STUDI *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* PADA SINTESIS LAUROIL-DIETANOLAMIDA DAN LAUROIL-N-METIL GLUKAMIDA MENGGUNAKAN ENZIM LIPASE

Zuhrina Masyithah[1)], Tjahjono Herawan, Seri Bima Sembiring[2)], dan Zul Alfian[2)]

Abstrak Enzim Novozym 435® (lipase dari *Candida antarctica*) digunakan sebagai katalis lipase komersial pada amidifikasi N-metil glukamina (MGL) dan dietanolamina (DEA) dengan asam laurat (AL), untuk mensintesis lauroil-N-metil glukamida dan lauroil-dietanolamida. *Response Surface Methodology* (RSM) dengan lima tingkat, tiga variabel desain, digunakan pada kajian ini untuk dua maksud, pertama untuk mengkaji pengaruh interaksi parameter di dalam reaksi, dan kedua untuk menentukan nilai perolehan optimal. Peningkatan konsentrasi enzim, rasio molar substrat, dan temperatur, secara simultan meningkatkan persentase perolehan pada kedua reaksi, akan tetapi efek temperatur tidak begitu nyata pada reaksi DEA. Kondisi optimum yang diprediksi untuk kedua reaksi adalah rasio molar substrat amina/AL, 1/1; konsentrasi Novozym, 10-11 % serta temperatur 50-55 °C. Reaksi pada kondisi optimum akan menghasilkan perolehan 97,59 % untuk lauroil N-metil glukamida dan 77,82 % untuk lauroil-dietanolamida.

Kata kunci: konsentrasi lipase, lauroil dietanolamida, lauroil-N-metil glukamida, *Response Surface Methodology,* rasio molar substrat, temperatur.

Abstract *Novozyme 435® (Candida antarctica lipase) was used as a commercial lipase catalyst on the amidification of the N-methyl glucamine (MGL) and diethanolamine (DEA) with lauric acid (AL), in order to synthesize the lauroyl-N-methylglucamide and lauroyl-diethanolamide, respectively. The Response Surface Methodology (RSM) in five levels and three-variable design was utilized in this study for two purposes. Firstly was aimed to study the effects of parameter interaction during reaction, and secondly was to determine the optimum yield value. The increasing of enzyme concentration, the ratio of molar substrate and temperature were found simultaneously increasing the yield percentage on both reactions, however, the effect of temperature was insignificant on DEA reaction. The predicted optimum conditions on both reactions were at Novozyme concentration 10-11 %, molar substrate ratio of amine/AL 1/1 and temperature of 50-55 °C. The reaction at the optimized conditions produced yield of 97,59 % for lauroyl-N-methyl glucamide and 77,82 % for lauroyl-diethanolamide.*

Keywords: *lipase concentration, lauroyl-diethanolamide, lauroyl-N-methyl glucamide, Response Surface Methodology, substrate molar ratio, temperature.*

PENDAHULUAN

Alkanolamida merupakan surfaktan yang mempunyai biokompatibilitas, kemampuan emulsi dan sifat antimikrobial yang sangat baik sehingga bermanfaat untuk digunakan sebagai bahan aditif pada kosmetik dan produk farmasi (Soledad, C. *et al.*, 2000). Surfaktan alkanolamida biasanya dibuat secara kimiawi dimana diperlukan proteksi dan deproteksi gugus hidroksil, aktivasi asam lemak, menggunakan pelarut serta katalis yang toksik, serta juga menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan. Beberapa peneliti mencoba mengatasi masalah ini dengan menggunakan katalis enzim untuk memproduksi surfaktan alkanolamida (Dolores, R.D *et al.*, 2002; Maugard, T *et al.*, 1997; Par TufVesson, P. *et al.*, 2007, Rahman, A. *et al.*, 2003).

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

[1)] Zuhrina Masyithah (✉)
Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik USU,
Medan, Sumatera Utara
email: zuhrina@yahoo.com

[3)] Laboratorium Kimia Anorganik,
Departemen Kimia FMIPA - USU
Medan, Sumatera Utara

Naskah masuk : 25 Juni 2008; Naskah diterima : 30 Maret 2009

Sintesis enzimatik alkanolamida telah dilakukan antara lain oleh Maugard *et al.* (1997) melalui reaksi transasilasi metil ester asam lemak (MEAL) dari minyak Corza sebagai sumber asam lemak dan N-metil-glukamina sebagai sumber amina. Reaksi dijalankan pada suhu 90°C dan tekanan 500 mBar menggunakan pelarut organik 2-metil-2-butanol dengan katalis lipase dari *Candida antarctica* (Novozym 435®). Maugard *et al.* (1997) juga mencoba untuk mensintesis N-metil glukamida menggunakan etil ester. Hasil samping berupa etanol dihilangkan dengan bekerja pada suhu tinggi dan tekanan mendekati vakum. Mereka melaporkan bahwa rasio etil ester/amina sangat menentukan efisiensi dan kemoselektifitas reaksi enzimatik alkanolamida.

Sintesis enzimatik alkanolamida menggunakan vanililamina dan asam oleat, katalis Novozym 435®, pelarut n-heksan dan 2-metil-2-butanol telah dilakukan oleh Dolores *et al.* (2002). Reaksi dijalankan pada suhu 45°C dan produk samping berupa air yang berlebih tetap merupakan permasalahan karena akan memperlambat keseimbangan reaksi. Selain rasio asam/amina, dilaporkan pula bahwa suhu, persentase berat katalis dan waktu reaksi merupakan variabel yang menentukan efektifitas proses.

