

Sintesis Diasilgliserol Melalui Gliserolisis Enzimatis Kontinu Menggunakan Enzim Lipase Amobil

Septiany Palilingan^{*a}, Tri-Panji^b

^a Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Manado, Tondano, 95619, Indonesia

^b Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI), Bogor, 16128, Indonesia

INFO ARTIKEL

Diterima 25 Januari 2022

Disetujui 31 Maret 2023

Key word:

Diacylglycerol

Immobilized lipase

Continuous glycerolysis

Kata kunci:

Diasilgliserol

Lipase amobil

Gliserolisis kontinu

ABSTRACT

*Synthesis of diacylglycerol (DAG) oil from crude palm oil is still constrained by the high price of commercial lipase that are still imported from abroad. DAG synthesis studies have been carried out using an immobilized lipase produced from local mold *Rhizopus oryzae* and immobilized in zeolite granules. This study aims to determine the optimum enzymatic glycerolysis time in the synthesis of DAG, and to test the activity and stability of immobilized lipase in catalyzing continuous enzymatic glycerolysis. Isolation of the lipase was carried out through precipitation with acetone and immobilized in zeolite granules. DAG synthesis through continuous enzymatic glycerolysis is carried out by flowing the substrate continuously into the bioreactor with various time variations and substrate replacement. The results showed that DAG was successfully synthesized through continuous enzymatic glycerolysis using an immobilized lipase, with optimum glycerolysis time at 21st hour with a DAG conversion value of 33%. The substrate replacement turns out to make the activity and stability of the immobilized lipase tend to decrease.*

ABSTRAK

*Sintesis minyak diasilgliserol (DAG) dari crude palm oil (CPO) masih terkendala mahalnnya harga enzim lipase komersial yang masih diimpor dari luar negeri. Telah dilakukan penelitian sintesis DAG menggunakan enzim lipase amobil yang dihasilkan dari kapang lokal *Rhizopus oryzae* dan diamobilisasi dalam butiran zeolit. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu gliserolisis enzimatis kontinu yang optimum dalam sintesis DAG; serta untuk menguji aktivitas dan stabilitas enzim lipase amobil dalam mengkatalisis gliserolisis enzimatis kontinu. Isolasi enzim lipase dilakukan melalui pengendapan dengan aseton serta diamobilisasi pada butiran zeolit. Sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis kontinu dilakukan dengan mengalirkan substrat secara kontinu ke dalam bioreaktor dengan berbagai variasi waktu dan penggantian substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DAG berhasil disintesis melalui gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil, dengan waktu gliserolisis optimum pada jam ke-21 dengan nilai konversi DAG sebesar 33 %. Adanya penggantian substrat ternyata membuat aktivitas dan stabilitas enzim lipase amobil cenderung semakin menurun.*

*e-mail: spalilingan@gmail.com

*Telp (Hp): 085256407756

Pendahuluan

Kelapa sawit merupakan salah satu komoditas perkebunan Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang agroindustri. Kelapa sawit dapat menghasilkan beragam produk olahan yang bernilai manfaat dan ekonomis yang tinggi. Produk olahan awal yang dapat dihasilkan dari kelapa sawit adalah

Crude Palm Oil (CPO) [1]. Salah satu produk yang dapat disintesis dari bahan baku CPO adalah minyak sehat diasilgliserol (DAG). Keunggulan CPO sebagai bahan baku untuk sintesis DAG antara lain ketersediaannya yang melimpah di Indonesia, mengandung asam lemak tak jenuh tunggal atau MUFA (Monounsaturated fatty acids) yang tinggi, serta

mengandung nutrisi yang penting seperti β -karoten, vitamin E dan tocotrienol [2]

Pola hidup modern yang tidak sehat sekarang ini, telah menjadi faktor penyebab terjadinya peningkatan kasus obesitas di berbagai negara, yang memicu timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, stroke, kolesterol tinggi dan diabetes. Hal ini telah mendorong banyak orang untuk mengkonsumsi minyak sehat seperti minyak DAG. Minyak DAG dapat berperan sebagai minyak sehat karena setelah dikonsumsi dalam tubuh, DAG akan mengalami proses metabolisme yang lebih efisien menjadi sumber energi, sehingga dapat mencegah atau menghambat terjadinya akumulasi lemak dalam tubuh; DAG juga dapat menurunkan kadar *low density lipoprotein* (LDL) yang lebih dikenal sebagai “kolesterol jahat”, trigliserida (TG) dan berperan sebagai inhibitor plasminogen [3] [4] [5]. Selain berperan sebagai minyak sehat, DAG dapat berperan sebagai surfaktan [1], emulsifier [6] dan bahan antimikroba [7].

Menurut Elisabeth *et al.* [8] dan Nouredini *et al.* [9], DAG dapat disintesis secara kimia melalui proses gliserolisis sistem *batch* pada suhu tinggi menggunakan katalis basa/alkali. Akan tetapi, teknik ini memiliki kelemahan yaitu membutuhkan energi yang besar, menghasilkan produk samping yang bersifat toksik, serta menghasilkan produk yang secara fisik berwarna gelap yang kurang menarik. Selain itu, menurut Suharyanto *et al.* [2], proses gliserolisis untuk mensintesis DAG yang dilakukan pada suhu tinggi justru dapat merusak senyawa-senyawa minor yang baik yang terkandung dalam CPO seperti tokoferol, tokotrienol dan karoten. Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk mengatasi rusaknya minyak dan senyawa-senyawa minor dalam sintesis DAG akibat suhu tinggi antara lain oleh Hasanuddin *et al.* [10] dan Pramana dan Mulyani [11] yang telah melakukan proses gliserolisis pada suhu ruang. Akan tetapi, menurut Suharyanto *et al.* [2], sintesis DAG dengan teknik ini masih memiliki kelemahan yaitu sulitnya untuk memperoleh produk DAG yang murni dan terkontrol.

