



SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA V
"Kontribusi Kimia dan Pendidikan Kimia dalam
Pembangunan Bangsa yang Berkarakter"
Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS
Surakarta, 6 April 2013



MAKALAH
PENDAMPING

KIMIA ORGANIK
(Kode : G-08)

ISBN : 979363167-8

LIPASE *CANDIDA RUGOSA* IMMOBILISASI SEBAGAI BIOKATALISATOR PADA SINTESA LIPID TERSTRUKTUR KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3 DENGAN PROSES ASIDOLISIS ENZIMATIK DARI MINYAK IKAN TUNA DAN ASAM LAURAT

Wahyuningsih¹, Edy Supriyo²

^{1,2} PSD III TEknik Kimia, Fakultas Teknik, Undip. Jl Prof Sudharto, Tembalang, Semarang

ABSTRAK

Lipase *candida rugosa immobilis*, dapat digunakan dengan baik untuk sintesa Lipid Terstruktur dari minyak ikan tuna dengan asam laurat. Kondisi optimum reaksi adalah pada suhu 50°C, konsentrasi lipase 10%, perbandingan ratio substrat (Minyak ikan tuna : asam laurat) 1:10 selama 12 jam. Profil gliserida dari hasil asidolisis enzimatis adalah 78,1 % trigliserida, 32,2 % Digliserida dan 11,9% Monogliserida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi lipase dan suhu reaksi optimum berturut-turut 10% dan 50°C. Rasio mol optimum minyak ikan dan asam laurat adalah 1:10, dihasilkan inkorporasi asam laurat mencapai 62,8 mol%. Pada waktu inkubasi 12 jam, trigliserida menurun seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi, sedangkan digliserida meningkat seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Pada suhu reaksi di atas 50°C, trigliserida menurun seiring dengan meningkatnya suhu reaksi. Metode interesterifikasi ini cukup efektif untuk mensintesis lipid terstruktur spesifik.

Kata kunci: Lipid terstruktur, lipase immobilisasi, minyak ikan tuna

PENDAHULUAN

Sintesis lipid terstruktur telah berkembang pesat dalam satu dekade ini dengan memodifikasi lipid terutama untuk meningkatkan sifat fungsional dan nutrisi suatu lemak atau minyak. Lipid terstruktur dengan asam lemak rantai medium (C₆-C₁₂) pada posisi luar dan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada posisi sn-2 memiliki nilai gizi dan absorpsi yang sangat baik [11]. Residu

rantai medium dengan mudah terhidrolisis di dalam saluran pencernaan menghasilkan asam lemak yang diabsorpsi dengan cepat dan digunakan sebagai sumber energi yang tinggi di dalam tubuh. PUFA terabsorpsi sebagai 2-MG yang paling siap diabsorpsi diantara senyawa turunan PUFA. Lipid terstruktur dengan residu jenuh pada posisi luar dan PUFA pada posisi sn-2 juga lebih tahan terhadap

oksidasi [6]. Lipid terstruktur (SL) dapat disintesis dengan interesterifikasi lipid baik secara enzimatis maupun kimia, tetapi metode enzimatis lebih disukai karena enzim memiliki aktivitas biokatalitik yang tinggi dan spesifik. Penggunaan enzim sebagai katalis juga lebih ramah lingkungan dibandingkan secara kimiawi karena limbah dari bahan kimia umumnya berbahaya bagi lingkungan [2].

Berbagai metode sintesis lipid terstruktur spesifik secara enzimatis telah dilakukan diantaranya melalui pembentukan triasilgliserol (TAG) dari gliserol dan asam lemak (biasanya PUFA) yang dilanjutkan asidolisis dengan asam lemak tertentu, biasanya *medium chain fatty acid* (MCFA) menggunakan lipase spesifik-1,3 [5]. Sintesis lipid terstruktur spesifik juga telah diteliti dengan melakukan etanolisis pada minyak ikan untuk memperoleh 2-monogliserida yang dilanjutkan dengan esterifikasi dengan asam kaprilat secara enzimatis sehingga diperoleh lipid terstruktur dengan asam kaprilat pada posisi luar dan PUFA pada posisi sn-2 [11], tetapi proses tersebut kurang ekonomis dan perlu pengendalian proses yang rumit.