Fokus penelitian sintesis alkanolamida selama ini adalah pada metode sintesis dan hubungan gugus fungsi dari kedua komponen (Maugard, T. *et al.*, 1997; Rahman, A. *et al.*, 2003; dan Soledad, C. *et al.*, 2000), untuk itu masih diperlukan kajian sistematis tentang pengaruh parameter reaksi terhadap perolehan yang diperoleh. Lebih lanjut diamati bahwa selama ini pengamatan dilakukan secara konvensional yaitu hanya mengamati pengaruh satu parameter terhadap perolehan, dan bukan pengaruh interaksi parameter terhadap perolehan, sehingga memahami dan memodelkan kedua pengaruh individu dan interaksi merupakan hal yang berguna untuk reaksi agar dapat dioptimisasikan dan diperoleh perolehan yang maksimum.

Metode statistik yang biasa digunakan untuk tujuan ini dalam *Response Surface Methodology* (RSM), dimana dua parameter reaksi dapat secara simultan diprogram untuk mengolah data yang diperoleh dan mengembangkan model empiris yang sesuai. RSM telah berhasil digunakan untuk diaplikasikan pada kajian dan optimisasi dari sintesis surfaktan asam amino (Soo, *et al.*, 2004) dan ester asam laktat (Kiran, KR *et al.*, 2000). Selain itu *Response Surface Methodology* juga telah berhasil digunakan untuk mengamati pengaruh interaksi variabel reaksi terhadap persentase konversi asam lemak pada sintesis surfaktan lauroil-dietanolamida secara enzimatik (Masyithah, *et al.*, 2008). Pada kajian ini, RSM digunakan untuk mengamati pengaruh interaksi variabel reaksi terhadap perolehan (*yield*) pada sintesis dua jenis alkanolamida yaitu lauroil-dietanolamida dan lauroil-N-metil glukamida. Substrat dan variabel yang dipilih didasarkan pada percobaan pendahuluan yang telah dilakukan (Masyithah *et al.*, 2008).

BAHAN DAN METODE

Pada sintesis lauroil-dietanolamida dan lauroil-N-metil glukamida diamati pengaruh individu maupun interaksi dari variabel percobaan mengunakan *Response Surface Methodology*. Tahapan penelitian meliputi:

Penyediaan bahan

Bahan yang digunakan adalah dua jenis alkanolamina yaitu N-metil glukamina dan dietanolamina masing-masing dari E Merck, serta satu jenis asam lemak yaitu asam laurat. Enzim yang digunakan adalah Novozym 435 (lipase dari *Candida antarctica* yang diimobilisasi pada resin *acrylic*) diperoleh dari Novo Industries (Denmark). Pelarut yang digunakan adalah n-heksan dan 2-metil-2-butanol masing-masing dari E Merck. Pemilihan jenis enzim dan pelarut didasarkan pada hasil terbaik penelitian tahap pendahuluan yang telah terlebih dahulu dilakukan (Masyithah *et al.*, 2008).

Setup peralatan

Peralatan yang digunakan adalah *hot plate*, labu bertutup, pengaduk magnetik dan penangas yang berisi *mineral oil*.

Sintesis Alkanolamida

Pada tahap ini diamati dua reaksi amidasi yaitu lauroil-N-metil glukamida dan sintesis lauroil-dietanolamida, dengan skema reaksi berturut-turut pada Gambar 1 dan 2. Reaksi dilakukan menggunakan labu bertutup 250 ml dengan volume akhir 45 ml yang terdiri dari asam laurat (0,05 mol; 10 gr) dan N-metil glukamina atau dietanolamina. Reaksi

asam laurat dengan N-metil glukamina menggunakan pelarut 2-metil-2-butanol sedangkan reaksi asam laurat dengan dietanolamina menggunakan pelarut n-heksan. Sejumlah enzim Novozym (lipase dari *Candida antarctica* dari Novo Industries, Denmark) juga ditambahkan ke dalam reaksi. Setelah itu diinkubasi dengan pengadukan kontinu (350 rpm) selama 24 jam (sintesis lauroil dietanolamida) dan 48 jam (sintesis lauroil N-metil glukamida) pada temperatur tertentu.

