saktiwansyah (2001), peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan cara imobilisasi enzim, modifikasi kimia, *protein engineering*, dan memperlakukan enzim pada kondisi air yang terbatas (dalam pelarut organik).

1. Pengaruh Temperatur Tinggi

Enzim merupakan makromolekul yang peka terhadap lingkungannya. Dengan demikian harus ditangani dengan sangat hati-hati agar sifat-sifatnya dapat dipertahankan, kecuali enzim termostabil yang dapat aktif pada suhu tinggi. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzimatik disajikan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzimatik

Sumber: Mangunwidjaja, 1994, 60

Pada prakteknya, aktivitas enzimatik diukur pada berbagai suhu (sebagai contoh antara 15⁰C dan 40⁰C). Umumnya, semakin tinggi temperatur, semakin naik laju reaksi baik yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis oleh enzim. Namun demikian, enzim merupakan senyawa protein yang sangat peka terhadap perubahan temperatur. Semakin tinggi temperatur akan terjadi perubahan struktur enzim yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim tersebut. Pada temperatur rendah, laju inaktivasi enzim berjalan lambat dan sangat kecil, sehingga boleh diabaikan.

Di Indonesia, temperatur optimum bagi proses enzimatik dilakukan pada temperatur kamar. Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30⁰C dan denaturasi dimulai pada temperatur 45⁰C (Winarno, 1986).

2. Pengaruh Temperatur Pembekuan

Beberapa enzim dapat terdenaturasi pada temperatur pembekuan. Proses pembekuan yang tiba-tiba dapat menimbulkan hilangnya aktivitas enzim yang sedang diekstraksi, karena proses ini dapat mengakibatkan perubahan struktur enzim.

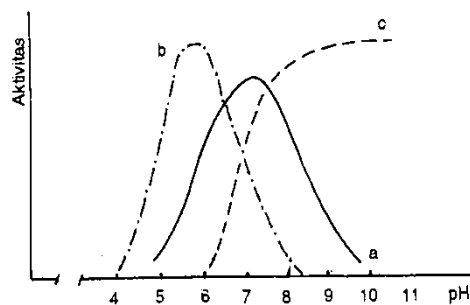
Pada pembekuan terjadi larutan dengan viskositas tinggi yang dapat menghalangi difusi enzim substrat, akibatnya dapat membatasi aktivitas enzim. Beberapa enzim dapat rusak apabila dibiarkan pada temperatur rendah bukan beku (*chilling*). Keadaan tersebut dikenal dengan nama denaturasi dingin. Hal ini

dialami oleh beberapa enzim, misalnya laktosa dehidrogenase (LDH), katalase dan glutamat dehidrogenase.

3. Pengaruh pH

Umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya.

Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat, serta perubahan kemampuan peningkatan dan pengaruh laju reaksi. Pada umumnya enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5-8,0 (Winarno, 1986). Enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Dalam hal ini, enzim yang sama sering kali pH optimumnya berbeda tergantung dari sumber enzim tersebut. Hubungan antara aktivitas enzimatis dengan pH secara umum disajikan pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Kebergantungan aktivitas enzimatis terhadap pH

Sumber: Mangunwidjaja, 1994, 58

Berdasarkan gambar diatas : (a) kurva aktivitas menyajikan secara umum nilai pH optimum yang mempunyai bentuk lonceng, (b) nilai pH optimum tergantung pada enzim dan ketergantungan ini dapat lebih atau kurang tajam, (c) untuk beberapa enzim, aktivitasnya tidak bergantung pada suatu nilai pH tertentu.

4. Pengaruh Kadar Air dan A_w (*Water Activity*)

Kadar air dari bahan sangat mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Kadar air bebas yang rendah menghambat difusi enzim atau substrat, akibatnya hidrolisis hanya terjadi pada bagian substrat yang langsung berhubungan dengan enzim. Misalnya pada kadar air 20% atau kira-kira bahan mengandung 4% air bebas, amilase hanya menghasilkan produk hidrolisis glukosa dan maltose. Pada kadar air yang lebih tinggi, selain glukosa dan maltose terbentuk juga dekstrin.

Dalam sistem reaksi enzim, kadar air mutlak bukan merupakan faktor yang penting, tetapi aktivitas enzim lebih banyak dipengaruhi oleh *water activity* (A_w) bahan, dan dapat juga dipengaruhi kelembaban udara disekitarnya. Pada A_w rendah hanya sebagian kecil substrat terlarut dalam air bebas. Setelah substrat tersebut habis dihidrolisis, maka reaksinya terhenti. Dengan meningkatkan kelembaban udara, jumlah air bebas akan meningkat dan dapat melarutkan substrat sehingga reaksi dimulai kembali.

5. Pengaruh Kadar Garam

Kadar elektrolit yang tinggi umumnya mempengaruhi kelarutan protein. Karena itu garam sering digunakan untuk melarutkan beberapa jenis protein. Peristiwa tersebut sering disebut dengan istilah *salting in*. Sebaliknya beberapa jenis larutan garam lain dapat digunakan untuk membuat protein atau enzim menjadi tidak larut. Proses ini disebut dengan istilah *salting out*, yang dapat dimanfaatkan untuk mengisolasi enzim.

Garam ammonium sulfat sering digunakan untuk fraksinasi dan isolasi enzim karena sifat kelarutannya dalam air yang tinggi dan tidak mengganggu bentuk dan fungsi enzim.

2.1.2 Aktivitas dan Kadar Protein Enzim

Suatu enzim, baik yang masih aktif maupun tidak aktif memiliki komposisi yang sama. Dengan demikian, aktivitas enzim tidak hanya ditentukan berdasarkan komposisi kimianya saja.

Aktivitas enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut, dan secara kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksinya. Dengan demikian jumlah enzim lebih banyak dinyatakan dalam satuan atau unit enzim. Selain itu bila membaca harga satuan enzim, perlu diketahui kondisi reaksi yang digunakan pada saat proses berlangsung. Penilaian jumlah satuan suatu enzim dapat saja berbeda, terutama bila produk yang dihasilkannya berbeda.

Berbagai cara dan ukuran dalam menentukan satuan enzim mengakibatkan penentuan satuan enzim tidak seragam. Karena itu perlu distandarkan agar dapat diutarakan dalam pengertian yang seragam dan dalam bahasa yang sama (Gusdiyani, 2005).

Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry mengusulkan suatu definisi untuk satuan enzim sebagai berikut :

Satu satuan (unit) dari suatu enzim adalah jumlah enzim tersebut yang mampu mengkatalis perubahan 1 μ mol substrat per menit pada kondisi tertentu. Bila ternyata substratnya merupakan senyawa polimer seperti protein atau pektin, maka istilah 1 μ mol substrat diganti dengan 1 mikro ekuivalen gugus penting senyawa tersebut (Winarno, 1986).

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. Salah satu metoda dapat digunakan dalam menentukan kadar protein adalah metoda Lowry. Rumus penentuan kadar protein menurut Lowry (Lowry dkk., 1951) dapat dilihat pada persamaan 2.1.

$$X = \frac{Y - 0,0814}{0,0021} \times \text{faktor pengenceran} \quad (2.1)$$

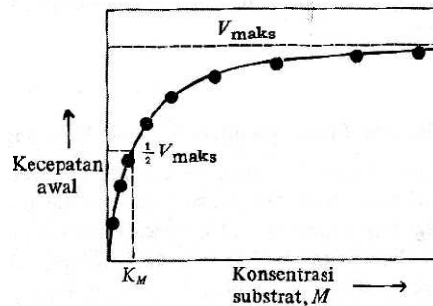
Keterangan :

X = Kadar protein (mg/ml)

Y = Absorbansi pada panjang gelombang 750 nm

2.1.3 Kinetika Reaksi Enzimatik

Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Pengaruh berbagai konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi awal jika konsentrasi enzim dijaga konstan dapat dilihat pada gambar 2.3.



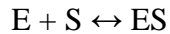
Gambar 2.3 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzimatik

Sumber: Lehninger, 1990, 241

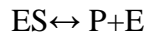
Pada konsentrasi substrat yang amat rendah, kecepatan reaksi pun amat rendah, tetapi, kecepatan ini akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Jika kita menguji pengaruh konsentrasi substrat yang terus meningkat setiap saat kita mengukur kecepatan awal reaksi yang dikatalisis ini, kita akan menemukan bahwa kecepatan ini meningkat dengan nilai yang semakin kecil. Pada akhirnya, akan tercapai titik batas, dan setelah titik ini dilampaui, kecepatan reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat (Gambar 2.3). Bagaimanapun tingginya konsentrasi substrat setelah titik ini tercapai, kecepatan reaksi akan mendekati, tetapi, tidak akan pernah mencapai garis maksimum. Pada batas ini, yang disebut kecepatan maksimum (v_{maks}), enzim menjadi jenuh oleh substratnya, dan tidak dapat berfungsi lebih cepat.