Alternatif lain yang telah dilakukan dalam sintesis DAG selain secara kimia adalah melalui

proses gliserolisis enzimatis menggunakan enzim lipase sebagai biokatalisnya. Beberapa keunggulannya antara lain spesifisitas enzim tinggi, kondisi operasional dilakukan pada suhu dan tekanan rendah, biaya pengolahan limbah rendah, dan produk yang dihasilkan lebih aman. Menurut Ibrahim *et al.* [12], sejumlah fungi yang dilaporkan aktif menghasilkan enzim lipase dalam substrat CPO antara lain *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, dan *Aspergillus niger*. Akan tetapi harga enzim lipase komersial masih relatif mahal dan masih harus didatangkan dari luar negeri, dikarenakan teknik produksi, ekstraksi dan isolasinya yang rumit [8].

Telah dilakukan beberapa penelitian untuk memproduksi enzim lipase dengan biaya yang lebih murah seperti oleh Tri-Panji *et al.* [13] dan Perwitasari [14] yang telah melakukan fermentasi CPO menggunakan kapang lokal *Neurospora sitophila* dan *Rhizopus oryzae* dan dilaporkan mampu memproduksi lipase spesifik 1,3-gliserida. Dengan melihat manfaat minyak DAG, keunggulan CPO sebagai substrat serta potensi kapang lokal yang dapat menghasilkan enzim lipase, maka telah dilakukan penelitian sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis menggunakan enzim lipase. Sebelumnya Suharyanto *et al.* [2] telah melakukan sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis sistem *batch*. [15] telah melakukan sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis sistem kontinu. Kelebihan sistem kontinu dibandingkan sistem *batch* adalah prosesnya mudah diatur dan berjalan secara otomatis, dapat menghemat penggunaan wadah produksi serta dapat berlangsung dengan lebih cepat. Tri-Panji *et al.* [15], telah melakukan gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase bebas (terlarut dalam larutan buffer Tris-HCl pH 7), sedangkan dalam penelitian ini yang merupakan penelitian lanjutan, telah melakukan sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil (dijerap dalam butiran zeolit). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan waktu gliserolisis enzimatis kontinu yang optimum dalam sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil; serta untuk menguji aktivitas dan stabilitas enzim lipase

amobil dalam mengkatalisis gliserolisis enzimatis kontinu dengan membandingkannya dengan enzim lipase bebas berdasarkan prosedur penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Tri-Panji *et al.* [15]

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan-bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain CPO, enzim lipase yang diproduksi dari isolat kapang lokal *Rhizopus oryzae* yang dipelihara pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (*Difco*), gliserol (*E-Merck*), heksana (*E-Merck*), buffer Tris-HCl (*E-Merck*), dan bahan-bahan pendukung lainnya.

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bioreaktor gliserolisis berupa kolom kaca dengan panjang 40 cm dan diameter 4 cm untuk enzim lipase amobil (*custom*) dan tabung kaca dengan panjang 46 cm dan diameter 8,5 cm untuk enzim lipase bebas (*custom*), labu Erlenmeyer (*Pyrex*); pompa peristaltik (*Peristaltic Pump* 131900), pengaduk (*magnetic stirrer*) (IKA C MAG HS 7); statif dan klem serta peralatan gelas dan peralatan pendukung lainnya.

Metode

Isolasi Enzim Lipase dari *Rhizopus oryzae*

Isolat kapang lokal *Rhizopus oryzae* yang tumbuh dalam media PDA diremajakan kembali dengan diinokulasikan ke dalam media PDA baru, dan diinkubasi pada suhu ruang (25°C-30°C) selama 3 – 4 hari. Spora yang tumbuh diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan ke dalam medium fermentasi steril berupa labu Erlenmeyer yang di dalamnya berisi campuran 0,25 gram $MgSO_4$, 0,25 gram KH_2PO_4 , 12,5 gram pepton yang dilarutkan dalam 250 mL akuades yang mengandung CPO 3% dan diinkubasi pada suhu ruang (25°C-30°C) selama 5 hari sambil digoyang menggunakan shaker dengan kecepatan 75 rpm. Setelah proses fermentasi selama 5 hari, biomassa spora yang tumbuh dipisahkan dengan penyaringan vakum menggunakan kertas saring *Whatman* No. 40 dan filtrat yang diperoleh diambil untuk dilakukan proses pengendapan dan isolasi enzim. Filtrat dari enzim kasar lipase yang diperoleh kemudian diendapkan proteinnya

menggunakan aseton dingin dengan perbandingan filtrat dan aseton 1 : 2 (v/v) lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam larutan buffer Tris-HCl pH 7 0,05 M. Larutan enzim yang diperoleh digunakan untuk proses amobilisasi pada butiran zeolit.