Pemurnian dan Analisa

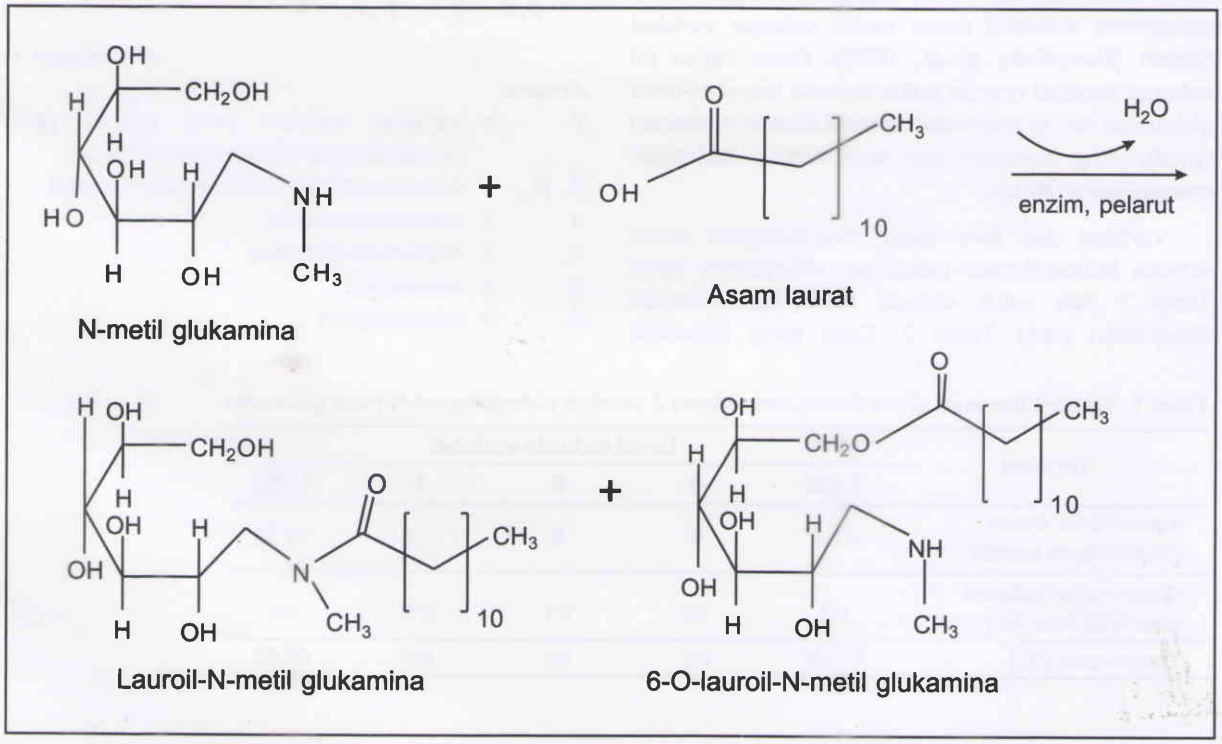
Pemurnian produk dilakukan dengan melarutkan campuran produk dalam heksan teknis dan dipisahkan dari enzim dengan menggunakan *filter vacuum*. Produk amida yang bercampur dengan n-heksan dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 90°C. Produk yang masih mengandung asam laurat dan amina berlebih selanjutnya dicuci dengan aseton. Aseton akan melarutkan asam laurat sedangkan fraksi yang tidak larut adalah amida dan amina. Produk amida dan amina sisa diperoleh sebagai lapisan bawah dan asam laurat akan larut bersama aseton sebagan produk atas.

Analisa sampel yang dilakukan terdiri dari:

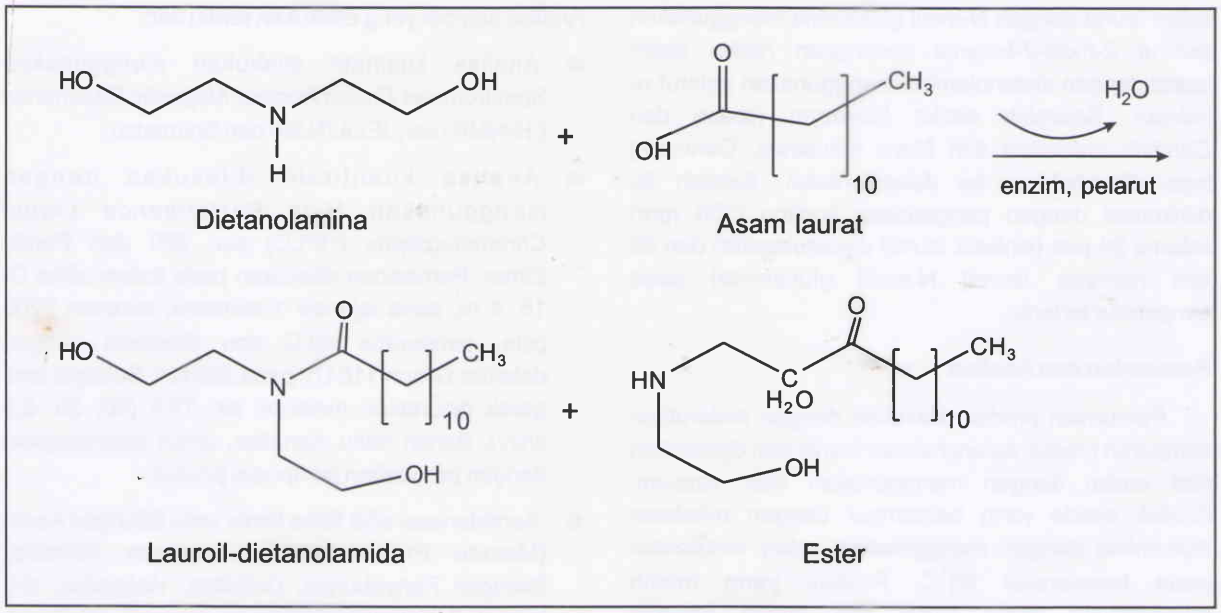
- Analisa kualitatif dilakukan menggunakan Spektrometer *Proton Nuclear Magnetic Resonance* (^{1}H-NMR) seri JEOL/NJ60 dari Shimadzu.
- Analisa kuantitatif dilakukan dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) seri 200 dari Perkin Elmer. Pemisahan dilakukan pada kolom silika C-18, 4 m, pada laju alir 1 ml/menit, tekanan 2200 psia, temperatur 40°C dan dideteksi dengan detektor Gilson 116 UV pada 280 nm. Sebagai fasa gerak digunakan metanol: air: TFA (80: 20: 0,3 v/v/v). Bahan baku dianalisa, untuk dibandingkan dengan perubahan komposisi produk.
- Karakterisasi sifat fisika kimia yaitu Bilangan Asam (Metode PORIM 1995), Bilangan Hidroksi, Bilangan Penyabunan, Densitas, Viskositas, pH, Nilai HLB, Kelarutan (dalam air, metanol, n-heksan, aseton).