Pengaruh kejenuhan ini diperlihatkan oleh hampir semua enzim. Hal inilah yang membawa Victor Henri pada tahun 1903 kepada kesimpulan, bahwa enzim bergabung dengan molekul substrat, untuk membentuk suatu kompleks enzim substrat sebagai tahap yang harus dilalui dalam katalisis oleh enzim. Pemikiran ini diperluas menjadi suatu teori umum kerja enzim, terutama oleh Leonor Michaelis dan Maud Menten pada tahun 1913. Mereka mengemukakan bahwa enzim E

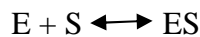
pertama-tama bergabung dengan substratnya S dalam reaksi dapat balik, membentuk kompleks enzim-substrat ES. Reaksi ini berlangsung relatif cepat



Kompleks ES lalu terurai dalam reaksi dapat balik kedua, yang lebih lambat, menghasilkan produk reaksi P dan enzim bebas E



Karena reaksi kedua merupakan tahap yang membatasi kecepatan, kecepatan keseluruhan reaksi enzimatik harus seimbang dengan konsentrasi kompleks enzim-substrat ES. Pada setiap saat di dalam reaksi enzimatik, enzim terdapat dalam dua bentuk, bentuk bebas atau tak-terikat dan bentuk yang sudah terikat ES. Kecepatan reaksi katalitik ini menjadi maksimum jika semua enzim terdapat sebagai kompleks ES dan konsentrasi enzim bebas E menjadi sangat kecil. Keadaan ini akan tercapai pada konsentrasi substrat tinggi, karena menurut hukum aksi massa, kesetimbangan reaksi pertama akan digeser ke kanan jika konsentrasi S meningkat.



Jika S ditingkatkan sampai ke batas yang cukup tinggi, semua enzim bebas E akan berubah menjadi bentuk ES. Pada reaksi yang kedua dalam siklus katalitik ini, kompleks ES terus-menerus, dan dengan cepat terurai, menghasilkan produk P dan enzim bebas E. Tetapi, jika konsentrasi S cukup tinggi, enzim bebas E segera akan berikatan dengan molekul S yang lain. Pada keadaan ini, tercapai suatu keadaan imbang, dengan enzim yang senantiasa jenuh oleh substratnya dan tercapai kecepatan maksimum.

Pada gambar 2.3 yang memperlihatkan hubungan di antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik, akan terlihat sukarnya menyatakan konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai v_{maks} , dari pendekatan terhadap kecepatan reaksi yang semakin mendekati kecepatan maksimum v_{maks} . Namun demikian, karena kurva yang menyatakan hubungan ini memiliki bentuk umum yang sama bagi hampir semua enzim (kurva ini berbentuk hiperbola), Michaelis dan Menten mendefinisikan suatu tetapan, yang dinyatakan sebagai k_m , yang bermanfaat dalam menyatakan hubungan yang tepat di antara konsentrasi

substrat dan kecepatan reaksi enzimatik. k_m , atau tetapan Michaelis-Menten, dapat didefinisikan secara sederhana sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Gambar 2.3). Nilai k_m merupakan unsur kunci di dalam persamaan Michaelis-Menten dan bersifat khas bagi setiap enzim dengan menggunakan substrat tertentu yang spesifik pada kondisi pH dan temperatur tertentu. Persamaan Michaelis-Menten secara matematika dinyatakan dalam persamaan 2.2.

$$v_o = \frac{V_{maks}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

dengan v_o = kecepatan awal pada konsentrasi substrat [S]

V_{maks} = kecepatan maksimum

k_m = tetapan Michaelis-Menten enzim bagi substrat tertentu

Persamaan 2.2 merupakan persamaan kecepatan bagi suatu reaksi enzimatik satu substrat, merupakan suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif di antara kecepatan reaksi awal v_o , kecepatan maksimum v_{maks} dan konsentrasi substrat awal yang dihubungkan melalui tetapan Michaelis-menten k_m .

Persamaan yang diturunkan oleh Michaelis dan Menten, berawal dari hipotesis dasar bahwa tahap pembatas kecepatan di dalam reaksi enzimatik adalah tahap penguraian kompleks ES, menjadi produk dan enzim bebas.

Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar bagi semua aspek kinetika kerja enzim. Jika nilai k_m dan v_{maks} diketahui, kecepatan reaksi suatu enzim pada setiap konsentrasi substrat dapat dihitung. Hampir semua reaksi enzimatik, termasuk reaksi dengan dua atau lebih substrat dapat dianalisa secara kuantitatif dengan teori Michaelis-Menten. Kenyataan ini telah memberikan bukti kuat bahwa enzim mengkatalisis reaksi dengan menggabungkan substratnya dalam waktu sementara, jadi menurunkan energi aktivasi keseluruhan reaksi. Pembentukan kompleks enzim-substrat seringkali dapat dideteksi secara langsung

dengan metoda fisiko-kimia, yaitu melalui perubahan spektrum absorpsi enzim tersebut yang bersifat khas, ketika substratnya ditambahkan.

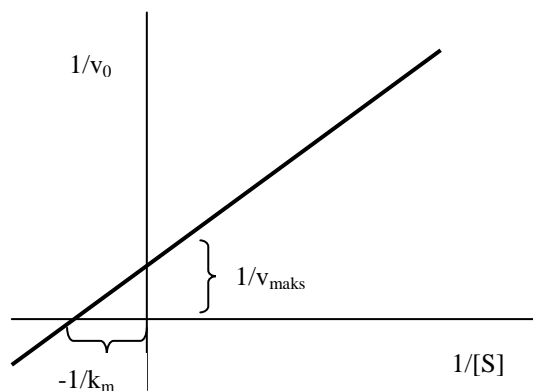
Persamaan Michaelis-Menten dapat ditransformasi secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih umum digunakan untuk memetakan data percobaan. Transformasi yang umum digunakan adalah dengan membuat kebalikan dari kedua sisi persamaan Michaelis-Menten, sehingga diperoleh hubungan :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_m + [S]}{v_{maks} \cdot [S]} \quad (2.3)$$

Persamaan 2.3 dapat disederhanakan menjadi :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_m}{v_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{maks}} \quad (2.4)$$

Persamaan 2.4 dikenal dengan persamaan Lineweaver-Burk. Bagi enzim-enzim yang mengikuti hubungan Michaelis-Menten secara benar, pemetaan $1/v_0$ terhadap $1/[S]$ menghasilkan garis lurus (Gambar 2.4). Garis ini akan memiliki sudut k_m/v_{maks} , perpotongan garis terhadap sumbu y sebesar $1/v_{maks}$ (pada sumbu $1/v_0$) dan perpotongan $-1/k_m$ pada sumbu $1/[S]$.

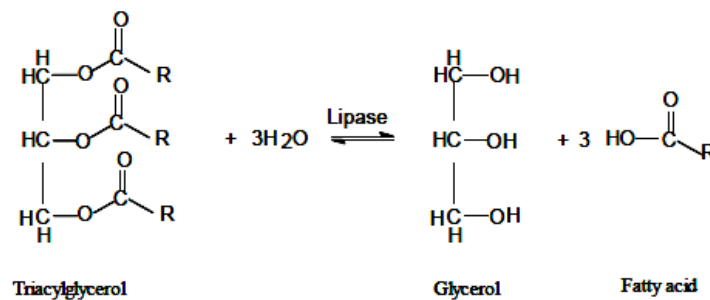


Gambar 2.4 Grafik pemetaan kebalikan ganda (Lineweaver-Burk)

Sumber: Lehninger, 1990, 246

2.2 Lipase

Lipase merupakan salah satu enzim yang telah diaplikasikan pada proses-proses industri baik industri pangan maupun non pangan. Lipase dikenal sebagai *lipolytic enzyme* dan didefinisikan sebagai “*long chain fatty acid ester hydrolase*” atau sebagai “*any esterase capable of hydrolyzing esters of oleic acid*”. Lipase berfungsi sebagai katalis pada reaksi hidrolisis triasilgliserol dan ester selain dari asilgliserol (Ngom, 2000). Lipase memisahkan lemak (*glycerol esters*) menjadi di- atau monogliserida dan asam lemak (Crueger dan Crueger, 1984) seperti terlihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Pemisahan lemak dengan lipase

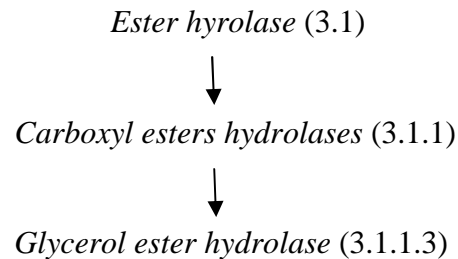
Sumber: Kulkarni, 2002

2.2.1 Tatanama Lipase

International Unit of Biochemistry (IUB) telah membagi enzim ke dalam enam golongan, yaitu golongan enzim oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase.

