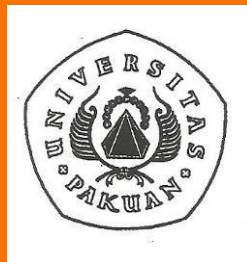


Kode>Nama Rumpun Ilmu** : 112./Kimia

**LAPORAN AKHIR TAHUN I
PENELITIAN HIBAH BERSAING**



**GLISEROLISIS ENZIMATIK CPO DENGAN LIPASE AMOBIL UNTUK
PRODUKSI DIASIL DAN MONOASIL GLISEROL**

TIM PENGUSUL

Dr Tri Panji, MS NIDN 0429056101

Dr Mira Miranti, STP, MSi NIDN 0019106905

Dra Tri Aminingsih, MSi NIDN 0417026601

UNIVERSITAS PAKUAN

OKTOBER 2015

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING**

Judul Penelitian : Gliserolisis enzimatik CPO dengan lipase amobil untuk produksi diasil dan monoasil gliserol

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 112./Kimia.....

Ketua Peneliti :

a. Nama Lengkap : Dr Tri Panji, MS.....

b. NIDN : .0429056101.....

c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala.....

d. Program Studi : Kimia.....

e. Nomor HP : 085883308678.....

f. Alamat surel (e-mail) : tri_panji@yahoo.com.....

Anggota Peneliti (1) :

a. Nama Lengkap : Mira Miranti, STP, MSi

b. NIDN : .0019106905.....

c. Perguruan Tinggi : Universitas Pakuan.....

Anggota Peneliti (2) :

a. Nama Lengkap : .Dra Tri Aminingsih, MSi.....

b. NIDN : .0417026601

c. Perguruan Tinggi : Universitas Pakuan.....

Lama Penelitian Keseluruhan : 2 tahun

Penelitian Tahun ke : .1.

Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp 136.000.000

Biaya Tahun Berjalan : - disetujui DIKTI Rp 68.000.000
- dana internal PT Rp-.....
- dana institusi lain Rp-.....
- *inkind* sebutkan Fasilitas laboratorium..

Mengetahui
Dekan/Ketua

Bogor, 15 Juni 2015
Ketua Peneliti,



(Dr Prasetyorini, MS)
NIP 1957.1030.1986.01.2001

(Dr Tri Panji, MS)
NIK 10800038370

Menyetujui,
Ketua lembaga penelitian

Dr Inna Sri Supina Adi, MSi)
NIP/NIK 10590016149

DAFTAR ISI

RINGKASAN	4
BAB 1. PENDAHULUAN	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB 3. BAHAN DAN METODE PENELITIAN	7
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
BAB 5. KESIMPULAN	17
DAFTAR PUSTAKA	18

RINGKASAN

CPO merupakan komoditas perkebunan besar (PTPN dan swasta) yang memiliki banyak produk olahan/turunan, diantaranya adalah Diasil Gliserol (DAG) dan Monoasil Gliserol (MAG). Produk turunan CPO tersebut memiliki nilai jual yang jauh lebih tinggi karena dapat berfungsi sebagai minyak sehat dengan kemampuannya mencegah akumulasi lemak dalam tubuh dan memperbaiki rasio kolesterol dalam serum darah. Selain itu, DAG dan MAG dapat berfungsi sebagai emulsifier yang banyak dibutuhkan industri. Industri produk turunan ini belum banyak berkembang di Indonesia, diantaranya karena belum berkembangnya teknologi produksi enzim lipase spesifik 1,3 gliserida untuk produksi DAG, serta stabilitas dan aktivitas enzim lipase yang masih perlu ditingkatkan. Penelitian lanjutan ini dilakukan selama dua tahun dengan tujuan untuk 1) Mengembangkan teknologi produksi lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi asal pangan, 2) Mengembangkan teknologi amobilisasi lipase, 3) Mengembangkan teknologi gliserolisis CPO dengan lipase amobil, dan 4) Memperoleh data komposisi produk gliserolisis. Fungi penghasil lipase diisolasi dari tempe dan/atau oncom, kemudian dibiakkan dalam media tumbuh mengandung CPO. Lipase diisolasi dengan pengendapan menggunakan aseton dingin. Lipase kemudian diamobilisasi dalam padatan pendukung, antara lain zeolit. Lipase amobil yang dihasilkan digunakan untuk gliserolisis secara *batch* berulang. Komposisi produk gliserolisis dianalisis dengan metode *Thin Layer Chromatography/TLC*. Luaran yang ditargetkan secara bertahap dalam dua tahun ialah 1) Teknologi produksi lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi, 2) Teknologi amobilisasi lipase, 3) Teknologi gliserolisis CPO dengan lipase amobil, dan 4) Data komposisi produk gliserolisis. Pada akhir kegiatan penelitian diharapkan akan diperoleh paket teknologi gliserolisis enzimatis CPO dengan lipase amobil untuk produksi DAG dan MAG yang mampu memperkuat hasil penelitian sebelumnya, sehingga menunjang kelayakan teknologi ini untuk segera dapat dikembangkan ke skala komersial. Keluaran lainnya yang ditargetkan ialah tulisan di dalam jurnal nasional terakreditasi atau jurnal internasional, paten/HaKI, serta bahan ajar. Hasil penelitian sementara menunjukkan bahwa amobilisasi enzim lipase *Rhizopus oryzae* dengan teknik adsorpsi dapat dilakukan menggunakan zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi. Adsorpsi enzim tertinggi pada CaCO₃ yaitu sebesar 99,46%, lalu tulang sapi (91,56%), zeolit (90,69%), dan silika gel (59,63%). Kondisi optimum lipase bebas ialah pH 7 dan temperatur 30°C, pada lipase teramobil CaCO₃ ialah pH 8 dan temperatur 35°C, pada lipase teramobil zeolit ialah pH 8 dan temperatur 30°C, pada lipase teramobil tulang sapi ialah pH 7 dan temperatur 30°C, dan pada lipase teramobil silika gel ialah pH 8 dan temperatur 30°C. Seluruh lipase teramobil lebih stabil dibandingkan enzim bebas sejak penyimpanan pada minggu pertama. Waktu optimum produksi DAG dengan lipase teramobilisasi pada CaCO₃ ialah selama 18 jam dengan menghasilkan kadar DAG sebesar 34,49%.

[Kata kunci: gliserolisis enzimatis, lipase, DAG, MAG, minyak sehat, amobilisasi enzim]

BAB 1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan penghasil minyak sawit mentah (crude palm oil/CPO) terbesar di dunia dengan produksi CPO tahun 2013 diperkirakan mencapai 25 juta ton (Web Kemenperin). Sekitar separuh dari minyak sawit Indonesia diekspor dan sebagian besar dalam bentuk bahan mentah CPO. Padahal, produk olahan minyak sawit (baik pangan maupun oleokimia) memiliki nilai jual yang jauh lebih tinggi dibanding CPO. Teknologi pengolahan minyak nabati dapat dikembangkan untuk minyak kelapa sawit di dalam negeri, antara lain untuk produksi DAG dan MAG.

Minyak yang kaya DAG dapat berfungsi sebagai minyak sehat (*healthy oil*) karena dapat mencegah akumulasi lemak dalam tubuh dan memperbaiki rasio kolesterol serum darah (Yasunaga *et al.*, 2001). DAG bersama-sama dengan MAG juga dapat digunakan sebagai bahan pengemulsi pangan, produk farmasi, nutrifikan ataupun nutrasetikal.