Desain Eksperimen

Pengaruh individu maupun interaktif pada sintesis alkanolamida dioptimisasikan dengan variabel lainnya



Gambar 1. Skema reaksi pembentukan lauroil-N-metil glukamida dari asam laurat dan N-metil glukamina



Gambar 2. Skema reaksi pembentukan lauroil-dietanolamida dari asam laurat dan dietanolamina

untuk mencapai persentase perolehan yang maksimum menggunakan *Response Surface Methodology* (Montgomery, 1997). Optimasi sintesis lauroil-dietanolamida telah diamati mengguna-kan persentase konversi asam laurat sebagai variabel respon (Masyithah, *et al.*, 2008). Pada kajian ini sebagai variabel respon untuk sintesis lauroil-N-metil glukamida dan lauroil-dietanolamida adalah perolehan (*yield*), yang diperoleh dari hasil analisa kuantitatif menggunakan HPLC.

Variabel dan level yang dikembangkan untuk sintesis lauroil-N-metil glukamida ditunjukkan pada Tabel 1 dan untuk sintesis lauroil-dietanolamida ditunjukkan pada Tabel 2. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan regresi berganda untuk memenuhi persamaan polinomial berikut:

$$Y = \beta_1+\beta_2 X_1+\beta_3 X_2+\beta_4 X_3+\beta_5 X_1 \beta X_2+\beta_6 X_2 X_3+\beta_7 X_1 X_3 + \beta_8 X_1^2+\beta_9 X_2^2+\beta_{10} X_3^2 + \varepsilon$$

(Persamaan 1)

dimana:

Y	=	variabel respon yang diukur yaitu persentase perolehan alkanolamida
β_1- β_{10}	=	konstanta linier, kuadratik dan interaksi
X_1	=	konsentrasi enzim
X_2	=	rasio molar substrat
X_3	=	temperatur
ε	=	residual/galat

Tabel 1. Variabel dan level untuk desain eksperimen 3 variabel sintesis lauroil-N-metil glukamida

Variabel	Level terkode variabel				
	-1,682	**-1**	**0**	**1**	**1,682**
Konsentrasi enzim (%,b/b asam laurat)	4,64	6	8	10	11,36
Rasio molar substrat (mol MGL/mol AL)	1/3	1/2	1/1	2/1	3/1
Temperatur (°C)	33,18	40	50	60	66,82

Tabel 2. Variabel dan level untuk desain eksperimen 3 variabel sintesis lauroil-dietanolamida

Variabel	Level terkode variabel				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Konsentrasi enzim (%,b/b asam laurat)	6,64	8	10	12	13,36
Rasio molar substrat (mol MGL/mol AL)	1,3/1	2/1	3/1	4/1	4,7/1
Temperatur (°C)	41,6	45	50	55	58,4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa Data

Analisa HPLC dilakukan untuk mengetahui perolehan produk alkanolamida. Standar dari komposisi bahan baku dan produk ditentukan dari perbedaan waktu retensi yang dihasilkan antara bahan baku dan produk. Hal ini memungkinkan untuk dilakukan karena bahan baku berasal dari bahan yang hampir murni (kemurnian > 99%).

Disamping itu, analisa spektra HPLC dilakukan dengan beberapa pertimbangan yang merujuk dari literatur sebagai berikut:

1. Analisa yang dilakukan oleh Par Tufvesson *et al.* (2007) pada sintesis asam laurat dengan etanolamina menghasilkan lauroil-etanolamida. Analisa asam laurat, amida dan amida ester dilakukan menggunakan HPLC pada kolom fasa Kromasil C18 dari Chromtech (150x4,6 mm, 5 mm, 100A)) menggunakan Perkin Elmer HPLC system Seri 200. Menurut Par Tufvesson *et al.* (2007) waktu retensi untuk amida 3,4 menit, asam laurat 5,4 menit dan amida ester 14,2 menit.
2. Analisa yang dilakukan oleh Maugard *et al.* (1998) pada sintesis asam oleat dengan N-metil glukamina menghasilkan oleoil-N-metil glukamida. Analisa menggunakan HPLC ini menggunakan kolom Supelcosil LC 18, 5 m (250 x 4,6 mm) menggunakan fasa gerak metanol:air:TFA (80: 20: 0,3 v/v/v). Menurut Maugard *et al.* (1998) waktu retensi N-metil-glukamina tercatat pada menit ke-2, amida menit ke 6,3 dan asam oleat menit ke 11,45.

Pengamatan spektra HPLC menunjukkan bahwa bahan baku yang digunakan pada sintesis lauroil- N-metil glukamida yaitu asam laurat dan N-metil glukamina masing masing mempunyai waktu retensi 7-8,5 menit dan 1,5-1,6 menit, sementara produk yang dihasilkan yaitu lauroil-N-metil glukamida mempunyai waktu retensi 3,5-4,2 menit.

Pengamatan spektra HPLC juga menunjukkan bahwa bahan baku yang digunakan pada sintesis lauroil-dietanolamida yaitu asam laurat dan dietanolamina masing masing mempunyai waktu retensi 7-8,5 menit dan 1,4-1,6 menit, sementara produk yang dihasilkan yaitu lauroil-dietanolamida mempunyai waktu retensi 3,8-4,6 menit. Pada beberapa sampel, pada menit ke 4,8 juga ditemukan amida-ester yaitu N-O-dilauroil-dietanolamida. Kombinasi level terkode dan perolehan surfaktan hasil analisa spektra HPLC untuk kedua sintesis ditunjukkan pada Tabel 3.