Berdasarkan klasifikasi yang direkomendasikan oleh *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*, lipase termasuk kelompok enzim yang dikenal sebagai ester hidrolase dan diklasifikasikan sebagai enzim kelas 3.1. Pada pengertian lebih sempit, lipase yang menghidrolisis ester menjadi asam lemak disebut sebagai *carboxyl ester hydrolase* dan diklasifikasikan ke dalam kelas 3.1.1. Lipase lebih jauh kemudian diklasifikasikan menurut substrat yang digunakan. Kebanyakan lipase bekerja dengan ester atau gliserol, yang merupakan sumber dari sebagian besar material lemak di alam. *Glycerol ester hydrolase*

diklasifikasikan sebagai EC 3.1.1.3 (Ngom, 2000). Tatanama lipase dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Tatanama Lipase

Sumber: Ngom, 2000

2.2.2 Sumber Lipase

Enzim lipase secara luas dapat ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme (Damaso, 2008). Lipase hewan (mamalia) dikelompokkan berdasarkan sumbernya, yaitu lipase dalam sistem pencernaan seperti lambung dan pankreas, lipase dalam jaringan hati, paru-paru, jantung dan ginjal, serta lipase dalam air susu. Sedangkan lipase tanaman dibagi menjadi empat kelompok yaitu : lipase triasilgliserol yang terdapat dalam tanaman jagung, minyak sawit, kacang, gandum, beras dan kentang, lipase asilhidrolase yang terdapat pada kentang, lipase fosfolipid yang terdapat dalam tanaman seledri, kol dan kacang (Saktiwansyah, 2001) dan terakhir adalah lipase lisofosfolipase yang terdapat dalam gandum (Kristanti, 2001).

Lipase mikroorganisme dapat diproduksi dari golongan bakteri, khamir dan jamur (Falony, 2006) baik sendiri maupun bersama-sama dengan jenis lain dari family hydrolase, seperti esterase (Pera, 2006). Berdasarkan penelitian, lipase yang diperoleh dari mikroorganisme selain lebih murah juga lebih stabil terhadap lingkungan dengan demikian mempunyai spektrum yang lebih luas untuk diaplikasikan di industri, diantaranya industri lemak, minyak, susu dan obat-obatan (Ellaiah dkk., 2004). Beberapa diantaranya telah dipurifikasi dan spesifisitasnya telah diteliti secara seksama. Disamping itu telah dikembangkan

pula kondisi kultur untuk mencapai hasil maksimum dari enzim lipase (Saktiwansyah, 2001).

Mikroorganisme yang dapat menghasilkan lipase antara lain jamur (*Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Mucor*, *Penicillium cyclopium*, *Rhizopus delemar*, dan *Fusarium oxysporum*), bakteri (*Pseudomonas fluorescens*, *Chromobacterium viscosum*, *Staphylococcus sp.* (*Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *S. Carnosus*), *Bacillus*, *Moraxella*, *Pseudomonas cepacia*, dan *Propionibacterium*), dan khamir (*Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Candida curvata*, dan *Saccharomyces carlbergiensis*, *Candida paralipolytica* dan *Saccharomycopsis lipolytica*) (Anggirasti, 2008 dan Kristanti, 2001). Beberapa jenis lipase dari mikroorganisme yang telah dikomersialkan dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Daftar beberapa lipase yang telah dikomersialkan

Enzim	Bentuk	pHopt	T. opt. (°C)	Perusahaan
Piccantase (<i>Mucor miehei</i>)	Bubuk	7,5	45-50	Gist-Brocades
Lipase (lipase esterase jamur <i>Rhizopus arrtizi</i>)	Bubuk	7-7,5	37	Hughes and Hughes
Klovozyme 206 (<i>Aspergillus niger</i>)	cair	5-7	35-40	Novo
Lipase A (<i>Aspergillus niger</i>)	Bubuk	3-8	40	John and E. Sturge Ltd.
Lipase preparation 2212F (Jamur)	Bubuk	4-7	35-45	Rohm Enzym
Lipase CCL (<i>Candida cylindracea</i>)	–	–	–	Sigma
RAL (<i>Rhizopus arrtizi</i>)	–	–	–	Fluka
PRL (<i>Penicillium roqueforti</i>)	–	–	–	Fluka
GCL (<i>Geotrichum candidum</i>)	–	–	–	Amano

(Saktiwansyah, 2001)

Lipase mikrobial umumnya merupakan protein dengan bobot molekul antara 2000 hingga 120.000 dengan aktifitas spesifik 500 - 1.000 unit per mg protein. Sebagian besar lipase yang dimurnikan merupakan glikoprotein yang mengandung 2 hingga 15 persen karbohidrat (August, 2000).

Metoda yang umum digunakan untuk memproduksi enzim lipase adalah metode fermentasi semi padat atau fermentasi medium cair. Fermentasi medium cair merupakan suatu fermentasi dengan menggunakan media cair yang substratnya terlarut atau terdispersi dalam cairan dan mikroorganismenya berada di bawah permukaan cairan pada kondisi aerob dengan bantuan aerasi dan agitasi (Saktiwansyah, 2001).

Disamping memperhatikan faktor media, kondisi aerasi dan agitasi, produksi lipase juga dipengaruhi oleh keberadaan induser. Induser tersebut dapat berupa trigliserida, ester asam lemak berantai panjang atau asam lemak bebas (August, 2000). Beberapa mikroorganisme penghasil lipase hanya dapat memproduksi lipase apabila terdapat induser dalam media kultivasi. Namun, pada mikroorganisme lain keberadaan induser tidak memberikan pengaruh terhadap produksi lipase. Pada *Penicillium roqueforti*, keberadaan induser justru menekan produksi enzim (Crueger dan Crueger, 1984).

2.2.3 Spesifisitas dan Klasifikasi Lipase

Spesifitas enzim didefinisikan sebagai ekspresi kemampuan suatu enzim untuk membedakan substrat-substratnya berdasarkan pada perbedaan afinitas substrat dalam berasosiasi dengan sisi aktif enzim untuk membentuk kompleks enzim substrat dan akhirnya menghasilkan produk. Sifat spesifisitas dari enzim tersebut sangat bermanfaat untuk menghasilkan produk yang diinginkan serta dapat digunakan secara optimal untuk tujuan reaksi.

Spesifisitas lipase terhadap substrat dapat dikelompokkan menjadi spesifisitas jenis lipid, spesifisitas posisi, spesifisitas asam lemak, spesifisitas alkohol, dan spesifisitas gabungan (Saktiwansyah, 2001).

1. Spesifisitas Jenis Lipid

Spesifisitas jenis lipid merupakan kemampuan suatu lipase untuk bereaksi dengan jenis lipid tertentu. Lipase yang memiliki kemampuan ini misalnya adalah lipase pankreatik yang memiliki tingkat hidrolitik tinggi terhadap triasilgliserol dibandingkan dengan diasilgliserol dan monoasilgliserol. Lipase *P. cyclopium* memiliki tingkat hidrolitik yang lebih tinggi terhadap

diolein dan monoolein daripada terhadap triolein. Lipase *Aspergillus oryzae* mampu menghidrolisis monoasilgliserol dan diasilgliserol, tetapi tidak pada triasilgliserol.

2. Spesifisitas Posisi

Spesifisitas posisi merupakan kemampuan lipase untuk membedakan substrat berdasarkan posisi ikatan ester pada triasilgliserol. Perbedaan spesifisitas posisi lipase didasarkan atas kemampuan lipase untuk menghidrolisis ikatan ester pada triasilgliserol pada posisi primer (sn-1 dan atau sn-3) atau posisi sekunder (sn-2). Lipase mikroorganisme yang memiliki spesifikasi posisi pada sn-1(3) adalah lipase *Mucor javanicus*, *R. javanicus*, *R. delemar*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* dan *R. miehei*.

3. Spesifisitas Asam Lemak

Spesifisitas asam lemak merupakan kemampuan lipase untuk membedakan substrat berdasarkan panjang rantai dan derajat kejenuhan dari asam lemak.