Minyak sehat nabati dijumpai pertama kali di pusat pertokoan kota Atlanta dan Chicago pada awal tahun 2003. Minyak goreng dengan merk dagang Enova Oil mengandung DAG 50% dipasarkan dengan harga sekitar US\$ 8.45 per kg, kira-kira 5 kali harga minyak goreng biasa. Minyak goreng ini belum beredar di pasaran Indonesia.

DAG dan MAG dapat diproduksi melalui proses kimiawi maupun enzimatis. Proses gliserolisis kimiawi dengan cara pencampuran gliserol, minyak atau lemak alami dan katalis alkali menghasilkan produk DAG berwarna gelap dengan rasa yang tidak enak, serta terbentuknya senyawa toksik (Elisabeth *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1988). Selain itu gliserolisis secara kimiawi membutuhkan energi dan biaya produksi yang tinggi.

Proses gliserolisis dengan menggunakan enzim sebagai biokatalis berlangsung dengan energi yang relatif rendah serta menghasilkan produk dengan kualitas yang lebih baik. Proses tersebut juga aman karena bekerja pada suhu kamar dan tekanan 1 atm (Noureddini *et al.*, 2004). Keunggulan lain penggunaan lipase dalam industri makanan adalah reaksi hidrolisis yang dikatalisis bersifat spesifik.

Modifikasi CPO oleh enzim lipase yang memiliki spesifitas reaksi 1,3-gliserida, menghasilkan gliserida dengan produk utama diasilgliserol (DAG) dan produk samping monoasilgliserol (MAG), serta asam lemak bebas dan gliserol. Oleh karena itu, saat ini pembuatan DAG dan MAG lebih diarahkan pada proses enzimatis dengan menggunakan lipase yang berasal dari mikroba sebagai biokatalisator. Namun, ketersediaan enzim lipase spesifik 1,3 untuk produksi DAG yang masih terbatas dan harga lipase impor yang mahal (Rp 25 juta per kg) menyebabkan produksi DAG secara enzimatis dari CPO belum berkembang di Indonesia.

Dengan pengembangan teknologi produksi lipase amobil yang dapat digunakan secara berulang, diharapkan komponen biaya produksi DAG dan MAG akan semakin murah dan ketergantungan akan impor enzim lipase akan semakin berkurang. Teknologi amobilisasi ini diharapkan juga dapat diterapkan untuk amobilisasi enzim lain seperti protease, amilase, pektinase,

dan lain sebagainya, yang dibutuhkan dalam pengembangan agroindustri berbasis CPO dan produk primer lainnya di Indonesia.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Enzim lipase dapat dihasilkan dari berbagai fungi seperti *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp. dan *Aspergillus niger* dalam substrat CPO (Ibrahim *et al.* 1991). Akan tetapi, teknik produksinya yang rumit dan membutuhkan bahan kimia yang mahal menyebabkan harga lipase komersial fungi relatif tinggi dan sebagian besar masih harus diimpor (Elizabeth *et al.* 1999). Untuk mengatasi masalah tersebut diperlukan suatu metode dalam memproduksi lipase dengan murah. Salah satu metode yang dapat digunakan ialah metode fermentasi dengan mikroba tertentu yang mampu menghasilkan lipase.

Tri-Panji *et al.* (2008) telah melakukan fermentasi CPO dengan *Neurospora sitophila* dan dilaporkan mampu memproduksi lipase spesifik 1,3-gliserida. Kapang lokal jenis ini dikenal aman (*edible*) dan tidak mengandung mikotoksin karena biasa digunakan dalam pembuatan oncom merah. Kapang lokal lain seperti *Rhizopus* sp. yang dikenal sebagai jamur tempe, juga aman dari resiko adanya mikotoksin .

Amobilisasi enzim merupakan metode untuk membuat enzim tidak bergerak, sehingga enzim dapat digunakan secara berulang pada proses biokonversi secara batch.. Enzim amobil juga dapat digunakan pada biokonversi secara kontinu sampai periode tertentu tergantung stabilitas enzim amobil. Dengan cara ini, biokonversi enzimatik akan lebih praktis (Knežević *et al.* 2004) dan dapat dilakukan lebih mudah dan murah dibandingkan dengan penggunaan enzim bebas. Amobilisasi enzim telah berhasil dilakukan untuk enzim desaturase dan enzim lipase (Suharyanto *et al.*, 2006; 2011; Palilingan, 2013). Namun, aktivitas dan stabilitas lipase masih perlu ditingkatkan. Penggunaan enzim amobil juga memungkinkan proses biokonversi dilakukan secara kontinu.

Riset produksi DAG dan MAG secara enzimatik saat ini banyak dilakukan. Hal ini dipicu oleh berkembangnya berbagai penyakit degeneratif seperti jantung koroner, stroke, hiperkolesterolemia dan diabetes melitus yang telah mendorong masyarakat untuk mengkonsumsi minyak sehat seperti DAG (Yasunaga *et al.* 2001). Menurut Nagao *et al.* (2000); Murase *et al.* (2001) dan Yuan *et al.* (2010), DAG dapat berfungsi sebagai minyak sehat karena metabolisme DAG menjadi energi berlangsung secara efisien, sehingga akumulasi lemak dalam tubuh (*body fat*) dapat dicegah. DAG juga dapat menurunkan kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL), trigliserida (TG) dan menjadi inhibitor plasminogen. Di samping itu, campuran DAG dengan monoasilgliserol (MAG) dapat digunakan sebagai surfaktan (Anggirasti *et al.* 2008).

Perwitasari (2008) telah melakukan optimasi produksi DAG dengan lipase dari *Rhizopus oryzae* melalui gliserolisis dengan sistem *batch*. Dengan sistem ini, rendemen DAG yang diperoleh sebesar 20,76%. Kadar DAG ini dinilai masih rendah sehingga masih diperlukan optimasi proses

gliserolisis. Palilingan (2013) melakukan gliserolisis kontinu dengan enzim lipase yang diamobilisasi pada butiran zeolit. Dengan sistem kontinu, gliserolisis dapat dilakukan dengan mudah dan memungkinkan untuk otomatisasi proses. Namun, aktivitas lipase amobil juga masih kurang stabil dan perlu ditingkatkan.

Peningkatan stabilitas enzim amobil dapat dilakukan dengan memilih padatan pendukung yang digunakan sebagai media amobilisasi. Tri_Panji *et al.* (2001; 2002a,b; 2005), telah melakukan penelitian amobilisasi enzim desaturase dengan padatan pendukung tulang sapi dan zeolit. Dengan cara ini, aktivitas dan stabilitas enzim desaturase dapat ditingkatkan dari 3-4 jam menjadi 18-20 jam yang memungkinkan proses desaturasi asam lemak jenuh dapat dilakukan. Metode amobilisasi desaturase ini perlu diteliti kesesuaiannya untuk amobilisasi enzim lipase. Metode amobilisasi lainnya ialah menggunakan padatan pendukung silika (Krishnakant & Madamwar, 2001) dan kalsium karbonat (Sawangpanya *et al.*, 2010).