Plot *Response Surface*

Koefisien dari model empiris dan hasil analisa statistik diperoleh menggunakan perangkat lunak Minitab R.14®. Model persamaan yang dapat menunjukkan hubungan variabel reaksi dan interaksinya terhadap persentase perolehan alkanolamida diperoleh sebagai berikut:

$$Y_{AL+MGL} = 97{,}5941 - 0{,}943X_1 + 1{,}8084X_2 - 1{,}9075X_3 - 0{,}7573X_1^2 + 0{,}1416X_2^2 - 0{,}3401X_3^2$$

(Persamaan 2)

$$Y_{AL+DEA} = 77{,}819 + 6{,}348X_1 - 10{,}399X_2 - 11{,}806X_3 + 1{,}732X_1^2 + 4{,}715X_2^2 - 2{,}464X_3^2$$

(Persamaan 3)

Dari persamaan (2) dan (3) diperoleh bahwa persentase perolehan optimum pada reaksi asam laurat dengan N-metil glukamina (AL+MGL) adalah 97,59 % dan reaksi asam laurat dengan dietanolamina (AL+DEA) adalah 77,82 %. Persamaan (2) dan (3) selanjutnya digunakan untuk memplot data pada

Tabel 3. Kombinasi level terkode dan perolehan surfaktan

Nomor Percobaan	Konsentrasi enzim (X_1)	Rasio molar substrat (X_2)	Temperatur (X_3)	Perolehan Sintesis 1*)	Perolehan Sintesis 2*)
1	-1	-1	-1	100.000	97.310
2	1	-1	-1	100.000	97.740
3	-1	1	-1	98.715	87.575
4	1	1	-1	98.595	92.100
5	-1	-1	1	96.180	96.960
6	1	-1	1	76.980	97.985
7	-1	1	1	100.000	35.815
8	1	1	1	98.520	68.600
9	-1.682	0	0	93.825	64.995
10	1.682	0	0	98.535	93.490
11	0	-1.682	0	98.120	98.415
12	0	1.682	0	99.325	76.945
13	0	0	-1.682	97.485	92.905
14	0	0	1.682	97.235	41.845
15	0	0	0	98.795	89.615
16	0	0	0	97.495	42.725
17	0	0	0	97.610	17.815
18	0	0	0	96.600	85.605
19	0	0	0	96.795	94.905
20	0	0	0	98.020	67.440

Keterangan:
Sintesis 1: sintesis lauroil-N-metil glukamida dari asam laurat dan N-metil glukamina
Sintesis 2: sintesis lauroil-dietanolamida dari asam laurat dan dietanolamina

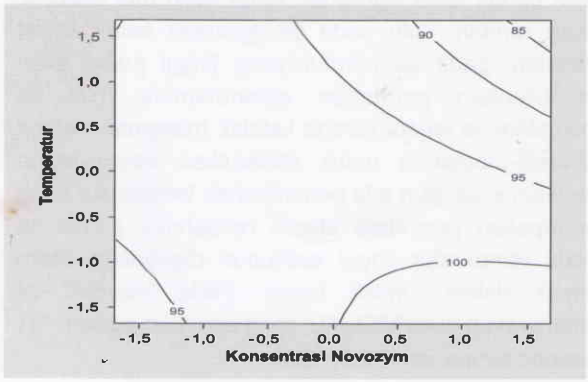
response surface. Dua parameter diplot pada tiap waktu di aksis X dan Y dan satu parameter lainnya diset pada nilai titik pusat (*center point*) yaitu pada level terkode 0 untuk melihat respon persentase perolehan pada aksis Z.

Pengaruh Konsentrasi Enzim dan Temperatur

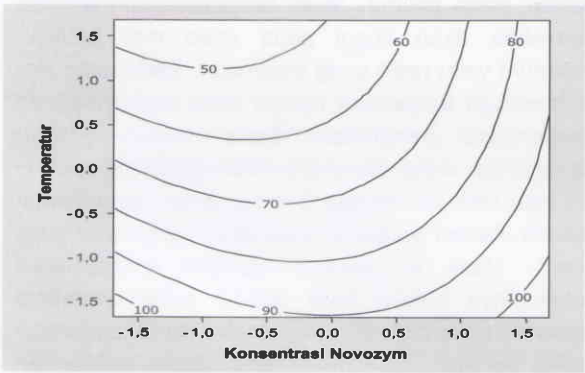
Pengamatan secara simultan konsentrasi Novozym dan temperatur terhadap persentase perolehan alkanolamida untuk reaksi AL+MGL dan AL+DEA ditunjukkan pada Gambar 3 dan Gambar 4. Secara umum, peningkatan temperatur maupun konsentrasi enzim kedua-duanya meningkatkan perolehan pada reaksi AL+MGL dan Al+DEA. Pada reaksi AL+MGL, peningkatan temperatur akan meningkatkan perolehan secara linier jika digunakan konsentrasi Novozym level -1,5 (5%) hingga 0 (8%). Akan tetapi efek panas menjadi kurang signifikan pada reaksi AL+DEA dimana peningkatan temperatur hanya meningkatkan perolehan jika konsentrasi enzim juga tinggi (level 0-1 atau 10-12% b/b AL) dan justru menurunkan persentase perolehan pada temperatur lebih besar dari 50 °C dan konsentrasi Novozym yang kecil (level < 0,6 - 10 %).

Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan sifat fisik substrat amina yang digunakan. MGL mempunyai titik lebur yang tinggi yaitu 128-131°C dan berbentuk padat pada suhu kamar (Merck, 2008). Penggunaan temperatur yang tinggi dan penggunaan pelarut 2-metil-2-butanol yang bersifat polar protik akan meningkatkan fraksi cairnya dan memudahkan terjadinya reaksi. Berbeda dengan N-metil glukamina, sumber amina sintesis lauroil-dietanolamida yaitu dietanolamina, mempunyai titik lebur yang rendah yaitu 28°C (Merck, 2008) dan membuat temperatur yang tinggi tidak diperlukan pada bahan baku fraksi cair. Kontrasnya, dietanolamina sedikit larut di dalam pelarut n-heksan yang digunakan. Reaksinya dengan asam laurat mungkin dilakukan karena kelarutannya dengan asam lemak melalui pembentukan kompleks

pasangan ion asam/amina. Pasangan ion ini kemudian bereaksi dengan asil enzim untuk membentuk alkanolamida.



Gambar 3. Respon kontur dari plot konsentrasi Novozym dan temperatur terhadap persentase perolehan lauroil-N-metil glukamida.



Gambar 4. Respon kontur dari plot konsentrasi Novozym dan temperatur terhadap persentase perolehan lauroil-dietanolamida.

Pengaruh Konsentrasi Enzim dan Rasio Mol Substrat

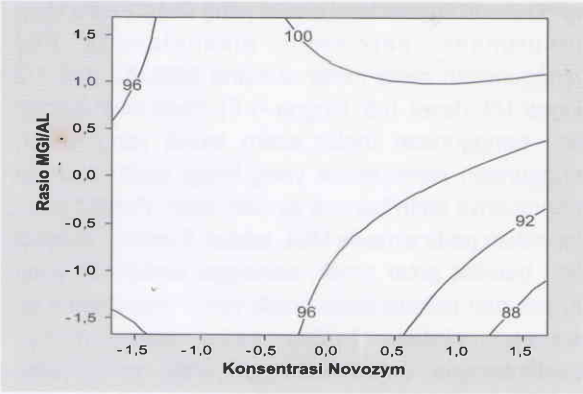
Gambar 5 dan 6 menunjukkan kontur permukaan konsentrasi enzim dan rasio mol substrat yang digunakan untuk reaksi AL+MGL dan AL+DEA. Secara umum, interaksi positif kelihatan pada kedua donor amina yang digunakan dimana peningkatan perolehan terjadi pada peningkatan secara paralel rasio mol substrat dengan jumlah enzim. Penggunaan sejumlah besar substrat dan enzim secara umum meningkatkan kemungkinan enzim-substrat akan bertubrukan dan terjadi reaksi rantai. Profil pada Gambar 5 juga menunjukkan bahwa perolehan yang tinggi mungkin terjadi pada penggunaan sejumlah kecil enzim jika digunakan jumlah substrat yang besar. Hal ini bermanfaat sebagai gambaran ekonomi karena harga enzim biasanya lebih mahal dari substrat.

Pada reaksi AL+MGL, seluruh rentang rasio molar substrat yang digunakan memberikan perolehan alkanolamida yang tinggi. Akan tetapi peningkatan penggunaan konsentrasi enzim yang tinggi justru akan menurunkan perolehan alkanolamida jika menggunakan rasio molar substrat MGL/AL dari 1/2 hingga 1/3 (level -0,5 hingga -1.5). Pada level rendah yaitu penggunaan molar asam laurat yang besar, penggunaan asam laurat yang tinggi justru memicu terbentuknya lebih banyak air dan ester. Pelarut yang digunakan pada sintesis MGL adalah 2-metil-2 butanol yang bersifat polar protik, sehingga jumlah air yang banyak dan pelarut polar protik yang mengambil air esensial sistem justru akan mengganggu kesetimbangan enzim sehingga akan mengurangi perolehan alkanolamida. Hasil terbaik dari interaksi kedua parameter ini diperkirakan berada pada rasio mol N-metil glukamina dengan asam laurat 1/1 dan konsentrasi Novozym 10 % (b/b AL) dengan perolehan mencapai 97,59 %.

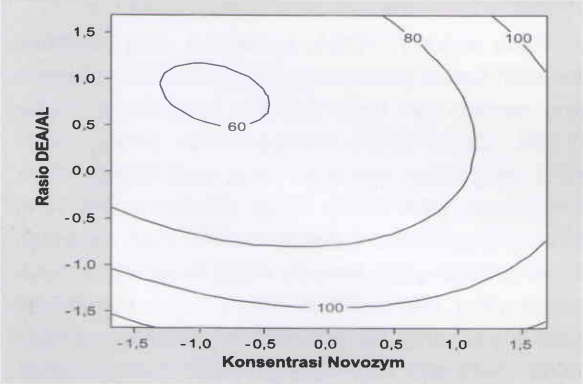
Pada reaksi AL+DEA, perolehan yang minimum diperoleh hanya pada penggunaan konsentrasi enzim yang rendah dan rasio substrat yang tinggi. Rasio DEA/AL dipilih selalu menggunakan jumlah asam laurat yang tetap, sehingga pada level tinggi artinya penggunaan DEA cukup besar. Jumlah amina yang besar mengakibatkan diakhir reaksi akan diperoleh amina berlebih yang banyak. Pada tahap pemurnian, aseton yang ditambahkan hanya akan melarutkan asam laurat yang masih tersisa dan tidak melarutkan amina, sehingga hasil pengamatan menggunakan HPLC menemukan bahwa perolehan amida pada rasio molar substrat DEA/AL yang besar akan rendah karena masih banyak dietanolamina yang terdapat bersama produk. Untuk penggunaan enzim yang minimum (level 0, 10 % b/b AL), hasil terbaik dari interaksi kedua parameter ini diperkirakan berada pada rasio mol dietanolamina dengan asam laurat 1/1 sampai 2/1 dan konsentrasi Novozym 10 % (b/b AL) dengan perolehan mencapai 77,82 %.