4. Spesifisitas Alkohol

Spesifisitas alkohol merupakan spesifisitas yang berhubungan dengan reaksi sintesis ester, dimana dalam aktifitas esterifikasinya setiap jenis lipase memiliki perbedaan terhadap jenis alkohol selain terhadap jenis asam lemaknya. Lipase yang berasal dari *A. niger*, *R. delemar*, *G. candidum* dan *P. cyclopium* mampu mensintesis berbagai jenis ester dari asam oleat dengan alkohol primer, namun hanya lipase *G. candidum* yang mampu mensintesis ester asam oleat dengan alkohol sekunder

5. Spesifisitas gabungan

Spesifisitas ini merupakan gabungan dari beberapa jenis spesifisitas yang menyebabkan suatu lipase dapat mempunyai lebih dari satu spesifisitas. Dilaporkan bahwa lipase lipoprotein dari air susu ibu menghidrolisis triasilgliserol dengan asam lemak berantai sedang pada posisi sn-1. Lipase lingual pada tikus dapat menghidrolisis triasilgliserol dengan asam lemak berantai sedang pada posisi sn-3

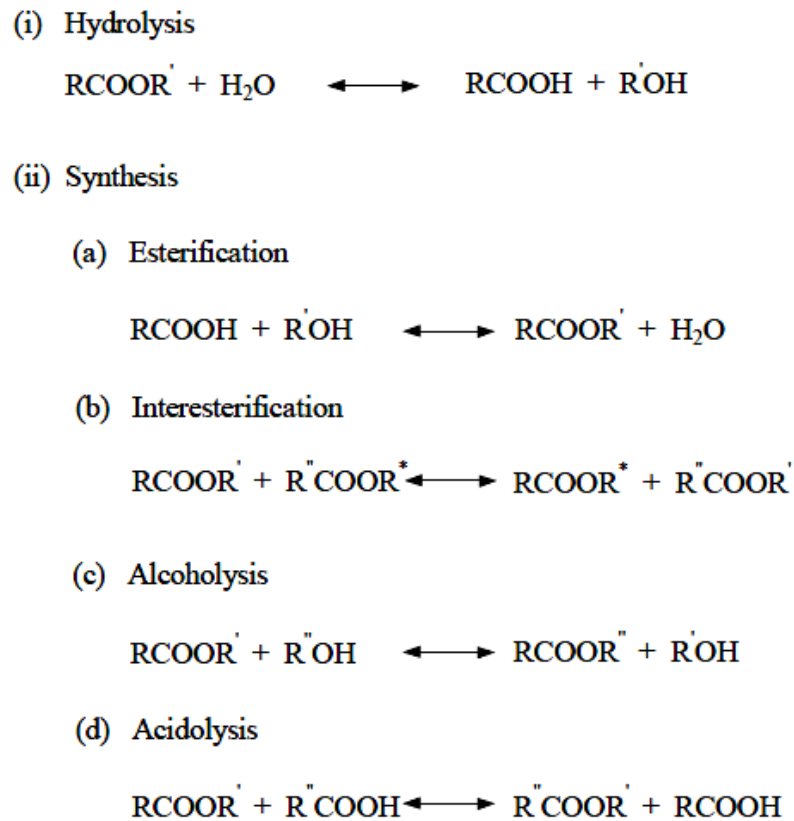
Berdasarkan kemampuannya dalam mensintesis ikatan ester, lipase diklasifikasikan ke dalam 3 golongan menurut kekhasannya (deMan, 1997), yaitu:

1. Golongan pertama adalah lipase yang tidak khas. Enzim ini tidak menunjukkan kekhasan dari segi posisi ikatan ester dalam molekul gliserol atau sifat asam lemak. Contoh enzim golongan ini ialah lipase dari *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, dan *Staphylococcus aureus*.
2. Golongan kedua mencakup lipase yang mempunyai kekhasan posisi untuk posisi-1 dan -3 gliserida. Hal ini umum untuk lipase mikroba dan merupakan akibat dari ketidakmampuan ikatan ester posisi-2 untuk memasuki pusat aktif enzim (*active center*) karena hambatan ruang. Lipase ini diperoleh dari *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, dan *Rhizopus arrhizus*.
3. Golongan lipase ketiga menunjukkan kekhasan untuk asam lemak tertentu. Contohnya lipase dari *Geothricum candidum*, yang mempunyai kekhasan menonjol untuk asam lemak rantai panjang yang mengandung ikatan rangkap dua *cis* pada posisi-2.

2.2.4 Fungsi Lipase

Lipase mengkatalisis tiga jenis reaksi. Reaksi katalitik lipase bersifat bolak-balik. Lipase mengkatalisis sintesa ester pada sistem *microaqueous*. Namun pada beberapa biotransformasi industri oleokimia, proses transesterifikasi nampaknya lebih disukai daripada hidrolisis dan sintesis ester.

Reaksi katalitik lipase diklasifikasikan kedalam dua kategori utama, yaitu hidrolisis dan sistesis. Reaksi yang masuk dalam kategori sistesis terdiri atas reaksi esterifikasi, interesterifikasi, alkoholisis dan asidolisis. Reaksi interesterifikasi, alkoholisis dan asidolisis dikenal dengan istilah transesterifikasi (Kaewthong, 2004). Reaksi katalitik lipase dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Reaksi katalitik lipase

Digliserida dan monogliserida pada reaksi hidrolisis trigliserida oleh enzim lipase merupakan senyawa yang bersifat sebagai zat aktif penurun tegangan permukaan yang lebih baik dibandingkan trigliserida, selain itu digliserida dan monogliserida dapat mempengaruhi laju reaksi dengan cara memodifikasi sistemnya. Ukuran diameter butir-butir lemak merupakan indikasi eksternal terbentuknya permukaan antar fasa minyak dan air (August, 2000).

2.2.5 Aktivitas Lipase

Aktifitas lipase mempunyai satuan unit (U). Satu unit aktifitas lipase setara dengan 1 μmol asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis substrat yang dikatalisis oleh lipase tiap satuan menit (Handayani, 2005). Untuk menentukan aktifitas optimum pada kondisi optimum lipase maka perlu dilakukan pengukuran

aktifitas enzimatis pada variasi temperatur dan pH, sehingga akan diketahui aktifitas lipase disetiap rentang temperatur dan pH yang ditentukan.

Uji aktivitas enzim lipase dapat dilakukan dengan metode potensiometri. Prinsip dari uji aktivitas enzim ini adalah substrat *olive oil* dibuat dalam bentuk emulsi dan diberi enzim lipase yang belum diketahui keaktifannya, diinkubasi pada temperatur 35⁰C dan pH 5,6 (Crueger, 1984). Selama inkubasi asam lemak bebas dilepaskan dan akan mengalami penurunan pH. Dengan cara titrasi, baik secara manual maupun otomatis akan didapat jumlah titer persatuan waktu yang merupakan harga aktivitas lipase. Untuk mendapatkan emulsi yang stabil biasanya ditambahkan gum arabik, tetapi dapat juga digunakan hidrosimetilselulosa atau natrium oleat (Winarno, 1986).

Aktivitas enzim dengan metode potensiometri dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Harnanik, 2000) :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{(A - B) \times N_{\text{NaOH}} \times 1000}{V \times t} \quad (2.5)$$

Keterangan :

A	= volume NaOH sampel (mL)
B	= volume NaOH blanko (mL)
N NaOH	= 0,01 N – 0,05 N
1000	= konversi dari m mol ke μmol
V	= volume enzim yang digunakan (dalam ml)
t	= waktu inkubasi

Keaktifan lipase diketahui dengan habisnya substrat atau timbulnya produk hidrolisis asam lemak bebas. Habisnya substrat dapat dideteksi antara lain dengan pewarna *nile blue sulfat* yang berwarna biru. Sebelum hidrolisis, larutan lemak akan berwarna pink yaitu warna yang ditimbulkan oleh reaksi antara *nile blue sulfat* dengan globula lemak. Bila substrat telah habis dihidrolisis, warna pink akan berubah kembali menjadi biru.

Produk asam lemak yang dibebaskan dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim lipase dengan menggunakan metoda pelat dengan media agar. Metoda pelat dilakukan dengan menggunakan senyawa indikator warna antara lain *methyl red*, *phenol red*, *rhodamine B*, atau *victoria blue B*. Proses hidrolisis yang terjadi menyebabkan terbentuknya warna atau *fluorescent halos* atau wilayah disekitar koloni (Kulkarni, 2002).

Metoda yang digunakan untuk memperkirakan aktivitas lipase secara kuantitatif adalah metoda titrimetri, *interfacial tensiometry*, *Spectroscopy* (*photometry*, *fluorimetry*, *infrared* dan turbidimetri), kromatografi, *immunochemistry* dan konduktometri. Sebagian besar metoda tersebut didesain untuk memperkirakan produk hasil reaksi hidrolisis (Kulkarni, 2002). Tabel 2.3 dan 2.4 memperlihatkan beberapa metoda pengujian aktivitas lipase.