BAB 3. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

1) Isolasi fungi penghasil lipase spesifik 1,3 gliserida dan produksi lipase

Fungi penghasil lipase diisolasi dari tempe menggunakan media PDA. ke dalam media PDA baru, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (27-30 °C) selama 3-4 hari. Spora yang tumbuh dalam media PDA diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan dalam @ 100 mL medium fermentasi steril yang mengandung CPO 3 % dengan total volume sebanyak 500 mL dan diinkubasi pada suhu ruang (27-30 °C) selama 5 hari sambil digoyang dengan kecepatan 75 rpm. Setelah dilakukan proses fermentasi, enzim yang dihasilkan dipanen. Untuk memisahkan biomassa (spora) dengan filtrat dilakukan penyaringan vakum dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui bobot massanya. Biomassa sel dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 °C hingga bobotnya konstan dan dihitung biomassa sel keringnya sedangkan filtrat diambil untuk dilakukan proses pengendapan dan isolasi enzim.

2) Produksi dan analisis spesifitas lipase

Isolat fungi ditumbuhkan ke dalam media agar kentang (PDA). Setelah miselium tumbuh memenuhi permukaan cawan Petri, miselium diinokulasikan ke dalam 5 bejana masing-masing berisi 100 mL medium fermentasi yang mengandung CPO 3%. Kultur diinkubasi selama 5-7 hari. Setiap hari sampel diambil untuk dihitung biomassa sel kering dan kadar asam lemak bebas untuk menentukan aktivitas katalitik dari lipasena. Fermentat lipase dipisahkan dari biomassa sel melalui penyaringan dengan vakum dan aktivitas lipase dihitung dengan titrasi (Ibrahim, 1991) .

Pemeriksaan spesifik tidaknya enzim lipase dilakukan menurut Tri-Panji *et al.* (2008). Suatu lipase akan bersifat spesifik 1,3 jika nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari ALB/TAG.

Ekstrak enzim kasar berupa cairan fermentasi yang telah dipisahkan biomasanya langsung dikeringbekukan (*freeze dried*). Serbuk yang didapat disimpan di dalam *freezer* untuk kemudian dipakai dalam produksi DAG. Sampel kemudian diuji aktivitas enzimnya. Pemurnian lipase dilakukan dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat. Garam ini ditambahkan pada cairan fermentasi, kemudian pellet dianalisis aktivitas lipasena. Lipase juga dapat diisolasi dengan pengendapan menggunakan aseton dingin. Pemurnian lipase dilakukan dengan metode dialisis dan kromatografi kolom silika gel.

3) Analisis Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas lipase ditentukan menurut metode Ibrahim *et al.* (1991), berdasarkan peningkatan kadar asam lemak bebas dalam sampel sebagai berikut:

Penentuan kadar asam lemak bebas dilakukan dengan melarutkan 3 g CPO dan 1 g polivinil alkohol ke dalam 40 mL buffer fosfat-sitrat pH 5 dan ditambah dengan 1 mL larutan enzim. Sampel diinkubasi pada suhu kamar (25-30 °C) selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 20 mL campuran aseton : etanol (1 : 1 v/v). Kemudian sampel dititrasi menggunakan NaOH 1 N menggunakan indikator fenolftalein hingga titik akhir berwarna merah muda. Untuk blanko dilakukan prosedur yang sama tanpa perlakuan penambahan enzim.

Penentuan kadar asam lemak bebas dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim lipase} = \frac{\text{Kadar asam lemak bebas (Sampel-Blanko)}}{\text{Waktu inkubasi (30 menit)}}$$

$$\text{Kadar asam lemak bebas} = \frac{V \times N_{\text{NaOH}} \times \text{BM}_{\text{NaOH}}}{\text{Bobot massa sampel}}$$

4) Amobilisasi lipase pada padatan pendukung

Lipase yang telah dimurnikan diamobilisasi dalam padatan pendukung, antara lain zeolit dan serbuk tulang sapi. Amobilisasi Lipase dengan zeolit dilakukan dengan metode yang digambarkan oleh Apriyanti (2012) sebagai berikut.

Butiran zeolit berukuran 3-5 mm yang diperoleh dari pasaran sebelum digunakan sebagai padatan pendukung dicuci dengan air sampai air cucian tersebut jernih dan tidak keruh, kemudian zeolit direndam dalam larutan NaCl 1 M selama 12 jam dengan dua kali penggantian larutan perendam sambil digoyang perlahan. Butiran zeolit kemudian diaktivasi dengan memanaskan di dalam oven pada suhu 200 °C selama 15 menit. Amobilisasi lipase dilakukan dengan cara merendam 200 g zeolit teraktivasi ke dalam 200 mL larutan enzim dan dikocok pada kecepatan 180 rpm selama satu jam pada suhu ruang (25-30 °C), kemudian cairan dipisahkan. Butiran zeolit yang telah mengamobilisasi enzim digunakan untuk produksi DAG dalam proses gliserolisis secara *batch* berulang.

Untuk amobilisasi dengan serbuk tulang sapi, prosedur yang digunakan serupa dengan teknik amobilisasi desaturase sebagai berikut (Tri-Panji *et al.*, 2002b). Tulang sapi dibersihkan dari daging yang menempel, kemudian tulang ditumbuk halus dan dihilangkan lemaknya dengan cara ekstraksi menggunakan heksana. Tahap amobilisasi selanjutnya serupa dengan amobilisasi menggunakan zeolit. Media amobilisasi lainnya yang perlu diteliti ialah silika dan CaCO_3 (Krishnakant & Madamwar, 2001; Sawangpanya *et al.*, 2010)

5) Uji Stabilitas Lipase Amobil terhadap Pengaruh pH, Suhu, dan Waktu Penyimpanan

Stabilitas enzim amobil diteliti terhadap pengaruh pH (antara pH 5-9), suhu (antara suhu 25-40 °C), serta waktu penyimpanan (0-6 minggu). Stabilitas terbaik dipilih berdasarkan aktivitas tertinggi yang diperoleh pada kondisi tersebut.

6) Optimasi Gliserolisis CPO dengan Lipase Amobil

Gliserolisis dilakukan dengan mereaksikan enzim amobil (hasil amobilisasi dengan zeolit dan serbuk tulang) dengan campuran gliserolisis dengan variasi komposisi: a) 0,8 g gliserol, 40 mL heksana, 50 mL buffer tris-HCl 0,05 M pH 7 dan 2 g CPO (Mappiratu, 1999)., dan b) 0,8 g gliserol, 20 mL heksana, 50 mL buffer tris-HCl dan 3 g CPO (Perwitasari (2008)). Kemudian campuran diinkubasi pada suhu kamar, pH 7, dengan variasi waktu hingga 18 jam. Sampel hasil gliserolisis diambil setiap 6 jam, untuk selanjutnya dianalisis komposisinya.