Pada peningkatan konsentrasi asam laurat, hidrolisis cenderung untuk mengurangi sintesis yang diinginkan dan menghasilkan perolehan yang besar, tidak hanya produk yang diinginkan tetapi juga produk samping seperti air. Adanya air diperlukan oleh enzim hanya saja konsentrasi enzim yang diperlukan bergantung pada konsentrasi dan sifat kimia substrat.

Sifat kimia dari substrat yang digunakan, satu hidrofobik dan yang lainnya hidrofilik, dapat secara signifikan merubah distribusi di dalam sistem, mempengaruhi aktivitas enzim, stabilitas dan laju relatif hidrolisis dan sintesis (*Dolores, R.D et al., 2002*).



Gambar 5. Respon kontur dari plot konsentrasi Novozym dan rasio mol N-metil glukamina/asam laurat terhadap persentase perolehan lautil-N-metil glukamida.



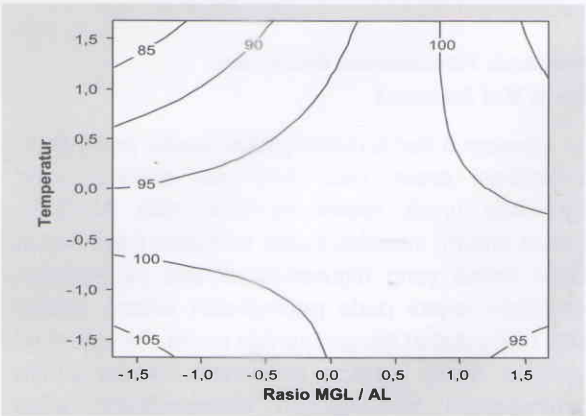
Gambar 6. Respon kontur dari plot konsentrasi Novozym dan rasio mol dietanolamina/asam laurat terhadap persentase perolehan lauroil-dietanolamida.

Pengaruh Rasio Mol Substrat dan Temperatur

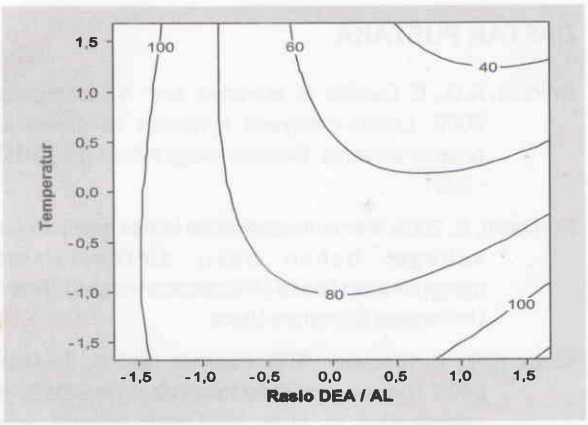
Pengaruh kombinasi rasio mol substrat dan temperatur pada reaksi AL+MGL dan AL+DEA ditunjukkan pada Gambar 7 dan 8 secara berturutan. Kedua reaksi kelihatan mempunyai kecenderungan yang sama yaitu peningkatan baik rasio mol substrat maupun temperatur mempunyai efek positif dan signifikan pada kedua parameter. Dari kedua reaksi perolehan terbaik umumnya diperoleh pada rasio mol amina/asam yang equimolar (AL+MGL level 0 dan AL+DEA level -1,5).

Pada reaksi AL+MGL diperoleh bahwa peningkatan temperatur dan konsentrasi substrat lemak secara sinergis meningkatkan hasil, dimana efek panas lebih signifikan. Pada rasio mol MGL/AL yang rendah yaitu pada penggunaan asam laurat berlebih, pada temperatur yang tinggi justru akan menurunkan perolehan alkanolamida. Hal ini kelihatannya terjadi karena ketidak mampuan pelarut (2-metil-2-butanol) untuk melarutkan asam laurat berlebih walaupun ada penambahan temperatur yang merupakan penyebab utama rendahnya perolehan pada temperatur tinggi walaupun digunakan asam lemak dalam jumlah besar. Pada interaksi ini diperkirakan rasio MGL/AL yang optimum adalah 1/1 dengan temperatur 50-55 °C.

Profil Gambar 8 menunjukkan kontur reaksi AL+DEA pada pengamatan interaksi rasio mol dan temperatur terhadap persentase perolehan. Diamati bahwa pada seluruh level temperatur, persentase perolehan akan tinggi pada rasio mol DEA/AL minimum yaitu rasio yang equimolar. Pada rasio mol ini kenaikan temperatur hampir tidak mempengaruhi persentase perolehan dietanolamida. Pada penggunaan dietanolamina berlebih (rasio mol level 1-1,5 atau rasio 4/1 hingga 5/1) perolehan yang sangat rendah diamati walaupun digunakan temperatur yang tinggi. Hasil ini sejalan dengan pengamatan sebelumnya bahwa hasil terbaik pada umumnya diperoleh pada rasio yang equimolar dan penggunaan amina berlebih akan menyulitkan dalam pemurnian hasil (Masyithah, *et al.*, 2008).



Gambar 7. Respon kontur dari plot rasio mol N-metil glukamina/asam laurat dan temperatur terhadap persentase perolehan lautil-N-metil glukamida.