Tabel 2.3 Pengujian aktivitas lipase dengan metoda pelat, titrimetri dan tensiometri

Plate assays			
Substrate	Reaction product	Method	Reference
Triacylglycerols	Free fatty acids	Coloured indicators (Victoria blue, methyl red, phenol red, rhodamine B)	Kouker and Jaeger 1987, Samad <i>et al.</i> 1989, Converse <i>et al.</i> 1981
Titrimetric assay			
Triacylglycerols	Free fatty acids	pH determination	Rowe and Gilmour 1981
Interfacial tensiometry			
Dicaprin	Free fatty acids	Measurement of barrier movement	Ransac <i>et al.</i> 1991
Triacylglycerols	Free fatty acids	Measurement of drop volume or decrease in surface tension	Nury <i>et al.</i> 1987, Labourdenne <i>et al.</i> 1994

Tabel 2.4 Pengujian aktivitas lipase dengan spektrofotometri dan fluoresen

Spectrophotometry					
Substrate	Product	Method	Final product	Wavelength nm	Reference
2,3-dimercaptopropan-1-ol Tributyrat	Glycerol analogue (2 over 3 positions)	Reaction with DTNB	TNB	412	Kurooka <i>et al.</i> 1977
p- Nitro phenyl esters	p-nitro-phenol	Product is colored		410	Winkler and Stuckmann 1979
Glycerides (triolein)	Free fatty acid	Enzymatic conversion	NAD	340	Woollett <i>et al.</i> 1984
Glycerides (triolein)	Free fatty acid	Negative charge	Safranine	520/560	Rawyer <i>et al.</i> 1989
Arylethene derivatives	Hydrolysis products are colored			Variable	Richardson <i>et al.</i> 1989
Glycerides	Free fatty acid	Complex formation	Rhodamine 6G	513	van Autryve <i>et al.</i> 1991
Glycerides	Free fatty acid	Complex formation	Cu (II) salt	715	Safarik 1991
1-2- diglycerides	Glycerol	Enzymatic conversion	quinone	550	Fossati <i>et al.</i> 1992
Fluorescence					
Substrate	Reaction product	Method	Final product	Wavelength nm	Reference
Glycerides containing pyrene ring	Free acid analogues or aggregated substrate	Fluorescence shift	Free acid analogues or glyceride analogues	Ex. 340 em. 400 450	Thuren <i>et al.</i> 1987
Glycerides	Free fatty acid	Complex formation	11-(dansylamino)undecanoic acid	Ex. 350 em 500	Wilton 1990, 1991

Aktivitas enzim yang diukur menggunakan metoda titrimetri pada prinsipnya adalah pembuatan substrat dalam bentuk emulsi kemudian diberi enzim lipase yang belum diketahui keaktifannya dan diinkubasi pada temperatur dan pH optimumnya. Selama inkubasi, proses reaksi terjadi sehingga asam lemak bebas dilepaskan. Hal ini akan menurunkan pH. Titrasi yang dilakukan menggunakan larutan alkali akan menghasilkan jumlah titer persatuan waktu yang menunjukkan jumlah asam lemak yang dihasilkan. Jumlah asam lemak tersebut menunjukkan harga aktivitas lipase. Emulsi yang stabil dan peningkatan sensitifitas pengujian dapat dilakukan dengan menambahkan gum arabik, hidroksimetilselulosa atau natrium oleat (Winarno, 1986).

Laju reaksi merupakan fungsi linier dari lipase dan konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat yang berada pada kondisi interfasial sangat penting, sehingga triasilgliserol dibentuk dalam bentuk emulsi, antara lain dengan metoda *sonication*. Penelitian yang dilakukan oleh Goodman dan Durgan (1969)

menunjukkan bahwa sonikasi minyak zaitun yang diemulsikan dengan *gum arabic* meningkatkan sensitifitas pengujian (Kulkarni, 2002).

2.2.6 Sifat Lipase

Aktivitas lipase tergantung pada sumber, jenis substrat, pH dan temperatur. pH dan temperatur optimum reaksi hidrolisis lipase tergantung pada jenis dan sumber substrat, larutan penyangga (bufer) dan pengujian yang digunakan. Sebagai contoh, lipase pankreas mempunyai pH optimum antara 8 dan 9, tetapi dapat menurun menjadi sekitar 6-7 bila substratnya berbeda. Pada lipase yang berasal dari mikroorganisme, pH optimum dicapai pada pH 5,6 - 8,5. Lipase yang dihasilkan dari bakteri mempunyai pH optimum pada kondisi netral atau mendekati kisaran basa, sedangkan lipase yang dihasilkan dari jamur pH optimumnya pada kondisi netral atau mendekati asam (August, 2000). Temperatur optimum lipase pada umumnya berkisar antara 30⁰C dan 40⁰C. meskipun telah pula ditemukan adanya lipase yang masih aktif pada temperatur -29⁰C, terutama pada ikan dan udang yang dibekukan (Winarno, 1986). Temperatur dan pH optimum beberapa mikroorganisme penghasil lipase dapat dilihat pada Tabel 2.5

Tabel 2.5 Temperatur dan pH optimum beberapa mikroorganisme penghasil lipase

Organisme	pH Optimum	Temperatur Optimum (°C)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,2 – 6,8	37
<i>Pseudomonas fragi</i>	7,0 – 7,2	32
<i>Rhizopus delemar</i>	5,6	35
<i>Aspergillus niger</i>	5,6	35
<i>Penicillium roqueforti</i>	6,0	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,5	45
<i>Geotrichum candidum</i>	6,2	37
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	7,0	37

(Crueger dan Crueger, 1984)

Aktivitas optimum lipase tergantung juga dari senyawa pengemulsi yang digunakan karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air. Dalam hal ini, substrat perlu diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air. Substrat yang sering digunakan dalam penelitian adalah minyak zaitun, lemak susu, atau senyawa murni seperti tributirin dan triolein.

Terdapatnya garam juga sangat mempengaruhi aktivitas lipase. Pada konsentrasi NaCl 7,0 mM, lipase menunjukkan aktivitas yang maksimum, tetapi kemudian menurun. Garam kalsium juga meningkatkan aktivitas lipase dan membantu meningkatkan daya tahan enzim tersebut terhadap panas (Winarno, 1986).

2.2.7 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase

Aktivitas enzim lipase dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah temperatur, air, pelarut organik, konsentrasi enzim dan substrat.

Peningkatan temperatur akan menambah kecepatan reaksi kimia akibat peningkatan jumlah energi bagi molekul reaktan, sehingga tumbukan antara molekul persatuan waktu lebih produktif. Temperatur yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim sangat mudah terinaktivasi karena sifat enzim yang mudah terdenaturasi. Inaktivasi enzim pada temperatur tinggi disebabkan oleh dua hal yaitu adanya pembukaan partial struktural molekul enzim dan perubahan struktur primer enzim karena adanya perubahan atau kerusakan molekul-molekul asam amino tertentu (Saktiwansyah, 2001).

Air juga memegang peranan yang penting dalam proses inaktivasi enzim. Jika jumlah air dikurangi maka inaktivasi enzim oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim dapat meningkat. Stabilitas termal suatu enzim akan jauh lebih tinggi pada kondisi kering daripada kondisi basah. Air berfungsi sebagai pelumas yang membuat konformasi suatu molekul enzim yang fleksibel. Penghilangan air akan membuat enzim menjadi lebih kaku (rigid). Pada kondisi air terbatas, lipase masih menunjukkan aktifitasnya pada temperatur 100°C. Hal ini berarti struktur lipatan protein enzim dalam media organik masih terjaga (August, 2000).

Pelarut organik berhubungan dengan kenaikan “rigiditas” molekul enzim yang disebabkan oleh konstanta dielektrika yang rendah yang akan memperkuat dan menstabilkan struktur enzim secara keseluruhan (August, 2000). Penggunaan enzim untuk sintesis dalam pelarut organik memberikan beberapa keuntungan antara lain kelarutan substrat organik dan enzim dalam pelarut organik lebih tinggi dibandingkan dengan air, kestabilan enzim meningkat dan mudah mengisolasi produk. Penggunaan pelarut organik juga mempunyai kelemahan seperti residu pada produk akhir, toksisitas bagi makhluk hidup, mahal dan mudah terbakar (Saktiwansyah, 2001).

Studi mengenai aktivitas katalitik enzim dalam pelarut organik menunjukkan bahwa pelarut yang baik yang dapat mempertahankan aktivitas dan stabilitas enzim adalah pelarut yang bersifat hidrofobik. Pelarut ini pada kondisi bebas air sangat baik untuk menjaga aktivitas enzim pada temperatur tinggi. Faktor yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut organik adalah kelarutan substrat dan produk dalam pelarut, reaktivitas pelarut, densitas, viskositas dan tegangan permukaan, toksisitas pelarut, mudah tidaknya terbakar, harga serta masalah limbah bahan tersebut dan pembuangan sisa pelarut tersebut ke alam (August, 2000).

Peningkatan konsentrasi enzim akan meningkatkan laju esterifikasi. Tetapi konsentrasi enzim yang terlalu tinggi menyebabkan pemborosan karena aktivitas enzim akan mencapai maksimum pada konsentrasi enzim tertentu (Saktiwansyah, 2001).

Konsentrasi substrat juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim. 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 dengan substrat (Lehninger, 1995).