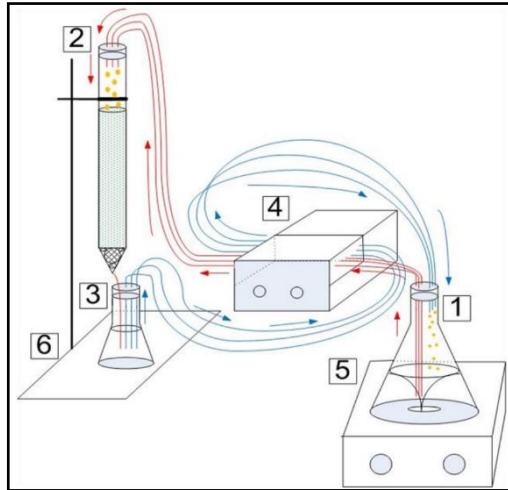
Amobilisasi Enzim Lipase

Butiran zeolit (3 – 5 mm) dicuci dengan air sampai air cucian jernih, kemudian direndam dalam larutan NaCl 1 M selama 12 jam dengan dua kali penggantian larutan sambil digoyang menggunakan shaker secara perlahan. Setelah 12 jam perendaman, butiran zeolit kemudian diaktivasi melalui pemanasan dalam oven pada suhu 200°C selama 15 menit. Setelah butiran zeolit diaktivasi, dilakukan proses amobilisasi enzim lipase dengan cara merendam 200 gram butiran zeolit ke dalam 200 mL larutan enzim lipase dan digoyang pada kecepatan 180 rpm selama 1 jam pada suhu ruang (25°C-30°C) kemudian setelah 1 jam cairan dipisahkan. Butiran zeolit yang telah mengamobilisasi atau menyerap enzim lipase selanjutnya digunakan dalam proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk sintesis DAG.

Optimasi Waktu Gliserolisis Enzimatis Kontinu

Penentuan waktu gliserolisis enzimatis kontinu yang optimum dalam sintesis DAG menggunakan enzim lipase amobil dilakukan dalam bioreaktor gliserolisis melalui sistem pengumpanan substrat yang dilakukan secara kontinu. Bioreaktor gliserolisis berbentuk kolom kaca dengan panjang 40 cm dan diameter 4 cm, diisi butiran zeolit yang telah menyerap enzim lipase (enzim lipase amobil) sebanyak 200 gram. Selanjutnya substrat CPO 90 gram, heksana 600 mL dan gliserol 24 gram dicampurkan dalam labu Erlenmeyer 1000 mL sambil terus diaduk, dialirkan dengan bantuan selang dan pompa peristaltik ke dalam bioreaktor gliserolisis dengan laju alir 3 mL/menit. Skema proses gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil dapat dilihat pada Gambar 1. Proses gliserolisis enzimatis kontinu ini dilakukan dengan variasi waktu setiap 3 jam selama 24 jam. Tiap sampel

produk yang dihasilkan per 3 jam selama 24 jam dianalisis dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sebagai pembanding, dilakukan juga sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase bebas berdasarkan prosedur yang telah dilakukan oleh Tri-Panji *et al.* [15].



Gambar 1. Skema proses gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil.
Keterangan : (1) Substrat (CPO + Heksana + Gliserol)/Sampling Point; (2) Kolom kaca berisi enzim lipase amobil (enzim lipase yang terjerap dalam butiran zeolit) juga sebagai bioreaktor gliserolisis; (3) Produk hasil gliserolisis enzimatis kontinu; (4) Pompa peristaltik; (5) Pengaduk (*Magnetic stirrer*); (6) Statif dan klem.

Analisis Produk DAG dengan Metode KLT

Sampel produk diambil sebanyak 3 μL , lalu ditotolkan sedikit demi sedikit ke dalam lempeng KLT dan dielusikan dengan eluen berupa campuran petroleum benzena, dietil eter dan asam asetat glasial dengan perbandingan 90 : 10 : 1 (v/v). Lempeng KLT yang dielusikan kemudian dibiarkan mengering dan setelah kering dilakukan proses visualisasi noda/bercak menggunakan uap dari kristal iodin. Noda/bercak yang sudah terlihat langsung diberi tanda menggunakan pensil dan dijiplak pada kertas HVS 80 gram lalu ditimbang massa tiap komponen noda/bercaknya.

Penentuan Nilai Konversi dan Laju Konversi

Produk DAG

Nilai konversi serta laju konversi produk DAG dapat ditentukan dengan menentukan terlebih dahulu fraksi massa produk DAG, yang dihitung berdasarkan persentase perbandingan massa produk DAG terhadap massa produk total. Setelah fraksi massa DAG diperoleh selanjutnya dapat ditentukan nilai konversi dan laju konversi produk DAG berdasarkan persentase peningkatan fraksi massa DAG terhadap fraksi massa DAG awal serta persentase peningkatan fraksi massa DAG terhadap fraksi massa DAG awal per satuan waktu gliserolisis.

Pengujian Aktivitas dan Stabilitas Enzim Lipase

Penentuan aktivitas dan stabilitas enzim lipase amobil dalam mengkatalisis proses gliserolisis kontinu, dapat dilakukan dengan cara mengganti substrat CPO sebanyak 3 kali setiap 3 jam dan setiap 3 jam selama 3 kali penggantian substrat diambil sampel sebanyak 3 μL untuk dianalisis produk DAG yang dihasilkan menggunakan metode KLT. Sebagai pembanding, dilakukan juga prosedur yang sama untuk enzim lipase bebas. Tujuan dilakukan penggantian substrat CPO adalah untuk menguji aktivitas dan stabilitas enzim lipase amobil maupun enzim lipase bebas dalam mengkatalisis proses gliserolisis ketika diasumsikan proses gliserolisis ini dilakukan secara berulang sebanyak 3 kali pengulangan.