Gambar 8. Respon kontur dari plot rasio mol dietanolamina/asam laurat dan temperatur terhadap persentase perolehan lauroil-dietanolamida.

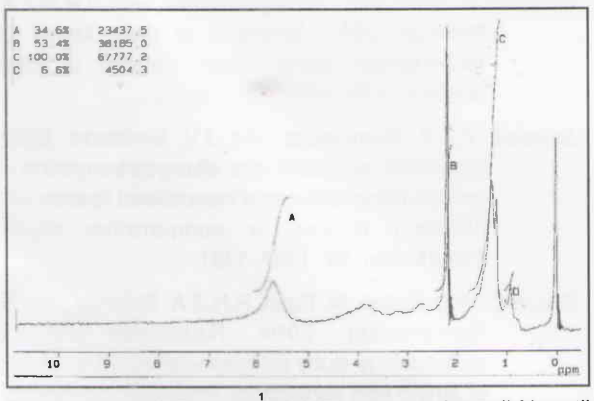
Analisa spektra ^{1}H-NMR

Spektra ^{1}H-NMR diperoleh menggunakan tetrametilsilana (TMS, $(CH_3)_4Si$) sebagai internal standar dan $CDCl_3$ sebagai pelarut pada ^{1}H-NMR spektrometer jenis JEOL/NJ60.

Sintesis lauroil-N-metil glukamida

Diagram spektrometer ^{1}H-NMR senyawa lauroil-N-metil glukamida ditunjukkan dalam Gambar 9. Dari spektra lauroil-N-metil glukamida diperoleh 7 lingkungan proton pergeseran kimia, yaitu δ = 0,9 ppm (t, 3H); 1,4 ppm (m, 20H); 2,2 ppm (s, 2H); 2,8 ppm (t, 3H); 3,3 ppm (s, 3H); 3,8 ppm (s,4H); dan 5,7 ppm (s, 5H).

Pergeseran kimia pada δ = 0,9 ppm (t, 3H) menunjukkan tiga buah proton dari CH_3. Untuk δ = 1,4 ppm (m, 20H) menunjukkan 20 buah proton pada gugus $-(CH_2)_n$. Sedangkan pergeseran kimia pada δ = 2,2 ppm (t, 2H) menunjukkan 2 buah proton pada gugus $-CH_2-C=O$. Untuk δ = 2,8 ppm (t, 2H) menunjukkan 2 buah proton pada gugus $-CH_2-N$. Pergeseran kimia pada δ = 3,3 ppm (s, 3H) menunjukkan tiga buah proton dari $N-CH_3$. Untuk δ = 3,8 ppm (s, 4H) menunjukkan 4 buah proton pada gugus -CH. Sedangkan pergeseran kimia pada δ = 5,7 ppm (s, 5H) menunjukkan 5 buah proton pada gugus -OH.

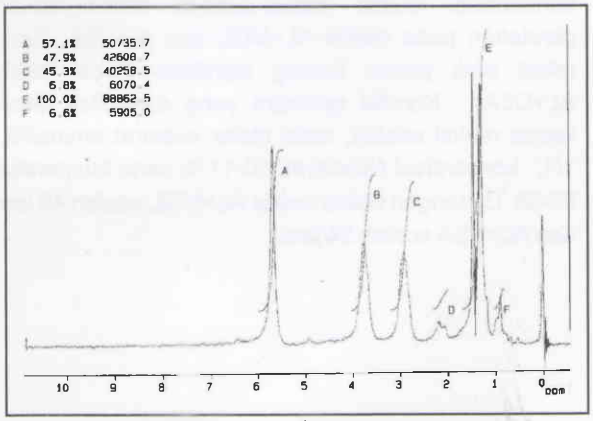


Gambar 9. Hasil Spektra ^{1}H-NMR senyawa Lauroil-N-metil glukamida menggunakan internal standar TMS dan pelarut $CDCl_3$

Sintesis lauroil-dietanolamida

Diagram spektrometer ^{1}H-NMR senyawa lauroil-dietanolamida ditunjukkan dalam Gambar 10. Dari spektra pada Gambar 10 diperoleh 6 lingkungan proton pergeseran kimia, yaitu δ = 0,9 ppm (t, 3H); 1,4 ppm (m, 18H); 2,2 ppm (t, 2H); 2,9 ppm (s, 4H); 3,7 ppm (m, 4H); dan 5,7 ppm (s, 2H).

Pergeseran kimia pada δ = 0,9 ppm (t, 3H) menunjukkan tiga buah proton dari CH_3 pada ujung rantai senyawa lauroil-dietanolamida. Untuk δ = 1,4 ppm (m, 18H) menunjukkan 18 buah proton pada gugus $H_3C-(CH_2)_9-$ (dari atom C_2 sampai C_{10}). Sedangkan pergeseran kimia pada δ = 2,2 ppm (t, 2H) menunjukkan 2 buah proton pada gugus $CH_2-C=O$. Untuk δ = 2,9 ppm (s, 4H) menunjukkan 4 buah proton pada gugus CH_2-N-CH_2. Pergeseran kimia pada δ = 3,7 ppm (m, 4H) menunjukkan 4 buah proton pada gugus $(CH_2)-OH$. Sedangkan pergeseran kimia pada δ = 5,7 ppm (s, 2H) menunjukkan 2 buah proton pada gugus -OH pada ujung gugus lauroil-dietanolamida.



Gambar 10. Hasil Spektra ^{1}H-NMR senyawa Lauroil-dietanolamida menggunakan internal standar TMS dan pelarut $CDCl_3$