2.2.8 Aplikasi Lipase di Industri

Dewasa ini enzim lipase banyak menarik perhatian karena aplikasinya yang semakin berkembang dalam berbagai industri, baik industri pangan maupun industri non pangan. Pada berbagai produk pangan, enzim lipase sudah banyak digunakan terutama dalam pengolahan susu, pembuatan keju, pembuatan mentega, serta dalam pembuatan produk-produk pangan yang lain. Pemanfaatan lain dari lipase mikrobial adalah sebagai katalisator dalam proses esterifikasi serta dalam memodifikasi komposisi dan sifat fisik dari trigliserida. Pemanfaatan lipase pada industri dapat dilihat pada Tabel 2.6 (Saktiwansyah, 2001).

2.3 *Aspergillus niger*

Dari berbagai jenis mikroorganisme, jamur dikenal secara luas sebagai sumber lipase yang baik karena umumnya jamur memproduksi enzim ekstraseluler, yang memudahkan *recovery* enzim dari media fermentasi (Damaso, 2008; Pera, 2006 dan Moentamaria, 2009). Beberapa jamur yang menghasilkan lipase komersial penting adalah *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium sp.* dan *Aspergillus sp.* (Ellaiah dkk., 2004)

Pada proses fermentasi menggunakan jamur, pembentukan *misselium* selalu diikuti oleh pembentukan spora yang berguna untuk pembuatan inokulum. Pada proses fermentasi, inokulum yang berupa spora merupakan stater yang baik dalam fermentasi. Keberadaan spora dapat membuat turunnya daya cerna produk fermentasi dibandingkan dengan sel *misselium* (Anggirasti, 2008).

Tabel 2.6. Pemanfaatan lipase di industri

Bidang industri	Kegunaan	Produk
A. Pangan		
1. Industri susu olahan	Hidrolisis lemak produk susu	' <i>flavouring agent</i> ' untuk industri produk susu
2. Industri roti	Meningkatkan aroma/ kualitas dan memperpanjang umur simpan	Produk roti dan kue
3. Industri bir	Meningkatkan aroma dan mempercepat fermentasi	Produk beralkohol (sake dan bir)
4. industri pengolahan daging dan ikan	Meningkatkan aroma dan menghilangkan kelebihan lemak	Produk daging dan ikan
5. Industri kimia dan obat-obatan	Transesterifikasi minyak alami	Produk lemak dan minyak (pembentukan <i>cocoa butter</i>)
B. Non Pangan		
1. Industri oleokimia	- Hidrolisis minyak/lemak. - Analisis distribusi posisi asam lemak dalam trigliserida	Asam lemak, digliserida dan monogliserida <i>Reagent</i> untuk analisis lemak
2. Industri deterjen	Menghilangkan noda/spot lemak dan minyak	Deterjen untuk <i>laundry</i> dan penggunaan di rumah tangga
3. Industri kosmetik	Menghilangkan lemak	Kosmetika secara umum
4. Industri kulit	Menghilangkan lemak dari jaringan kulit hewan	Produk-produk kulit
6. Kedokteran	Analisis trigliserida darah	Diagnostik
6. Berbagai macam kegunaan	Dekomposisi dan menghilangkan substansi yang berminyak	Pembersihan pipa, penanganan limbah dan lain-lain, yang penggunaannya dikombinasikan dengan enzim lain

(Saktiwansyah, 2001)

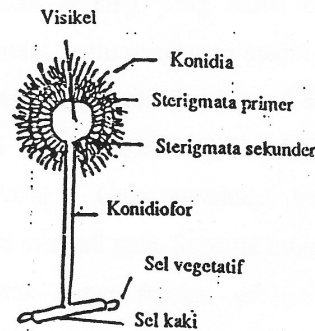
Jamur yang sering digunakan dalam teknologi fermentasi antara lain *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* merupakan satu dari mikroorganisme terpenting yang digunakan dalam bidang bioteknologi dan berperan penting dalam teknologi pangan. *Aspergillus niger* merupakan salah satu jenis *Aspergillus* yang tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. *Aspergillus niger* selama lebih dari satu dekade telah digunakan untuk memproduksi enzim ekstraseluler dan sudah direkomendasikan oleh badan pengawasan obat dan makanan Amerika, FDA (*Food and Drug Administration of the United States of America*) sebagai bahan yang aman untuk dikonsumsi (GRAS, *Generally Regarded As Safe*) (Falony, 2006; Mhetras, 2009 dan Pera, 2006).

Aspergillus niger adalah jamur yang termasuk genus *Aspergillus*, famili *Moniliceae*, ordo *Moniliales* dan subdivisi *Deuteromycotyna* dari kelas fungi *imperfecti*. *Aspergillus sp.* adalah jenis jamur yang mempunyai hifa yang berspora. Hifa yang terletak pada bagian terendam pada substrat berfungsi sebagai penyerap unsur hara dan yang menghadap permukaan berfungsi sebagai alat reproduksi.

Aspergillus niger biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan dan udara dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) 25°C atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. Kepala konidia berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur. Suhu optimum pertumbuhannya adalah 35-37°C dengan suhu minimum 6-8°C dan suhu maksimum 45-47°C. Dalam proses pertumbuhannya *Aspergillus niger* memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). Selain itu *Aspergillus niger* juga membutuhkan mineral dalam pertumbuhannya seperti (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, urea, CaCl₂.7H₂O, FeSO₄, MnSO₄.H₂O. (permimalang.wordpress.com/2007/12/12/aspergillus-niger).

Bagian-bagian jamur yang menjadi ciri *Aspergillus niger* adalah *footcell*, *konidiofor*, *vesikel*, *stigma* tambahan dan spora yang tumbuh memanjang di atas stigma yang disebut konidia (Gambar 2.8 dan 2.9). Jamur ini dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat-zat makanan yang terdapat

dalam medium. Molekul-molekul yang sederhana seperti gula dan komponen lain yang terdapat disekeliling hyfa dapat langsung diserap. Molekul lain yang lebih kompleks seperti selulosa, pati, protein dan minyak lemak harus dipecah dulu sebelum diserap ke dalam sel dengan menghasilkan enzim ekstraseluler (August, 2000).



Gambar 2.8 Bagian-bagian *Aspergillus niger*



Sumber:
<http://www.inspectapedia.com/mold/moldatlas.htm>



Sumber :
www.mycology.adelaide.edu.au/images/niger1.gif

Gambar 2.9 Spora *Aspergillus niger*

Pertumbuhan *Aspergillus niger* dan pembentukan produk dipengaruhi oleh beberapa faktor (August, 2000), yaitu :

1. Temperatur

Temperatur berpengaruh langsung pada kecepatan pertumbuhan mikroorganisma, kecepatan sintesa enzim dan kecepatan inaktivasi enzim.

Jamur pada umumnya tidak tahan terhadap temperatur tinggi. Temperatur

terlalu tinggi dapat mengakibatkan proses pengeringan protein yang menyebabkan kematian sel, sedangkan temperatur yang terlalu rendah akan mengurangi aktifitas enzim hingga pertumbuhan mikroorganisma terganggu. Temperatur optimum pertumbuhan *Aspergillus niger* mendekati 37°C, sedangkan temperatur maksimumnya mencapai 65°C. Temperatur optimum adalah temperatur dimana aktifitas metabolisme berjalan sebaik-baiknya. Pembentukan enzim ekstraselular akan lebih baik pada temperatur yang lebih rendah dari temperatur optimum pertumbuhan. Hal ini terjadi karena energi yang diperoleh dari respirasi lebih banyak digunakan untuk melakukan pembentukan spora daripada miselium. Pembentukan miselium akan mempengaruhi jumlah enzim yang dihasilkan jamur. Selain itu, semakin tinggi temperatur, sistem enzim satu persatu akan non aktif hingga pertumbuhan menjadi tidak stabil. Pada temperatur yang lebih rendah, proses metabolisme akan berjalan lambat dan membantu mengurangi penghambatan sintesa enzim yang dikenal dengan istilah "represi katabolitik"

2. pH

Nilai pH media adalah salah satu faktor yang penting untuk pertumbuhan mikroorganisma dan pembentukan produk fermentasi. Jamur umumnya lebih toleran terhadap suasana asam sampai netral yaitu pada pH sekitar 3 sampai 7. *Aspergillus niger* mempunyai kisaran pH untuk tumbuh cukup luas yaitu 2.8 - 8.8. Sedangkan pH optimumnya tergantung pada produk yang diharapkan. Pada umumnya enzim ekstraselular dihasilkan paling banyak pada pH pertumbuhan yang mendekati pH aktifitas maksimum enzim yang bersangkutan.