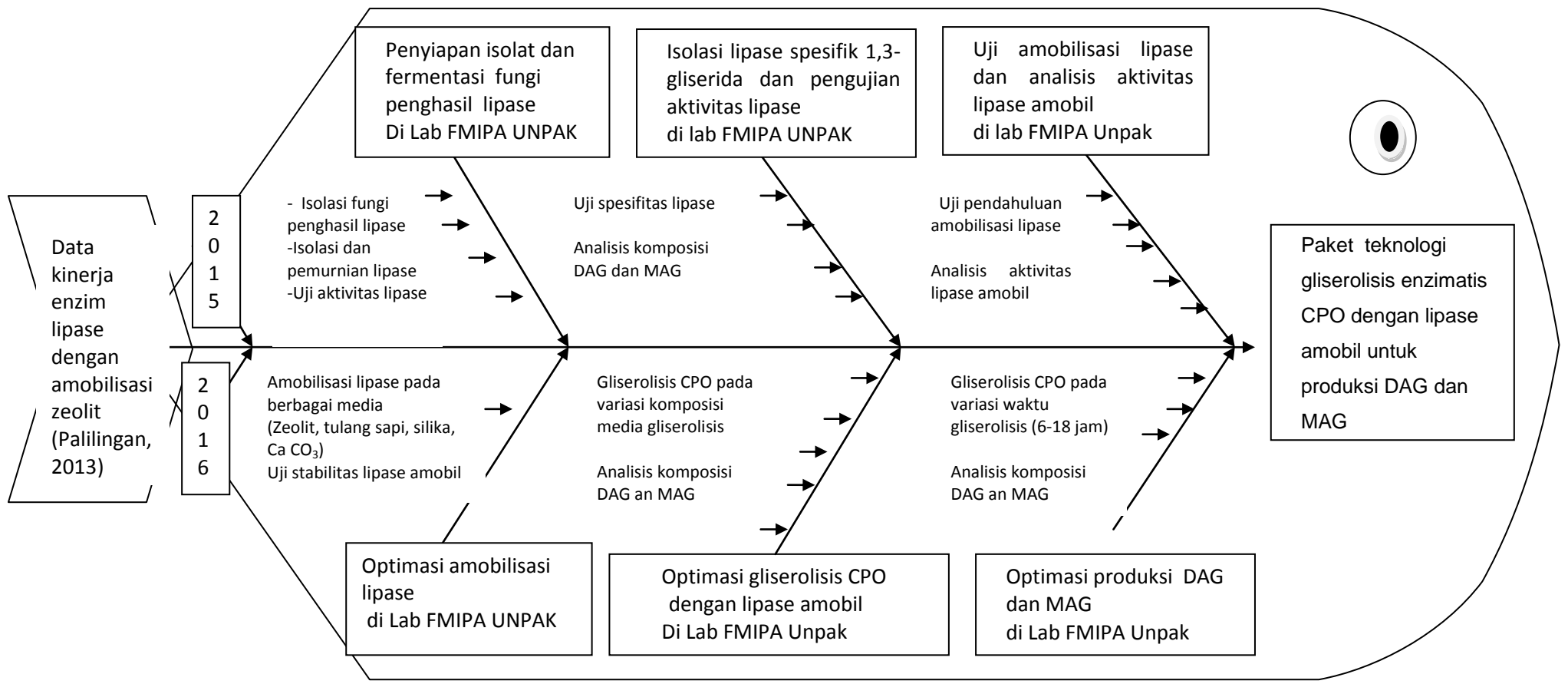
7). Analisis Komposisi Produk Gliserolisis

Fraksi masa komponen TAG, DAG, MAG, dan FFA dari reaksi gliserolisis dianalisis dengan metode kromatografi lapis tipis/TLC (AOAC 1995). Sebanyak 10 μL contoh ditotolkan sedikit demi sedikit ke dalam lempeng TLC silika gel G 60 dan dielusikan dengan campuran petroleum benzene : dietileter : asam asetat glasial (90:10:1).

Lempeng TLC yang sudah dielusikan dibiarkan mengering terlebih dahulu, kemudian visualisasi noda dilakukan dengan menggunakan uap iodine. Kristal iodine dituangkan ke dalam cawan petri hingga rata. Lempeng TLC yang sudah kering diletakkan di atas cawan petri selama dua menit (hingga terlihat noda cokelat). Noda yang terlihat langsung diberi tanda menggunakan pensil. Dari luas noda yang dihasilkan, kemudian dihitung persentase fraksi masa masing-masing komponen (DAG, TAG, FFA dan MAG) dalam campuran.

Tabel 1. Kegiatan penelitian yang telah dilakukan dan tindak lanjut yang perlu dilakukan

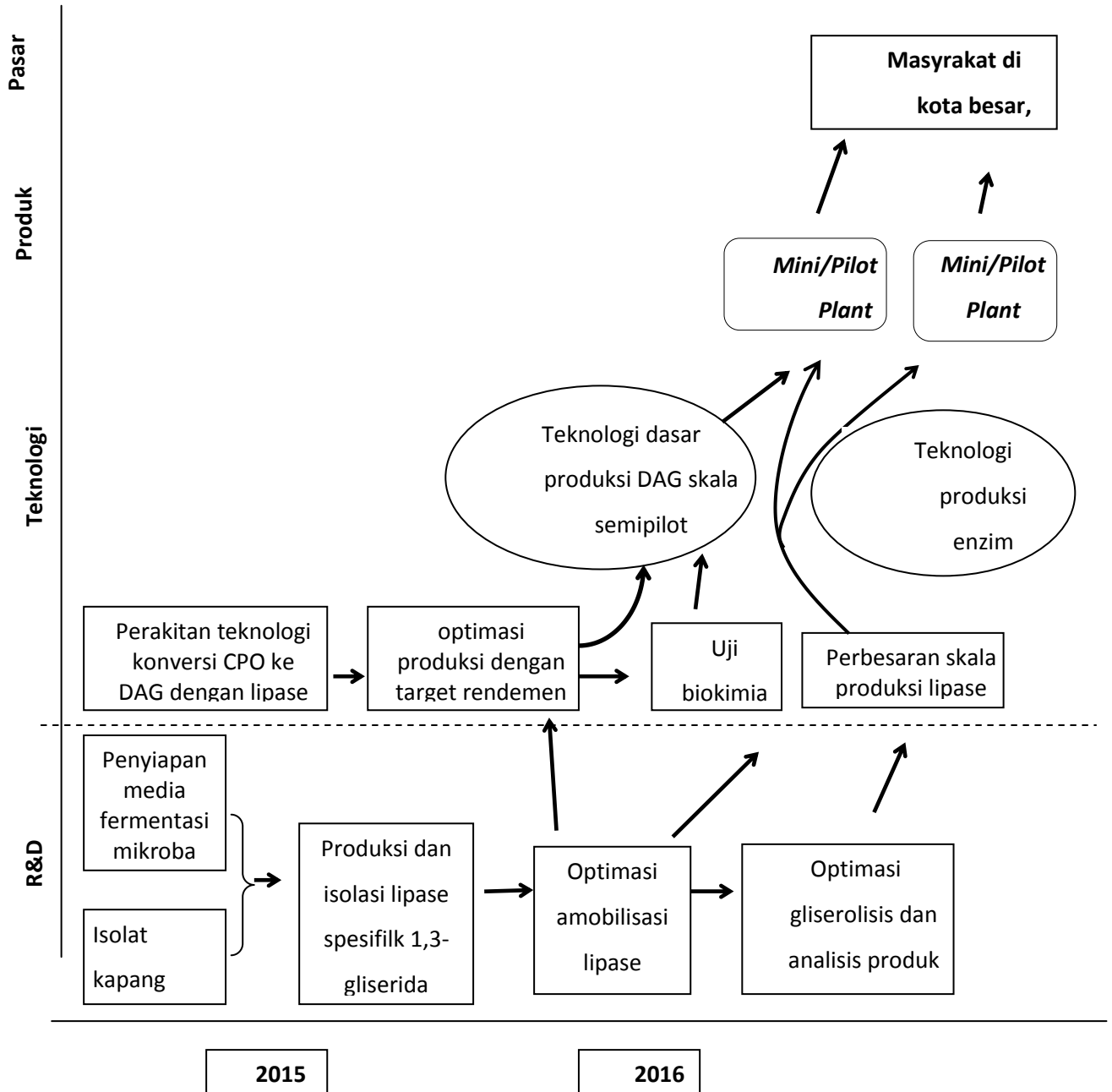
Kegiatan	Yang telah dicapai	Masalah	Tindak lanjut
Isolasi fungi penghasil lipase	Telah diperoleh fungi penghasil lipase	Banyak isolat tidak terpelihara dan mati	Isolat yang ada perlu diremajakan dan diisolasi lagi fungi penghasil lipase dengan harapan memperoleh fungi yang memiliki aktivitas lipolitik lebih tinggi
Produksi lipase	Teknik produksi lipase sudah diperoleh	Lipase yang dihasilkan aktivitasnya belum optimal	Lipase perlu lebih dimurnikan dan disimpan pada kondisi yang dapat mempertahankan aktivitasnya
Amobilisasi lipase	Telah diperoleh teknik amobilisasi lipase dengan padatan pendukung zeolit	Stabilitas dan daya guna lipase amobil masih rendah	Perlu ditingkatkan optimasi amobilisasi lipase dengan metode dan padatan pendukung lain
Gliserolisis CPO dengan lipase amobil	Telah diperoleh data kinerja lipase yang diamobilisasi pada zeolit untuk gliserolisis CPO	Aktivitas gliserolisis belum optimal karena stabilitas lipase amobil belum optimal	Perlu optimasi kembali gliserolisis dengan lipase yang diamobilisasi dengan teknik amobilisasi yang lebih baik
Analisis produk gliserolisis (DAG)	Teknik analisis produk gliserolisis telah diperoleh	Optimasi perlu adanya analisis produk	Perlu dilakukan analisis terhadap produk DAG dan MAG hasil optimasi yang baru