Hasil dan Pembahasan

Enzim Lipase dari *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae merupakan jenis kapang lokal yang banyak digunakan dalam proses pembuatan tempe kedelai. Kapang lokal ini dipilih karena dikenal aman (*edible*), tidak bersifat toksik, mudah diperoleh, memiliki pertumbuhan yang relatif cepat serta dapat menghasilkan enzim lipase yang spesifik yaitu spesifik 1,3 gliserida [2,14]. Kinerja enzim lipase yang spesifik 1,3 ini sangat penting dalam pemanfaatannya untuk sintesis DAG karena proses gliserolisis enzimatis kontinu diharapkan dapat dikendalikan dan tidak menghasilkan pemecahan total gliserida menjadi asam lemak bebas seperti yang biasa

terjadi pada proses non enzimatis (kimiawi) [13].

Dalam penelitian ini, enzim lipase amobil yang digunakan merupakan enzim lipase yang dihasilkan dari kapang lokal *Rhizopus oryzae* dari tempe kedelai. Isolasi enzim lipase yang dihasilkan dilakukan dengan pengendapan menggunakan aseton. Pemilihan aseton dalam mengisolasi enzim lipase dikarenakan aseton merupakan pelarut yang mudah menguap, sehingga dalam tahap isolasi enzim lipase, sisa aseton dapat menguap dan hanya tersisa endapan enzim lipase, dan endapan enzim lipase inilah yang kemudian diamobilisasi dalam butiran zeolit membentuk enzim lipase amobil. Selain itu, aseton merupakan pelarut polar yang dapat meningkatkan stabilitas enzim lipase [16].

Amobilisasi Enzim Lipase

Penggunaan enzim lipase bebas (terlarut dalam larutan buffer Tris-HCl pH 7) menurut penelitian sebelumnya Tri-Panji *et al.* [15] dilaporkan kurang menguntungkan, hal ini disebabkan karena enzim lipase bebas dalam proses gliserolisis hanya dapat digunakan dalam satu kali reaksi dan sangat sulit untuk dipisahkan dari produk dan substratnya. Enzim lipase dapat digunakan lebih dari satu kali dan dengan mudah dapat dipisahkan dari campuran produk dan substrat ketika enzim tersebut diamobilisasi atau dijerap dalam suatu media padat sehingga dapat digunakan secara berulang dan terpisah dari produk dan substrat tanpa mengganggu aktivitas dari enzim lipase tersebut. Menurut Sharma *et al.* [17] amobilisasi enzim dalam suatu material padat dapat meningkatkan stabilitas dan aktivitas dari enzim tersebut. Teknik amobilisasi dapat dikategorikan secara luas menjadi beberapa teknik antara lain, teknik adsorpsi, teknik pengikatan kovalen, teknik *entrapment* (jebakan) dan teknik mikroenkapsulasi serta dapat pula berupa kombinasi dari dua atau lebih teknik tersebut [18].

Teknik amobilisasi yang telah dilakukan dalam penelitian ini adalah teknik adsorpsi menggunakan butiran zeolit sebagai media penjerapnya. Teknik adsorpsi dipilih karena menurut Knezevic *et al.* [18], teknik amobilisasi dengan adsorpsi adalah teknik yang paling

mudah dan paling murah untuk dilakukan. Teknik adsorpsi didasarkan pada adsorpsi/penjerapan secara fisik atau pengikatan secara ionik, atau keduanya, dari enzim lipase pada permukaan butiran zeolit. Ikatan yang terbentuk antara enzim lipase dengan butiran zeolit (dapat berupa ikatan Van der Waals, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik) hanya memberikan pengaruh yang kecil terhadap aktivitas katalitik enzim lipase.

Dalam penelitian ini teknik amobilisasi enzim lipase pada butiran zeolit sebagai media padatnya memiliki kelemahan yaitu kandungan kalsium dalam struktur zeolit dapat menghambat aktivitas enzim lipase. Ketika kandungan kalsium dalam zeolit tinggi maka enzim lipase akan mengalami kerusakan sehingga aktivitasnya akan menurun. Oleh karena itu, dalam penelitian ini zeolit dipastikan telah bebas dari kandungan kalsium dengan dilakukan pencucian dengan air hingga air cucian jernih dan dilanjutkan dengan perendaman dengan larutan NaCl yang bertujuan untuk mempertukarkan ion Ca^{2+} dengan ion Na^+ , serta dilakukan pemanasan untuk menghilangkan kandungan air pada pori-pori zeolit agar proses adsorpsi enzim lipase dalam butiran zeolit menjadi optimal. Enzim lipase yang telah diamobilisasi atau dijerap dalam butiran zeolit kemudian digunakan dalam proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk sintesis DAG.