Selama ini sintesis lipid terstruktur yang mengandung PUFA dan MCFA umumnya menggunakan asam kaprilat sebagai sumber MCFA, sangat jarang yang menggunakan asam laurat. Metode interesterifikasi antara minyak

ikan dengan asam laurat juga belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini sintesis lipid terstruktur dilakukan dengan metode interesterifikasi (asidolisis) antara minyak ikan dengan asam laurat yang dikatalisis lipase *Mucor miehei* yang bersifat spesifik 1,3 sehingga diharapkan asam laurat hanya akan menempati posisi 1,3 dari kerangka gliserol minyak ikan sedangkan PUFA tetap tertinggal dan berada pada posisi sn-2. Namun demikian, harga lipase masih mahal dan mudah terjadi inaktivasi jika dalam bentuk enzim bebas [3]. Immobilisasi enzim diperlukan untuk memperpanjang umur simpan dan memperbaiki stabilitas enzim, Immobilisasi enzim merupakan cara yang penting untuk menggantikan konvensional heterogeneous katalis [23,24]. Disamping memperbaiki stabilitas, enzim amobil mempunyai keuntungan antara lain dapat digunakan kembali (reusability), mudah dipisahkan setelah proses reduksi, mudah dikendalikan dan proses menjadi lebih ekonomis. Akhir-akhir ini pengembangan metode immobilisasi enzim dan matrik(carier) untuk immobilisasi enzim merupakan topik yang penting pada penelitian *enzyme engineering*.

Pengkajian dilakukan terhadap konsentrasi lipase terimmobilisasi *candida rugose* dan suhu reaksi sehingga diperoleh waktu reaksi dan

kondisi proses yang optimal .Profil gliserida yang terbentuk diamati.

METODOLOGI PENELITIAN

Karakterisasi Minyak ikan

Karakterisasi minyak ikan meliputi beberapa sifat fisik dan kimianya, yaitu kadar air dan senyawa volatil [2], angka asam dan asam lemak bebas [2], angka penyabunan [2], Angka peroksida [12], komposisi gliserida [15], dan berat molekul rata-rata.

Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai konsentrasi lipase immobilisasi

Interesterifikasi dilakukan pada berbagai konsentrasi lipase immobilisasi (1%;5%;10%;15%;20%) untuk mengetahui konsentrasi lipase immobilisasi terhadap efisiensi inkorporasi dan profil gliserida yang diperoleh.Reaksi dilakukan dalam Erlenmeyer tertutup yang diinkubasi dalam waterbath shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 40°C selama 12 jam . hasil reaksi selanjutnya diperlakukan seperti pada prosedur interesterifikasi enzimatis pada berbagai suhu reaksi. Untuk mengetahui tingkat keasaman substrat dilakukan pengukuran pH dengan pHmeter.

Analisis profil gliserida dengan kromatografi lapis tipis (TLC)

Plat TLC silika gel GF 254 diaktifkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Sebagai larutan pengembang digunakan campuran

petroleum eter : dietil eter : asam asetat (60:40:1). Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan TLC Scanner CAMAG II pada panjang gelombang 350 nm.