Gambar 1. Diagram tulang ikan penelitian Gliserolisis enzimatis CPO dengan lipase amobil untuk produksi diasil dan monoasil gliserol (DAG dan MAG)

Roadmap Penelitian

Secara keseluruhan dan dengan asumsi faktor-faktor penentu dalam keadaan wajar, pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan dalam kegiatan penelitian ini, diilustrasikan di dalam *road map* pada Gambar 1. Keberhasilan dan waktu pencapaiannya sangat tergantung antara lain pada konsistensi memadainya dana dan input penting serta perubahan lingkungan strategis lainnya.



Gambar 2. Roadmap gliserolisis enzimatis CPO untuk produksi DAG dan MAG

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi dan Uji Spesifitas Enzim Lipase *Rhizopus oryzae*

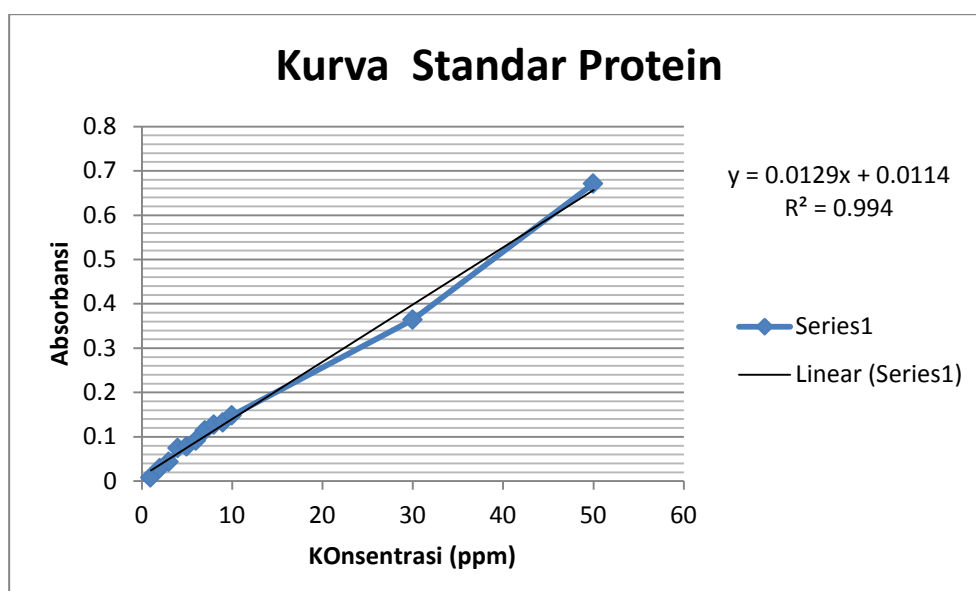
Lipase yang diisolasi dari filtrat kultur *R. oryzae* ini telah diuji memiliki spesifitas tinggi terhadap trigliserida/TriAsil Gliserol (TAG), terlihat dari data perbandingan luas area TAG, DiAsil Gliserol (DAG), Mono Asil Gliserol (MAG) dan asam lemak bebas/ Free Fatty Acid (FFA) (Tabel 2). Suatu lipase akan bersifat spesifik 1,3 jika nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari ALB/TAG (Tri-Panji *et al.*, 2008). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio DAG/TAG = 0,23, jauh lebih besar dibandingkan rasio ALB/TAG yang bernilai 0,04 (Tabel 2). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa waktu optimum produksi DAG ialah selama 15 jam.

Tabel 2. Komposisi hasil gliserolisis CPO dengan enzim lipase bebas

Waktu (Jam)	% Area				Perbandingan	
	ALB	MAG	DAG	TAG	DAG/TAG	ALB/TAG
0	7,62	8,80	7,96	68,75	0,12	0,11
3	1,99	11,17	15,31	69,02	0,22	0,03
6	2,00	11,54	17,32	66,67	0,26	0,03
9	2,39	8,01	18,22	65,25	0,28	0,04
12	2,16	3,76	12,90	67,54	0,19	0,03
15	1,91	9,44	18,41	63,51	0,29	0,03
18	1,79	6,19	14,52	67,94	0,21	0,03
21	1,10	7,71	14,46	63,61	0,23	0,02
24	1,86	13,00	17,45	60,48	0,29	0,03
27	1,79	6,19	14,52	67,94	0,21	0,03
				Rata-rata	0,23	0,04

Amobilisasi Lipase *Rhizopus oryzae* pada Padatan Pendukung

Empat bahan pendukung yang diuji untuk amobilisasi lipase *Rhizopus oryzae* ialah zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi. Persentase penyerapan protein enzim pada setiap support dihitung dengan basis jumlah protein yang terkandung dalam larutan enzim bebas adalah 100%. Nilai konsentrasi protein dapat diketahui dengan menggunakan data kalibrasi standar protein (Gambar 3), dimana kurva ini memberikan konversi nilai absorbansi menjadi nilai konsentrasi protein (Wulan *et al.* 2007).