Optimasi Waktu Gliserolisis Enzimatis Kontinu

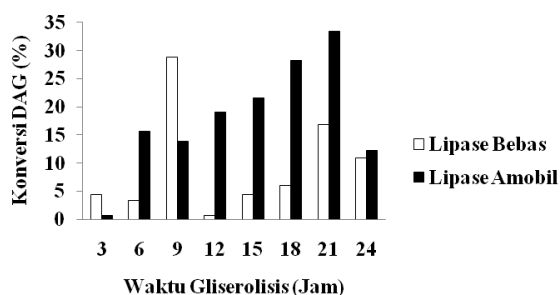
Dalam penelitian ini, telah dilakukan proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk sintesis DAG menggunakan enzim lipase amobil dengan variasi waktu gliserolisis per 3 jam selama 24 jam, yaitu pada jam ke-0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, dan 24. Substrat yang digunakan merupakan campuran CPO dan gliserol yang terlarut dalam heksana dan dialirkan dengan bantuan selang dan pompa peristaltik dengan laju alir 3 mL/menit ke dalam kolom kaca yang telah berisi butiran zeolit yang telah menyerap enzim lipase (enzim lipase amobil) dari bagian atas kolom, dan substrat kemudian akan kontak dengan enzim lipase amobil membentuk produk, di mana produk yang terbentuk kemudian ditampung pada wadah di

bawahnya untuk kemudian dialirkan kembali ke tempat *sampling point* membentuk suatu siklus yang kontinu atau berkesinambungan, di mana skema prosesnya dapat dilihat pada Gambar 1. Produk yang dihasilkan kemudian diambil untuk dianalisis menggunakan metode KLT. Proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk sintesis DAG juga dilakukan menggunakan enzim lipase bebas sesuai prosedur yang telah dilakukan oleh Tri-Panji *et al.* [15], yaitu dengan menggunakan variasi waktu, substrat serta laju alir yang sama yang membedakan hanyalah bentuk enzimnya, yaitu menggunakan enzim lipase bebas (terlarut dalam larutan buffer Tris-HCl pH 7).

Untuk menentukan waktu gliserolisis enzimatis kontinu yang optimum dalam sintesis DAG menggunakan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas, maka perlu dilakukan analisis produk DAG dengan metode KLT dan ditentukan nilai konversi produk DAG dan laju konversi produk DAG.

Analisis dan Penentuan Nilai Konversi Produk DAG

Berdasarkan analisis produk menggunakan metode KLT dan perhitungan nilai konversi produk DAG yang dihasilkan dari gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas, didapatkan nilai konversi DAG seperti pada Gambar 2 di bawah ini :



Gambar 2. Perbandingan nilai konversi DAG pada gliserolisis enzimatis kontinu dengan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas

Berdasarkan data pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa nilai konversi DAG pada gliserolisis enzimatis kontinu yang dikatalisis oleh enzim lipase amobil cenderung mengalami peningkatan secara bertahap seiring dengan

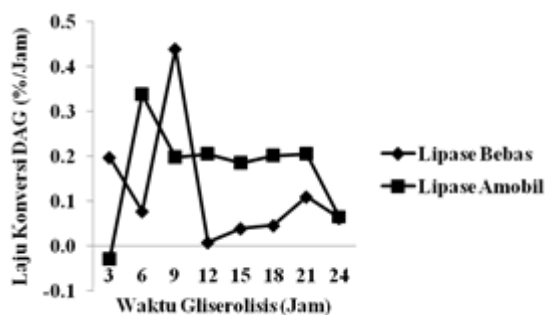
bertambahnya waktu gliserolisis, sedangkan untuk nilai konversi DAG pada gliserolisis enzimatis kontinu yang dikatalisis oleh enzim lipase bebas cenderung menunjukkan pola yang tidak teratur. Dari data pada Gambar 2, kita juga dapat menentukan waktu gliserolisis enzimatis kontinu yang optimum dalam menghasilkan nilai konversi DAG terbesar yaitu pada jam ke-21 dengan nilai konversi sebesar 33% untuk reaksi yang dikatalisis oleh enzim lipase amobil, sedangkan untuk enzim lipase bebas, optimum pada jam ke-9 dengan nilai konversi DAG sebesar 29%. Nilai konversi DAG optimum dengan menggunakan enzim lipase amobil sebesar 33% ini ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan nilai konversi DAG optimum pada penelitian yang dilakukan oleh Perwitasari [14] yang juga telah melakukan sintesis DAG dengan menggunakan enzim lipase bebas melalui gliserolisis dengan sistem batch dan nilai konversi produk DAG optimum yang dihasilkan hanya sebesar 20,76%, hasil ini juga dilaporkan lebih tinggi dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Tri-Panji *et al.* [15] yang juga telah melakukan sintesis DAG melalui gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase bebas dengan nilai konversi DAG optimum pada siklus ke-18 yang hanya sebesar 29%.

Data pada Gambar 2 juga memperlihatkan bahwa enzim lipase amobil ternyata memiliki aktivitas dan stabilitas yang lebih baik dalam mengkatalisis proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk membentuk produk DAG. Hal ini dapat terlihat dari nilai konversi DAG yang dihasilkan, di mana untuk enzim lipase amobil terlihat cenderung membentuk pola konversi yang semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu, sedangkan enzim lipase bebas cenderung tidak memiliki pola yang teratur seperti bisa dilihat pada Gambar 2, pada jam ke-9 bisa naik drastis tapi di jam selanjutnya yaitu jam ke-12 bisa turun drastis mendekati nol. Hasil ini sejalan dengan teori yang dikemukakan oleh Sharma *et al.* [17] dan Knezevic *et al.* [18] yaitu enzim lipase yang diamobilisasi atau dijerap dalam suatu media padat atau media pendukung, akan memiliki kestabilan dan aktivitas yang lebih baik dibandingkan enzim lipase dalam bentuk molekul bebas (terlarut dalam air). Hal tersebut

disebabkan karena enzim lipase amobil dapat dengan mudah dipisahkan dari produk dan dapat lebih fleksibel untuk membentuk kontak enzim-substrat, sedangkan enzim lipase bebas sulit untuk dipisahkan karena berada dalam bentuk terlarut dan ikut bercampur dalam campuran substrat dan produk, sehingga akan berpengaruh terhadap stabilitas dan aktivitas enzim serta produk yang dihasilkan. Ketika suatu enzim lebih stabil dan memiliki aktivitas yang lebih baik maka presentasi produk yang dihasilkan akan lebih besar pula.