3. Zat makanan (nutrien)

Karbon adalah sumber nutrien utama yang diperlukan dalam pertumbuhan jamur. *Aspergillus niger* akan tumbuh dengan baik jika menggunakan glukosa, fruktosa, maltosa, sukrosa, xylosa dan manosa sebagai sumber karbonnya. Nutrien lain yang cukup memegang peranan penting adalah unsur nitrogen. Selama fase pertumbuhan, jamur menggunakan nitrogen

dengan cepat dan pada periode ini enzim mulai terdapat di dalam media. Kecepatan pertumbuhan jamur yang menggunakan sumber nitrogen anorganik lebih rendah daripada campuran asam-asam amino atau sumber nitrogen kompleks lainnya sebagai sumber nitrogen organik. Campuran asam-asam amino berpengaruh cukup besar terhadap pertumbuhan jamur dan pembentukan enzim. Sumber nitrogen anorganik biasanya berasal dari garam amonium, nitrat atau gas amonia. Sedangkan sumber nitrogen organik biasanya berasal dari senyawa organik seperti ekstrak khamir, hidrolisat kasein, whey, *corn steep liquor*, dan senyawa nitrogen kompleks lainnya seperti limbah pengolahan kedele dan ikan. Sumber nitrogen yang paling baik adalah ekstrak yeast. Mineral merupakan nutrisi lain yang dibutuhkan mikroorganisma. Media untuk pertumbuhan pada umumnya memerlukan magnesium (Mg), Fosfor (P), kalium (K), sulfur (S), kalsium (Ca) dan khlor (Cl) sebagai komponen "essensial"nya. Unsur-unsur ditambahkan dalam bentuk garamnya dengan konsentrasi yang tepat. *Aspergillus niger* dalam pertumbuhannya berhubungan dengan zat makanan (nutrien) yang terkandung dalam medium fermentasi. Molekul-molekul sederhana seperti glukosa yang terlarut dalam air yang terkandung pada sekeliling hifa, dapat langsung diserap oleh hifa. Senyawa-senyawa polimer seperti selulosa, pati dan protein harus diuraikan terlebih dahulu menjadi molekul yang lebih sederhana oleh *Aspergillus niger*. Selanjutnya molekul-molekul sederhana tersebut diserap ke dalam sel dan digunakan sebagai substrat oleh enzim intraselular.

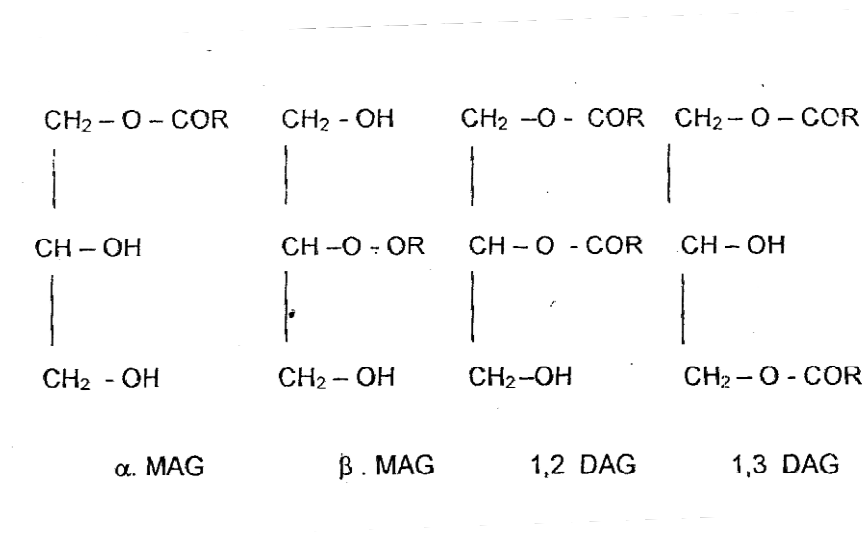
2.4 Monoasilgliserol (MAG)

Mono-diasilgliserol pertama kali diproduksi oleh Berthelot pada tahun 1853 melalui reaksi esterifikasi antara asam lemak dan gliserol. Monoasilgliserol umum digunakan sebagai pengemulsi pada industri makanan, farmasi dan kosmetik. Pada industri farmasi, monoasilgliserol digunakan sebagai bahan pengikat pembuatan tablet. Pada industri makanan, monoasilgliserol dan

diasilgliserol umum digunakan sebagai pengemulsi makanan yang menstabilkan emulsi pada kecap dan memperbaiki tekstur roti. Pada industri kosmetik digunakan sebagai *texturising agents*, sedangkan diasilgliserol banyak digunakan dalam pembuatan phospolipid, glikolipid, lipoprotein sintetik serta sebagai bahan karier dalam industri obat-obatan (Kaewthong, 2004 dan Kitu, 2000)

Monoasilgliserol tersusun atas sebuah asam lemak dan dua grup hidroksi bebas yang menempel pada sebuah molekul gliserol. Bagian asam lemaknya atau rantai asil lemaknya bersifat lipofilik dan dapat bercampur dengan bahan-bahan yang berlemak, sedangkan grup hidroksilnya bersifat hidrofilik yang dapat bercampur dengan air. Bagian asam lemaknya dapat teresterifikasikan ke satu, dua atau tiga grup hidroksil menjadi monoasilgliserol, diasilgliserol dan triasilgliserol (Kitu, 2000)

Sifat monoasilgliserol relatif lebih tinggi dibandingkan dengan diasilgliserol yang mempunyai dua gugus hidrofobik dan satu gugus hidrofilik. Monoasilgliserol terdiri dari dua struktur, yaitu struktur alfa monoasilgliserol dan beta monoasilgliserol sedangkan diasilgliserol mempunyai dua struktur yaitu 1,2 diasilgliserol dan 1,3 diasilgliserol yang dapat dilihat pada Gambar 2.10



Gambar 2.10 struktur mono- dan diasilgliserol

Monoasilgliserol merupakan suatu emulsifier yang bersifat non ionik dan tidak terlalu sensitif terhadap suasana asam. Mono-diasilgliserol merupakan

pengemulsi yang pertamakali digunakan dalam produk pangan, yaitu dalam pembuatan margarin dan *shortening* untuk produk pembuatan *pastry*. Pada tahun 1933, mono-diasilgliserol mulai ditambahkan pada *cake shortening* yang menyebabkan peningkatan aerasi dan karakteristik kriming pada *cake* sehingga *cake* yang dihasilkan memiliki tekstur yang lebih empuk. Tahun-tahun berikutnya, mono-diasilgliserol mulai diaplikasikan pada pembuatan produk roti. Hak paten diberikan oleh pemerintah Amerika pertama kali pada tahun 1938 yang mengilustrasikan bahwa penggunaan emulsifier sangat penting terutama dalam pembuatan margarin (Anggirasti, 2008).

Secara umum, dalam industri pangan saat ini monoasilgliserol digunakan sebagai surfaktan, emulsifier pada pengolahan margarin, mentega kacang, pudding, roti, biskuit dan kue-kue kering yang mengandung lemak. Monoasilgliserol memperbaiki tekstur adonan roti dan juga memperpanjang masa simpan tortila jagung (dari segi tekstur). Monoasilgliserol dalam adonan roti akan bereaksi dengan amilopektin membentuk senyawa kompleks yang berperan memperbaiki tekstur roti serta memperpanjang masa simpan dari roti tersebut.

Pada prakteknya penggunaan monoasilgliserol sering dikombinasikan dengan koemulsifier untuk meningkatkan daya emulsinya, seperti campuran monoasilgliserol dengan lesitin yang diaplikasikan pada pembuatan mentega, dan campuran monoasilgliserol dengan propilen glikol monoester pada pembuatan kue yang akan meningkatkan kestabilan emulsi kue tersebut (August, 2000)

Saat ini, mono-diasilgliserol merupakan emulsifier yang paling banyak digunakan di industri pangan, yaitu sebanyak 70% dari seluruh penggunaan emulsifier. Monodiasilgliserol diproduksi pada tiga macam tingkat konsentrasi monoasilgliserol, yaitu 40-46% α -monogliserida, 52% α -monogliserida dan monogliserida destilasi atau yang mengandung 90% monogliserida. Kualitas mono-diasilgliserol semakin baik jika kandungan monoasilgliserol semakin tinggi. Mono-diasilgliserol digolongkan sebagai emulsifier dengan status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) atau aman untuk dikonsumsi (Anggirasti, 2008)

Monasilgliserol selain berfungsi sebagai emulsifier, juga berfungsi sebagai anti mikroorganisme. Monoasilgliserol tertentu dilaporkan oleh beberapa peneliti

mempunyai sifat dapat menghambat pertumbuhan gram positif, *yeast*, virus, fungi, dan sel tumor. Salah satu jenis monoasilgliserol adalah *glycerol monolaurate* atau monolaurin. Monolaurin terbentuk dari reaksi antara gliserol dengan asam laurat, digunakan sebagai emulsifier pada produk-produk bakeri, *whipped topping*, kembang gula, produk keju, produk instan dan mengandung pati. Selain berfungsi sebagai emulsifier, monolaurin juga berfungsi sebagai antimikroba (Kitu, 2000).