Gambar 3. Kurva standar protein

Persamaan garis yang didapat adalah $y = 0,012x + 0,011$, dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi protein. Protein terlarut didapatkan dengan mengurangi absorbansi dengan 0,011 lalu dikalikan dengan slope persamaan garis 0,012 untuk mendapatkan konsentrasi protein terlarut.

Konsentrasi protein yang teramobilisasi diperoleh dari selisih konsentrasi larutan enzim sebelum dan setelah setelah amobilisasi. Secara lengkap konsentrasi protein yang teramobil pada masing-masing bahan pendukung dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi protein yang teramobilisasi

Bahan Pendukung	% Enzim teramobilisasi dalam padatan pendukung
Zeolit	90.69
CaCO ₃	99.46
Silica gel	59.63
Tulang sapi	91.56

Seperti dapat dilihat, bahan pendukung CaCO₃ menunjukkan konsentrasi protein tertinggi sebesar 99.46%, dibandingkan tulang sapi yang sebesar 91.56% dan zeolit yang hanya sebesar 90.69%. Hal ini dikarenakan luas permukaan CaCO₃ yang lebih besar dibandingkan tulang sapi dan zeolit. Semakin besar luas permukaan bahan pendukung maka semakin besar konsentrasi protein yang dapat terabsorpsi (Zou *et al.* 2014). Dari sisi struktur bahan, CaCO₃ merupakan garam yang memiliki intermolekul dengan larutan lipase cukup baik (Wulan *et al.* 2007).

Tulang sapi merupakan adsorben organik yang sudah dideproteinasi dan demineralisasi, meninggalkan pori yang dapat diisi oleh air lain. Dengan pori yang besar dan luas permukaan yang besar, tulang sapi dapat menyerap lipase dengan baik. (Wulan *et al.* 2007). Zeolit merupakan padatan kristal yang telah digunakan secara luas dalam adsorpsi molekul. Zeolit memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan enzim. Selain itu, zeolit memiliki permukaan heterogen yang cocok dengan beberapa sisi adsorpsi enzim (Datta *et al.* 2013)

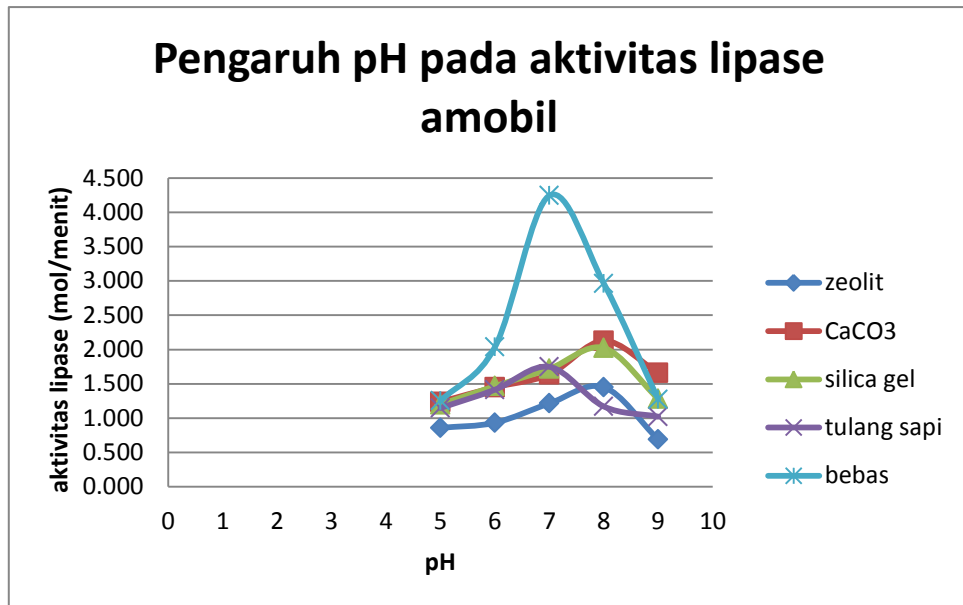
Namun pada bahan pendukung silika gel menunjukkan aktivitas terendah yaitu sebesar 59.63%. Silika adalah material Si yang *porous* dan *amorphous*. Silika gel merupakan partikel adsorben alamiah, dimana air akan menyerap air dengan batas tertentu. Kemampuan adsorpsi permukaan dan intra molekul silika gel sudah terbukti luas. Namun yang membuat kemampuan adsorpsi silika gel rendah adalah karena silika gel yang berbentuk padat memiliki kekuatan tarik antar partikel yang rendah (Wulan *et al.* 2007). Selain itu, hal tersebut dikarenakan permukaan silika gel tidak bersifat inert dengan lipase (Ghamgui *et al.* 2004).

Pengaruh pH terhadap Kestabilan Lipase Teramobilisasi

Lingkungan dimana enzim akan mengkatalis reaksi harus berada pada kondisi optimum enzim untuk bereaksi. Zona ini diberikan oleh parameter derajat keasaman (pH). Setiap enzim memiliki karakter yang berbeda dimana kondisi optimum pH lingkungan akan spesifik untuk tiap enzim. Kondisi pH yang jauh dari kondisi spesifik ini akan menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim mengalami kerusakan struktur protein (Nelson 2008).

Penurunan pH menjadi kondisi asam menyebabkan penurunan aktivitas, begitu juga kenaikan pH menjadi basa dapat menyebabkan struktur enzim menjadi rusak. Kondisi pH yang terlalu rendah mengakibatkan ion H^+ akan berikatan dengan $-NH_3^+$ pada struktur asam amino protein membentuk $-NH_4$. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan antara atom nitrogen dengan atom hidrogen lainnya terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH tinggi mengakibatkan ion $-OH$ berikatan dengan atom hidrogen dari gugus COO^- enzim, membentuk H_2O . Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Wulan *et al.* 2007).

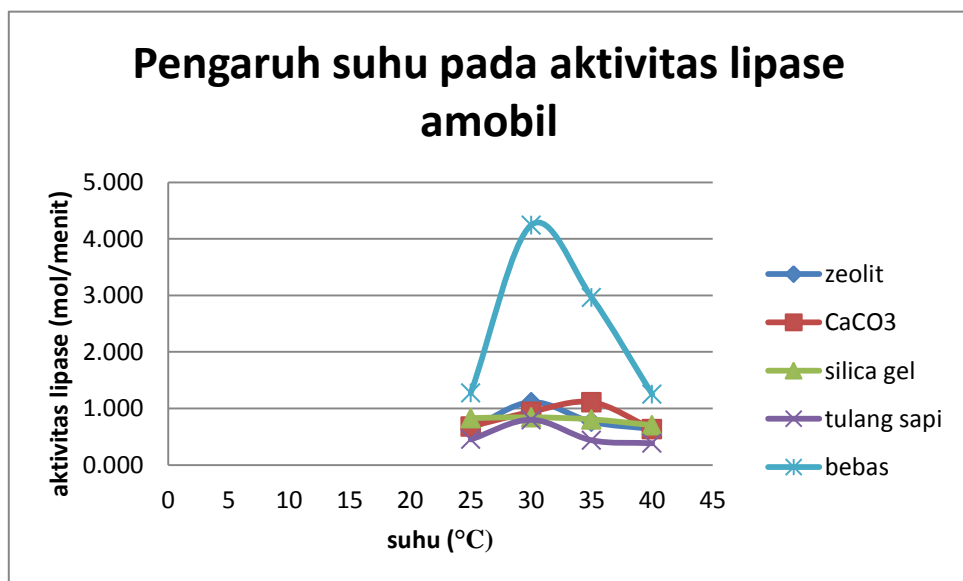
Dari Gambar 4 terlihat bahwa pH optimum lipase bebas sama seperti lipase teramobil tulang sapi yaitu pada pH 7. Namun pH optimum diperoleh pada pH 8 untuk lipase yang teramobil zeolit, $CaCO_3$, dan silika gel. Hal ini menunjukkan matriks bersifat polianion. Pendistribusian ion hidroksida yang berbeda antara dekat dengan permukaan di dalam matriks, dimana muatan positif dekat dengan sisi pengikatan enzim, mengakibatkan enzim yang teramobilisasi zeolit, $CaCO_3$, dan silika gel memiliki pH optimum yang lebih tinggi dibandingkan pH optimum pada lipase bebas (Pereira *et al.* 2001)