Analisis dan Penentuan Laju Konversi Produk DAG

Berdasarkan analisis produk DAG menggunakan metode KLT, kita juga dapat menghitung laju konversi DAG dalam proses gliserolisis enzimatis kontinu yang dikatalisis oleh enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas seperti pada Gambar 3 di bawah ini :



Gambar 3. Perbandingan laju konversi DAG pada gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas.

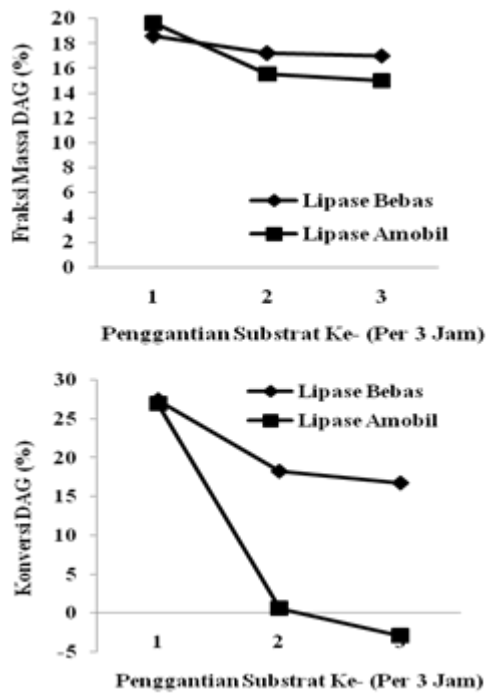
Data pada Gambar 3 di atas menunjukkan bahwa dilihat dari nilai laju konversi DAG, enzim lipase amobil yang mengkatalisis proses gliserolisis enzimatis kontinu memiliki aktivitas katalitik yang lebih baik dan lebih stabil dari enzim lipase bebas, walaupun pada waktu gliserolisis pada jam ke-3 dan pada jam ke-9 enzim lipase bebas terlihat memiliki laju konversi DAG yang lebih tinggi, akan tetapi secara keseluruhan dapat dilihat bahwa laju konversi DAG dengan enzim lipase amobil lebih tinggi dari enzim lipase bebas. Kestabilan ini lebih jelas terlihat pada data waktu gliserolisis jam ke-9 hingga jam ke-21 yang

menunjukkan laju konversi DAG yang relatif sama, itu artinya dari jam ke-9 hingga jam ke-21 enzim lipase amobil memiliki aktivitas dan stabilitas yang relatif konstan atau tetap stabil dan cenderung tidak menurun dalam mengkatalisis proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk membentuk produk DAG, sedangkan untuk enzim lipase bebas hanya pada gliserolisis jam ke-3 dan jam ke-9 yang menunjukkan laju konversi yang lebih tinggi, akan tetapi di variasi waktu gliserolisis yang lain nilai laju konversi DAG untuk enzim lipase bebas lebih rendah dari nilai laju konversi enzim lipase amobil.

Pengujian Aktivitas dan Stabilitas Enzim Lipase

Pengujian aktivitas dan stabilitas enzim lipase bertujuan untuk melihat sejauh mana aktivitas dan stabilitas enzim lipase amobil maupun enzim lipase bebas dalam mengkatalisis proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk sintesis DAG ketika dilakukan penggunaan berulang sebanyak 3 kali. Prosedur ini dilakukan dengan mengganti substrat sebanyak 3 kali setiap 3 jam selama 9 jam proses gliserolisis enzimatis kontinu berlangsung, tetapi enzim lipase amobil juga enzim lipase bebas tidak diganti (tetap dipertahankan). Setiap 3 jam selama 9 jam dilakukan pengambilan sampel produk untuk dianalisis menggunakan metode KLT dan dihitung fraksi massa dan nilai konversi produk DAG.

Data fraksi massa dan nilai konversi produk DAG dari proses gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas setelah dilakukan penggantian substrat sebanyak 3 kali dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini :



Gambar 4. Perbandingan fraksi massa dan konversi produk DAG dari proses gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas setelah dilakukan penggantian substrat sebanyak 3 kali