Monokaprin dan monolaurin mempunyai aktivitas antimikroorganisme yang digunakan dalam produksi makanan dan kosmetika. Monolaurin sangat efektif terhadap bakteri gram positif dan jamur, tetapi tidak efektif terhadap bakteri gram negatif. Monolaurin menyebabkan kerusakan yang ekstensif pada membran dengan cara merusak protein ekstraseluler asam nukleat dan menurunkan aktivitas enzim tertentu serta mempunyai aktivitas antimikroorganisme dengan spektrum luas meliputi bakteri gram positif, khamir dan jamur serta sebagian bakteri gram negatif (Asriani, 2006). Beberapa bakteri yang dapat dihambat oleh monolaurin adalah *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus* dan *Bacillus subtilis*. Monolaurin juga mampu menghancurkan virus herpes dan HIV-1 serta menurunkan resiko penularan virus ini pada bayi dari ibu hamil yang terinfeksi HIV (Kitu, 2000).

Pada pengujian yang dilakukan oleh Beuchat (1980) yang membandingkan aktivitas antibakteri dari monolaurin, natrium benzoat dan asam sorbat menggunakan bakteri penguji *Vibrio parahaemolyticus*, diperoleh hasil bahwa antibakteri yang lebih aktif adalah monolaurin. Hal ini sejalan dengan pernyataan Branen dan Davidson (1993) yang menyatakan bahwa ester monoasilgliserol dalam bentuk monolaurin dan monokaprin memiliki daya anti bakteri yang kuat terhadap *B. Cereus*, *S. Aureus* dan *B. Subtilis*, dimana daya anti bakteri tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan daya anti bakteri asam sorbat (Asriani, 2006).

Monoasilgliserol diproduksi secara komersial melalui reaksi gliserolisis lemak dan minyak secara kontinu pada temperatur tinggi (220-250°C) menggunakan katalis alkali seperti NaOH, Ca(OH)₂, NaHCO₃. Namun produk yang diproduksi dengan cara ini mempunyai banyak kekurangan. Gliserol yang

digunakan harus berlebih, selain itu terbentuk warna produk yang gelap dan bau yang tidak menyenangkan. Bau dan warna yang terdapat dalam proses reaksi berasal dari degradasi minyak dan gliserol. Perolehan monoasilgliserol juga rendah (30-40%). Destilasi molekular diperlukan untuk memperoleh monoasilgliserol yang murni (Kaewthong, 2004; Sari, 2009).

Selain menggunakan katalis kimia, produksi monoasilgliserol dapat dilakukan dengan cara yang lebih ramah (*mild*), yaitu dengan menggunakan biokatalisator seperti enzim lipase yang berlangsung pada temperatur rendah. Pada temperatur kamar/temperatur ruang lipase dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi asam lemak bebas dengan gliserol menghasilkan monoasilgliserol. Gliserolisis secara enzimatik menghasilkan produk yang tidak berwarna dan tidak berbau serta memiliki hasil samping yang relatif lebih rendah (August, 2000).

Rendemen monoasilgliserol yang terbentuk tergantung pada jenis minyak, sumber lipase, perbandingan antara minyak dan gliserol, pH, suhu, waktu reaksi dan substrat. Tujuan yang ingin dicapai adalah memproduksi monoasilgliserol dalam jumlah yang besar dan meminimalisasi kadar triasilgliserol yang terkandung di dalamnya. Penggunaan lipase dengan jumlah yang sama pada pembuatan monoasilgliserol dari minyak kelapa dan lemak susu menghasilkan rendemen yang berbeda, rendemen monoasilgliserol dari minyak kelapa diatas 70 persen sedangkan dari lemak susu tidak lebih dari 60 persen (Anggirasti, 2008 dan August, 2000).

Monoasilgliserol yang diperoleh secara esterifikasi dengan lipase sn-1,3 berbeda dengan yang diperoleh secara kimia, karena pada esterifikasi transfer asil terjadi pada posisi 1 atau 3, dengan demikian emulsifier yang dihasilkan lebih baik, karena gugus lipofilik terdapat pada posisi 1 dan 3. Monoasilgliserol dan diasilgliserol dimurnikan dengan teknik pemisahan seperti destilasi, sedangkan untuk skala laboratorium dilakukan dengan cara kromatografi kolom (AOAC, 1980) dan fraksionasi pelarut.

Monoasilgliserol dapat diproduksi dengan menggunakan berbagai jenis minyak, salah satunya adalah minyak kelapa. Monoasilgliserol dari minyak kelapa

mempunyai peluang yang cukup tinggi sebagai bahan pengawet pangan, sebab memiliki sifat antimikroba yang tidak dimiliki monoasilgliserol dari minyak nabati lain. Monoasilgliserol dari minyak kelapa mempunyai sifat antimikroorganisme yang lebih efektif dibandingkan dengan monolaurin dalam menghambat *Listeria monositogenes* baik secara invitro maupun dalam susu pasteurisasi. Hal ini disebabkan karena asam lemak minyak kelapa didominasi oleh asam lemak jenuh rantai pendek dan menengah (C8-C14), sedangkan asam lemak dari minyak nabati lain dan lemak susu didominasi oleh asam lemak rantai panjang (C16-C18) jenuh dan tidak jenuh. Monoasilgliserol yang berasal dari asam lemak rantai pendek dan menengah berperan sebagai anti mikroba, sedangkan monoasilgliserol yang berasal dari asam lemak rantai panjang jenuh dan tidak jenuh tidak berfungsi sebagai anti mikroba (August, 2000). Hasil penelitian Mappiratu (1999) menunjukkan zona penghambatan monoasilgliserol dari minyak kelapa terhadap bakteri gram positif lebih tinggi dibandingkan bakteri gram negatif. Zona penghambatan terhadap khamir dan kapang lebih rendah dibandingkan dengan bakteri gram positif (Asriani, 2006).

Minyak kelapa adalah minyak yang dibuat dari daging buah kelapa (*Cocos nucifera sp*). Minyak kelapa dapat dipergunakan untuk keperluan pangan, seperti minyak goreng, bahan margarin dan mentega putih (*shortening*). Minyak kelapa juga digunakan untuk keperluan non pangan seperti minyak lampu, bahan sabun, dan kosmetika.

Minyak kelapa dapat diperoleh dengan beberapa metoda ekstraksi. Metoda tradisional adalah metoda pengolahan basah (ekstraksi) dengan pemasakan santan yang menghasilkan minyak klentik. Metoda yang digunakan di industri adalah metoda pengepresan daging kelapa yang telah dikeringkan (kopra) atau kelapa parut yang telah disangrai serta metoda degradasi protein dengan enzim atau asam. Pengolahan secara industri dapat memperoleh hampir 95% kandungan minyak kelapa dengan kualitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metoda tradisional. Minyak hasil ekstraksi ini umumnya digunakan untuk keperluan rumah tangga (minyak goreng).

Masing masing metoda memiliki kelemahan yang berkaitan dengan proses yang terjadi saat ekstraksi, dan akan menurunkan mutu minyak yang dihasilkan. Pada proses pemasakan santan, terdapat peristiwa pencampuran minyak dengan air saat pembuatan santan, serta pemasakan santan dengan temperatur tinggi. Peristiwa ini akan menyebabkan terjadinya proses hidrolisis dan oksidasi pada minyak, sedangkan pada proses penyangraian kelapa parut dan pemanasan pada temperatur tinggi pada kelapa parut dapat menyebabkan terjadinya polimerisasi serta oksidasi pada minyak.

Minyak kelapa mempunyai aroma yang khas, merupakan lemak yang berwarna putih, sampai kuning muda tergantung kualitas bahan baku dan metoda ekstraksinya, yang akan membeku pada temperatur dibawah 26 derajat Celcius. Minyak kelapa mengandung 84 persen trigliserida dengan tiga molekul asam lemak jenuh, 12 persen trigliserida dengan dua asam lemak jenuh, 4 persen trigliserida dengan satu asam lemak jenuh. Kandungan asam lemak tidak jenuh hanya berkisar antara 6.5 - 11.8 persen sehingga minyak kelapa termasuk minyak yang stabil, karena kerusakan atau ketengikan minyak disebabkan oleh proses hidrolisis, oksidasi dan enzimatis, yang biasanya menyerang pada ikatan tidak jenuh pada asam lemak.

Monoasilgliserol dari minyak kelapa memiliki komposisi 74-83% C8-C14 dan 43-48% C12 yang paling aktif dalam aktivitasnya sebagai antimikroorganisme dibandingkan dengan asam lemak lainnya. Monoasilgliserol dari minyak kelapa memiliki aktivitas anti listerial tertinggi pada temperatur 4°C, karena pada temperatur yang lebih rendah bakteri akan mengubah komposisi fosfolipid pada membran sitoplasmanya yang sangat berpengaruh pada fluiditas membrannya (August, 2000).