Gambar 4. Kurva pengaruh pH pada lipase amobil

Pengaruh Suhu terhadap Kestabilan Lipase Teramobilisasi

Seperti halnya perubahan kondisi pH, enzim memiliki kondisi optimal dengan adanya perubahan temperatur (Gambar 5). Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan temperatur sampai pada batas optimalnya, kemudian aktivitas akan menurun setelah melewati kondisi tersebut karena enzim akan mengalami denaturasi. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzim kurang baik (Nelson 2008).

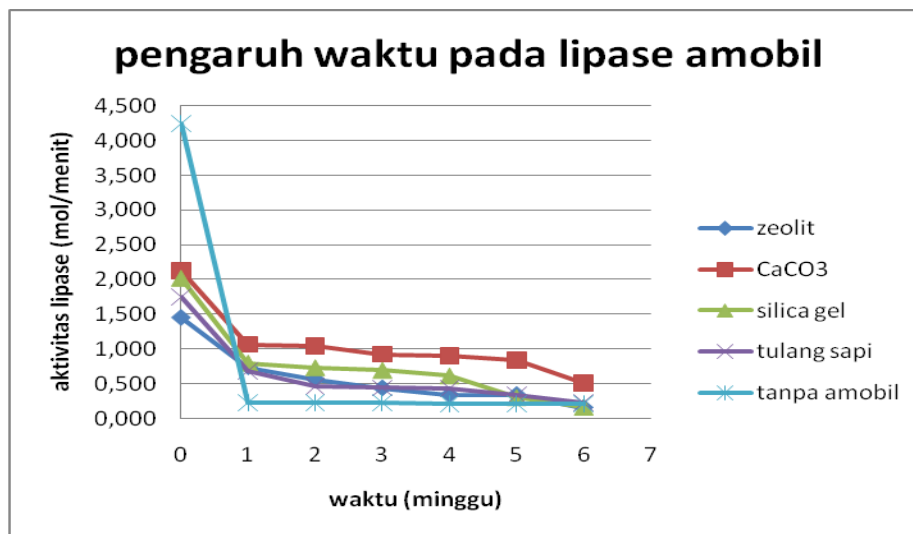


Gambar 5. Kurva pengaruh temperatur pada aktivitas lipase amobil

Pada Gambar 5 terlihat bahwa temperatur optimum pada lipase bebas sama seperti temperatur optimum pada lipase teramobil zeolit, silika gel, dan tulang sapi yaitu sebesar 30°C. Namun terjadi peningkatan temperatur optimum pada lipase teramobil CaCO₃ yaitu sebesar 35°C. Amobilisasi lipase *Rhizopus oryzae* pada CaCO₃ dapat mengakibatkan meningkatnya termostabilitas enzim dan memperluas potensi bioteknologi, karena bioproses berjalan pada suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan tingkat difusi, menurunkan viskositas substrat, dan meningkatkan kelarutan reaktan (Klinic *et al.* 2006). Hal ini merupakan hal yang diinginkan, karena suhu operasional yang lebih tinggi akan menyebabkan resiko yang lebih rendah dari kontaminasi mikroba (Pereira *et al.* 2001)

Kestabilan Lipase *Rhizopus oryzae* Amobil selama Penyimpanan

Penyimpanan lipase amobil pada jangka waktu pada suhu tertentu adalah salah satu faktor kunci yang cukup dipertimbangkan. Enzim umumnya tetap aktif saat disimpan pada suhu rendah, dikarenakan lipase cenderung untuk menjaga struktur aslinya (Yesiloglu & Sit 2011). Atas dasar tersebut lipase disimpan pada suhu 4°C. Pengaruh waktu penyimpanan terhadap lipase bebas dan teramobil dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh waktu penyimpanan pada lipase amobil

Lipase teramobil lebih stabil dibandingkan enzim bebas dikarenakan dukungan matriks mencegah proses antarmolekul seperti proteolisis dan agregasi, oleh karena itu menciptakan molekul enzim yang lebih kaku (Yesiloglu & Sit 2011).

Optimasi aktivitas gliserolisis dengan lipase amobil

Lipase yang teramobilisasi pada media terbaik, yaitu pada padatan CaCO_3 , memiliki aktivitas gliserolisis optimum untuk produksi DAG pada waktu inkubasi 18 jam dengan menghasilkan kadar DAG sebesar 34,49% (Tabel 4). Kadar DAG ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh lipase bebas yang hanya mencapai kadar 18,41%. Dengan demikian, amobilisasi lipase ini menghasilkan beberapa keuntungan, yaitu dari segi kestabilan, aktivitas, serta penggunaan ulang.

Tabel 4. Komposisi hasil gliserolisis CPO dengan enzim lipase teramobilisasi pada CaCO_3

Waktu (jam)	% Luas area			
	ALB (FFA)	MAG	DAG	TAG
0	2.30	0	0	97.69
3	0.95	2.85	1.54	94.64
6	1.36	9.76	2.76	86.09
9	1.66	7.37	3.82	87.11
12	1.39	5.18	5.15	88.26
15	1.97	8.99	30.58	58.31
18	2.24	29.22	34.49	33.88
21	5.61	11.40	32.08	50.78
24	12.71	24.75	8.26	54.12
27	1.87	14.77	3.34	79.94