Dari data tentang fraksi massa dan konversi produk DAG pada Gambar 4 di atas, kita dapat melihat sejauh mana stabilitas dan aktivitas dari enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas dalam mengkatalisis proses gliserolisis enzimatis kontinu ketika dilakukan penggantian substrat sebanyak 3 kali. Terdapat hal yang menarik yang diperlihatkan pada Gambar 4 di atas, di mana ternyata semakin dilakukan penggantian substrat, nilai fraksi massa dan nilai konversi dari produk DAG yang dihasilkan akan semakin menurun. Dengan semakin menurunnya nilai fraksi massa dan nilai konversi produk DAG, menandakan juga semakin menurunnya stabilitas dan aktivitas enzim baik enzim lipase amobil maupun enzim lipase bebas dalam mengkatalisis proses gliserolisis enzimatis kontinu untuk sintesis DAG seiring dengan semakin banyaknya jumlah penggunaan enzim melalui semakin banyaknya jumlah penggantian substrat. Akan tetapi hal yang menarik adalah ternyata proses gliserolisis enzimatis kontinu yang dikatalisis oleh enzim

lipase bebas memiliki nilai fraksi massa dan nilai konversi produk DAG yang lebih tinggi dari enzim lipase amobil, padahal secara teori seharusnya enzim lipase amobil yang seharusnya lebih stabil dan memiliki aktivitas lebih tinggi dari enzim lipase bebas, sehingga dari data pada Gambar 4 penggunaan enzim lipase bebas terlihat cenderung lebih baik dari enzim lipase amobil setelah digunakan lebih dari satu kali, yaitu hingga 3 kali penggunaan.

Ada beberapa hal yang diduga dapat memungkinkan hal tersebut terjadi, antara lain pertama menurut Knezevic *et al.* [18], enzim lipase amobil yang diamobilisasi menggunakan metode adsorpsi pada butiran zeolit dalam penelitian ini memang merupakan teknik yang paling mudah dan murah untuk dilakukan, akan tetapi teknik amobilisasi dengan menggunakan metode adsorpsi akan membentuk ikatan antara enzim lipase dengan butiran zeolit yang sangat lemah (terutama ikatan Van der Waals, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik), sehingga memungkinkan enzim lipase untuk terdesorpsi dari butiran zeolit dan dapat berakibat pada menurunnya stabilitas dan aktivitas dari enzim lipase amobil.

Hal yang kedua dapat disebabkan oleh penggunaan pelarut organik dalam gliserolisis enzimatis kontinu. Menurut Su *et al.* [16], aktivitas enzim lipase amobil akan menghasilkan konversi produk yang tinggi ketika digunakan pelarut organik yang sesuai atau yang cocok dengan enzimnya, agar dapat memecahkan substrat dalam proses esterifikasi ataupun gliserolisis. Adanya pelarut heksana yang digunakan dalam proses gliserolisis enzimatis kontinu dalam penelitian ini, diduga secara bertahap dapat menyebabkan perubahan konformasi dari enzim lipase, sehingga dapat menyebabkan enzim lipase terdenaturasi, yang dapat membuat aktivitas menurun. Su *et al.* [16] sebelumnya telah melakukan pengujian stabilitas enzim lipase amobil dalam proses transesterifikasi minyak sayur untuk produksi FAME (*Fatty acid methyl esters*) dan dilaporkan bahwa ternyata stabilitas enzim lipase amobil akan makin menurun seiring dengan bertambahnya jumlah pemakaian sebanyak 5 kali. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Su *et al.* [16] menguatkan hasil penelitian ini di mana semakin bertambah jumlah pemakaian enzim

lipase baik amobil maupun bebas akan semakin menurunkan stabilitas dan aktivitas dari enzim lipase.

Hal yang ketiga dapat disebabkan oleh penggunaan buffer dalam butiran zeolit sebagai media penjerap enzim lipase yang masih kurang, yang dapat menyebabkan menurunnya aktivitas enzim lipase amobil [19]. Dalam penelitian ini enzim lipase yang terjerap dalam butiran zeolit hanya dibasahi oleh larutan buffer Tris-HCl, dengan asumsi bahwa butiran zeolit yang telah menyerap enzim lipase telah terlindung dengan larutan buffer, kondisi ini sangat berbeda dengan gliserolisis menggunakan enzim lipase bebas yang terlindung/terlarut dalam larutan buffer dalam jumlah yang banyak sehingga kemungkinan enzim lipase untuk terdenaturasi oleh pelarut organik heksana menjadi lebih kecil dibandingkan enzim lipase amobil. Akan tetapi, menurut Su *et al.* [16], kandungan air dalam campuran reaksi juga dapat mempengaruhi aktivitas katalitik dari enzim lipase. Semakin banyak jumlah kandungan air maka akan menghasilkan konversi produk yang makin kecil, sehingga perlu untuk ditentukan komposisi yang tepat dalam perbandingan jumlah larutan buffer, pelarut organik serta enzim lipase yang digunakan dalam proses esterifikasi maupun gliserolisis untuk menghasilkan produk yang optimal.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa proses gliserolisis enzimatis yang dilakukan secara kontinu menggunakan enzim lipase amobil dan enzim lipase bebas telah berhasil mensintesis produk DAG dengan waktu gliserolisis enzimatis kontinu menggunakan enzim lipase amobil yang optimum dalam menghasilkan produk DAG adalah pada jam ke-21, dengan nilai konversi DAG sebesar 33% lebih tinggi dari enzim lipase bebas yang optimum pada jam ke-9 dengan nilai konversi DAG sebesar 29% untuk sekali penggunaan enzim dan sekali penggunaan substrat, akan tetapi pada prosedur pengujian aktivitas dan stabilitas enzim lipase ketika dilakukan penggunaan enzim lipase secara berulang sebanyak 3 kali melalui penggantian substrat sebanyak 3 kali,

dapat disimpulkan bahwa semakin bertambah jumlah penggunaan enzim lipase baik amobil maupun bebas akan semakin menurunkan stabilitas dan aktivitasnya dalam menghasilkan produk DAG.

Daftar Pustaka

1. Anggirasti, H.P.; Andarwulan, N.; Haryati, T. Gliserolisis RBDPO (Refined Bleached Deodorized Palm Oil) Dengan Lipase Untuk Sintesis MDAG (Mono-Diasilgliserol).; 2008; pp. 1062–1070.
2. Suharyanto, T.-P.P.U.; Perwitasari, U. Optimasi Produksi Diasilgliserol Dari Crude Palm Oil Menggunakan Lipase Spesifik 1, 3-Gliserida Dari *Rhizopus Oryzae* TP-2. *Menara Perkebunan* **2011**, *79*, 23–29.
3. Nagao, T.; Watanabe, H.; Goto, N.; Onizawa, K.; Taguchi, H.; Matsuo, N.; Yasukawa, T.; Tsushima, R.; Shimasaki, H.; Itakura, H. Dietary Diacylglycerol Suppresses Accumulation of Body Fat Compared to Triacylglycerol in Men in a Double-Blind Controlled Trial. *The Journal of Nutrition* **2000**, *130*, 792–797, doi:10.1093/jn/130.4.792.
4. Murase, T.; Mizuno, T.; Omachi, T.; Onizawa, K.; Komine, Y.; Kondo, H.; Hase, T.; Tokimitsu, I. Dietary Diacylglycerol Suppresses High Fat and High Sucrose Diet-Induced Body Fat Accumulation in C57BL/6J Mice. *Journal of Lipid Research* **2001**, *42*, 372–378, doi:10.1016/S0022-2275(20)31661-8.
5. Yuan, Q.; Ramprasath, V.R.; Harding, S.V.; Rideout, T.C.; Chan, Y.-M.; Jones, P.J.H. Diacylglycerol Oil Reduces Body Fat but Does Not Alter Energy or Lipid Metabolism in Overweight, Hypertriglyceridemic Women. *The Journal of Nutrition* **2010**, *140*, 1122–1126, doi:10.3945/jn.110.121665.
6. Nuraeni, F. Sintesis Mono-Diasilgliserol (MDAG) Dari Destilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) Melalui Esterifikasi Enzimatis. **2008**.
7. Mintarti, I.S.; Kusumah, S.H. Kajian Aktivitas Antimikroba Monoasilgliserol (MAG) Dan Mono-Diasilgliserol (MDAG) Dari Minyak Kelapa Dan Minyak Inti Sawit. *Syntax Literate; Jurnal Ilmiah Indonesia* **2017**, *2*, 65–76.
8. Elisabeth, J.; Jatmika, A.; Sitanggang, O. Optimasi Proses Gliserolisis Enzimatis Pada Minyak Sawit Untuk Meningkatkan Monogliserida. *J Penelitian Kelapa Sawit* **1999**, *7*, 173–185.
9. Nouredini, H.; Harkey, D.W.; Gutsman, M.R. A Continuous Process for the Glycerolysis of Soybean Oil. *J Amer Oil Chem Soc* **2004**, *81*, 203–207, doi:10.1007/s11746-004-0882-y.

10. Hasanuddin, A.; Hutomo, G.S. Pola Perubahan Mono Dan Diasilgliserol Dalam Reaksi Etanolisis Minyak Sawit Mentah.
11. Sigit Pramana, Y.; Mulyani, S. PROSES GLISEROLISIS CPO MENJADI MONO DAN DIACYL GLISEROL DENGAN PELARUT TERT-BUTANOL DAN KATALIS MgO. **2009**.
12. Ibrahim, C.; Noor Izani, N.; Darah, I. Isolation and Identification of Exogenous Lipase Producing Fungi Using Palm Oil Medium. *J. Biosci* **1991**, 2, 59–69.
13. Tri-Panji, S.A.N.; Arini, N. Lipase Spesifik 1, 3-Gliserida Dari Fungi Lokal Untuk Biokonversi CPO Menjadi Diasilgliserol. *Menara Perkebunan* **2008**, 76, 11–22.
14. Perwitasari, U. Optimasi Produksi Enzimatik Dan Isolasi DAG Dari CPO.
15. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor , Indonesia; -, T.-P.; C. Palilingan, S.; Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia; Artika, I.M.; Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia OPTIMASI PRODUKSI ENZIMATIS DIASILGLISEROL MELALUI GLISEROLISIS KONTINU. *jtip* **2014**, 25, 16–22, doi:10.6066/jtip.2014.25.1.16.
16. Su, E.-Z.; Zhang, M.-J.; Zhang, J.-G.; Gao, J.-F.; Wei, D.-Z. Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of Vegetable Oils for Fatty Acid Methyl Esters Production with Dimethyl Carbonate as the Acyl Acceptor. *Biochemical Engineering Journal* **2007**, 36, 167–173, doi:10.1016/j.bej.2007.02.012.
17. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances* **2001**, 19, 627–662, doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6.
18. Knezevic, Z.; Siler-Marinkovic, S.; Mojovic, L. Immobilized Lipases as Practical Catalysts. *Acta per tech* **2004**, 151–164, doi:10.2298/APT0435151K.
19. Sawangpanya, N.; Muangchim, C.; Phisalaphong, M. Immobilization of Lipase on CaCO₃ and Entrapment in Calcium Alginate Bead for Biodiesel Production. *Science Journal Ubon Ratchathani University* **2010**, 1, 46–51.