BAB V. KESIMPULAN

Lipase *Rhizopus oryzae* bersifat spesifik 1,3- gliserida. Amobilisasi enzim lipase *Rhizopus oryzae* dengan teknik adsorpsi dapat dilakukan menggunakan zeolit, CaCO_3 , silika gel, dan tulang sapi. Adsorpsi enzim lipase tertinggi terjadi pada CaCO_3 yaitu sebesar 99,46%, kemudian tulang sapi (91,56%), zeolit (90,69%), dan silika gel (59,63%). Kondisi optimum lipase bebas ialah pH 7 dan temperatur 30°C, sedangkan untuk lipase teramobil pada CaCO_3 ialah pH 8 dan temperatur 35°C, pada lipase teramobil pada zeolit ialah pH 8 dan temperatur 30°C, pada lipase teramobil pada tulang sapi ialah pH 7 dan temperatur 30°C, dan pada lipase teramobil pada silika gel ialah pH 8 dan temperatur 30°C. Seluruh lipase teramobil lebih stabil dibandingkan enzim bebas sejak penyimpanan pada minggu pertama. Waktu optimum produksi DAG dengan lipase teramobilisasi pada CaCO_3 ialah selama 18 jam dengan menghasilkan kadar DAG sebesar 34,49%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggirasti, Hariyadi P, Andarwulan N, Haryati T. 2008. Gliserolisis RBDPO (*Refined Bleached Deodorized Palm Oil*) dengan lipase untuk sintesis MDAG (Mono-diasilgliserol). Prosiding Seminar PATPI, Palembang.
- Apriyanti S. 2012. Optimasi Produksi Diasilgliserol dari CPO dengan Biokonversi Enzim Lipase Spesifik 1,3 Amobil [Skripsi]. Bogor (ID) : Universitas Pakuan.
- Arini N. 2005. Isolasi dan penapisan mikroba penghasil lipase spesifik 1,3-gliserida serta penentuan kondisi optimum produksi diasilgliserol menggunakan minyak sawit mentah [Tesis]. Depok (ID) : Universitas Indonesia.
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Journal Biotech.* 3:1-9.
- Elisabeth J, Jatmika A, Sitanggang OP. 1999. Optimasi proses gliserolisis enzimatik pada minyak sawit untuk meningkatkan monogliserida. *J Penelitian Kelapa Sawit* 7 (3), 173-185.
- Ghamgui H, Chaabouni MK, Gargouri Y. 2004. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology.* 35:355-363.
- Ibrahim CO, Noor NJ, Darah I. 1991. Isolation and identification of an exogenous lipase producing fungi using palm oil medium. *J. Bioscience* 2 : 56-59.
- Knežević ZD, Šiler-Marinković SS, Mojović LV. 2004. Immobilized lipases as practical catalysts. *APTEFF*, 35, 1-280. BIBLID : 1450-7188. 35, 151-164.
- Krishnakant S, Madamwar D. 2001. Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs). *Process Biochem* 36:607–11.
- Mappiratu. 1999. Penggunaan biokatalis dedak padi dalam biosintesis antimikroba monoasilgliserol dari minyak kelapa [Disertasi]. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Muderhwa JM, Ratomahenina. 1985. Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. *JAOCs* 62 (6) : 1030-1036.
- Murase T, Mizuno T, Omachi T, Onizawa K, Komine Y, Kondo H, Hase T, Tokimitsu I. 2001. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *Journal of Lipid Research* Vol. 42 : 372-378.
- Nagao T, Watanabe H, Goto N, Onizawa K, Taguchi H, Matsuo N, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H. 2000. Dietary Diacylglycerol Suppresses Accumulation of Body Fat Compared to Triacylglycerol in Men in a Double-Blind Controlled Trial. *The Journal of Nutrition.* 130 : 792-797.
- Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger: Principles of Biochemistry 5th Edition*. New York: WH Freeman and Company.
- Noureddini H, Harkey DW, Gutsman MR. 2004. A Continuous Process for the Glycerolysis of Soybean Oil. *JAOCs.* 81 (1):1-5.
- Palilingan, S.C. 2013. Optimasi produksi enzimatis diasilgliserol dari CPO dengan sistem kontinu. [Tesis]. Dibimbing oleh I Made Artika dan Tri Panji. Fakultas pasca sarjana, IPB.
- Pereira EB, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM. 2001. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa* : a comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91:739–752.
- Perwitasari U. 2008. Optimasi Produksi Enzimatik dan Isolasi DAG dari CPO. [Tesis]. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.

- Sawangpanya N, Muangchim C, Phisalaphong M. 2010. Immobilization of lipase on CaCO₃ and entrapment in calcium alginate bead for biodiesel production. *Sci J UBU*. Vol. 1. No. 2. 46-51.
- Shaw JF, Chang RC, Wang HJ. 1990. Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. *Biotechnol Bioeng* 35:132-7.
- Suharyanto, Tri-Panji, Abdullah MI, Syamsu K. 2006. Biokonversi CPO dengan desaturase amobil sistem kontinu pada skala semipilot untuk produksi minyak mengandung GLA. *Menara Perkebunan*, 74(2):96-105.
- Suharyanto, Tri-Panji, Perwitasari U. 2011. Optimasi Produksi Diasilgliserol dari Crude Palm Oil Menggunakan Lipase Spesifik 1,3-gliserida dari *Rhizopus oryzae* TP-2. *Menara Perkebunan*. 79(1), 23-29.
- Suzuki, T., Y. Mushiga, T. Yamane & S. Shimizu. 1988. Mass production of lipase by fed-batch cultural of *Pseudomonas Flourescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 417-422.
- Tri-Panji, Suharyanto, Khaswar Syamsu, Eka Herlina. (2001). Peningkatan ketidakjenuhan lipid menggunakan enzim desaturase asal fungi, *Prosiding Seminar Nasional I: Aplikasi Kimia dalam Pengelolaan Sumber Daya Alam dan Lingkungan*, Hotel Santika Yogyakarta, 24-235 Juli 2001, p. 9-17
- Tri-Panji, Suharyanto, A.W. Paulus, Khaswar Syamsu, A.M. Fauzi. (2002a). Produksi dan stabilisasi desaturase dari *Absidia corymbifera*. *Menara Perkebunan* 70(2): 57-69.
- Tri-Panji, Khaswar Syamsu, Eka Herlina. (2002b). Peningkatan Ketidakjenuhan Minyak Sawit Kasar Menggunakan Enzim Desaturase. Laporan Akhir RUT VIII, Kementerian Riset dan Teknologi.
- Tri-Panji, Khaswar Syamsu¹, Suharyanto, Imam Fathurachman (2003). Amobilisasi Desaturase asal *Absidia corymbifera* Menggunakan Butiran Tulang Sapi dan Zeolit. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*
- Tri-Panji, Suharyanto, Gunawan, K. Syamsu (2005). Biokonversi minyak sawit kasar menggunakan desaturase amobil sistem curah pada skala semipilot. *Menara Perkebunan* 73(2): 63-73.
- Tri-Panji, Suharyanto, Arini N. 2008. Lipase Spesifik 1,3-Gliserida dari Fungi Lokal Untuk Biokonversi CPO Menjadi Diasilgliserol. *Menara Perkebunan*. 76(1), 11-22.
- Yasunaga K, Katsuragi Y, Yasukawa T. 2001. Nutritional characteristics of diacylglycerol. In Proc Internat Palm Oil Congress Food Technology & Nutrition Conf, Malaysia 20-22 August 2001. P149-155.
- Yuan Q, Ramprasath VR, Harding SV, Rideout TC, Chan YM, Jones JH. 2010. Diacylglycerol Oil Reduces Body Fat but Does Not Alter Energy or Lipid Metabolism in Overweight, Hypertriglyceridemic Women. *The Journal of Nutrition*. Doi : 10.3945/jn.110.121665.
- Wulan M, Rejoso MT, Hermansyah H. 2007. *Seminar Tjipto Utomo*. Bandung, 30 Agustus 2007.
- Yesiloglu Y dan Sit L. 2011. Biochemical properties of free and immobilized *Candida rugosa* lipase onto Al₂O₃: a comparative study. *Artificial cells, blood substitutes and bitechology*. 39:247-251.
- Zou B, Hu Y, Cui F, Jiang L, Yu D, Huang H. 2014. Effect of surface modification of low cost mesoporous SiO₂ carriers on the properties of immobilized lipase. *Journal of Colloid and interface science*. 417:210-216.