Preparasi FAME [16] dan analisis dengan *gas chromatography* untuk menentukan inkorporasi asam laurat

Sebanyak 200 µl lipid terstruktur dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 50µl (konsentrasi 0,1 g/ml) internal standar asam heptadekanoat, 100µl metilen klorida dan 1ml NaOH 0,5 N dalam metanol. Ke dalam tabung diberi gas nitrogen sebelum dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit. Setelah dingin ditambah 1ml BF₃ 14% dalam metanol, kemudian dipanaskan lagi selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 1ml aquades dan 200-500 µl heksana dan divorteks untuk mengekstrak metil ester asam lemak. Fraksi heksana merupakan FAME dan siap untuk dianalisis dengan GC. Kromatografi gas (GC) yang digunakan dilengkapi dengan kolom HP 5 (5% Phenyl Methyl Siloxone) panjang 30m. Temperatur kolom mula-mula 180°C ditahan selama 2 menit kemudian dinaikkan 10°C/menit sampai suhu mencapai 280°C. Temperatur injektor 280°C dan detektor yang digunakan adalah FID dengan suhu 300°C. Gas Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan aliran 10 ml/menit.

Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai suhu reaksi

Waktu reaksi yang optimal kemudian digunakan untuk mengkaji pengaruh suhu reaksi dengan variasi suhu 30, 40, 50, 60, dan 70°C. Sebanyak 1,43 gram minyak ikan dicampur dengan 4 gram asam laurat (rasio molar minyak ikan : asam laurat 1:10) dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan lipase 0,543 gram *candida rugose* (10% dari substrat) dan 8,1 ml heksana (1,5 kali berat substrat). Erlenmeyer ditutup rapat lalu diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu bervariasi dengan kecepatan 120 rpm selama 12 jam. Setelah direaksikan selama 12 jam, campuran hasil reaksi selanjutnya diperlakukan seperti pada prosedur interesterifikasi enzimatis pada berbagai waktu reaksi.

3-8.Preparasi FAME dan analisa penentuan inkorporasi asam laurat

Preparasi Fame dilakukan sesuai dengan metode [16].Sebanyak 200µl Lipid terstruktur dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 50µ l (konsentrasi 0,1 g/ml) internal standar asam heptadekanoat,100 µl metilen klorida dan 1 ml NaOH 0,5 N dalam methanol. Kedalam tabung diberi gas Nitrogen sebelum dipanaskan pada suhu 90 °C selama 10 menit.Setelah dingin ditambah 1 ml aquades dan 200-500 µl heksana dan divorteks untuk mengekstrak methyl ester asam lemak.Fraksi heksana merupakan

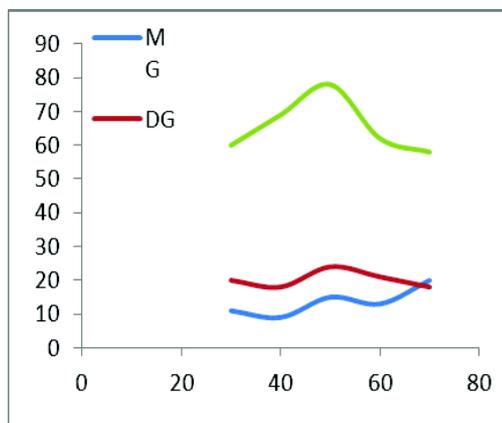
FAME dan siap dianalisa dengan Gas Kromatografi (GC)

PEMBAHASAN:

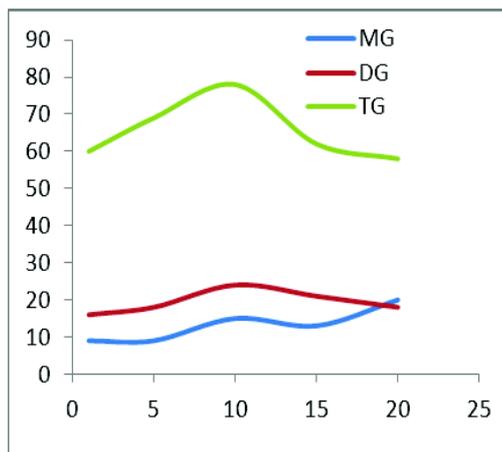
Reaksi kimia membutuhkan panas dalam jumlah tertentu sebesar energy aktivasi untuk mencapai tahap transisi kemudian membentuk produk.Keterlibatan enzim lipase sebagai biokatalis menurunkan level energy aktivasi [14], sehingga menurunkan kebutuhan panas dan mempercepat reaksi dibandingkan dengan reaksi tanpa katalis. Archenius menyatakan bahwa laju reaksi meningkat dengan meningkatnya suhu reaksi [5]. Naiknya suhu reaksi menurunkan viskositas campuran reaksi,sehingga membantu mobilisasi molekul substrat untuk bereaksi [3]. Namun demikian karena enzim adalah protein yang terdenaturasi secara irreversible pada suhu tinggi maka kenaikan suhu reaksi terbatas pada temperature rendah [3]. Menurut [17] ,suhu optimum lipase imobile adalah 30-62°C. Dari reaksi asidolisis minyak ikan tuna dengan asam laurat dengan biokatalis lipase *candida Rugose imobile*, diperoleh pada suhu optimum 50°C,waktu 12 jam.

Gambar 1 secara umum menunjukkan pada suhu diatas 50°C komponen trigliserida menurun dengan naiknya suhu reaksi .Penurunan tersebut menandakan terjadinya esterifikasi partial komponen trigliserida menghasilkan produk antara digliserida dan monogliserida. Hal tersebut

mungkin disebabkan oleh terjadinya migrasi gugus asil yang menyebabkan reaksi asidolisis tidak sempurna [25]. Migrasi asil merupakan berpindahnya asil dari trigliserida dari posisi Sn 2 ke posisi sn-1 atau sn-3. Berpindahnya asil tersebut dapat menyebabkan posisi sn-2 kosong sehingga terbentuk digliserida ataupun monogliserida.



Gambar 1. Profil gliserida lipid terstruktur akibat pengaruh suhu reaksi



Gambar 2. Profil gliserida lipid terstruktur karena pengaruh konsentrasi Lipase

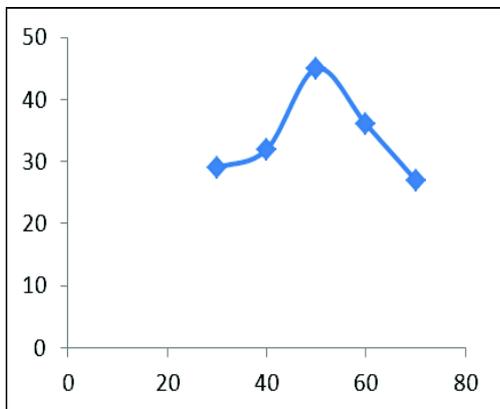
Migrasi asil dapat dipicu oleh tingginya suhu reaksi, kadar air, dan ratio

substrat. Selanjutnya juga diketahui bahwa suhu reaksi dan waktu reaksi memicu terbentuknya 1,3-diasilgliserol lebih besar daripada 1,2-diasilgliserol [25]. Dengan terbentuknya 3-diasilgliserol maka lipase spesifik 1,3 dari *Candida rugosa* tentu tidak dapat atau sulit untuk mengkatalisis asidolisis pada posisi sn-2. Dengan demikian, hal tersebut dapat menurunkan komponen trigliserida dan justru meningkatkan digliserida ataupun monogliserida.

Pengaruh konsentrasi lipase terhadap profil gliserida lipid terstruktur ditunjukkan pada Gambar 2. Komponen TG (trigliserida) meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi lipase (sampai konsentrasi 10%), hal ini disebabkan karena lipase *Candida rugosa* sangat spesifik untuk asam laurat [17] dan memiliki aktivitas relative rendah terhadap PUFA terutama DHA [11]. Ketika konsentrasi lipase rendah maka kecenderungan reaksi berjalan kekanan cukup lemah dan kemampuan lipase untuk mengkatalisis untuk proses asidolisis juga relative kecil. Komponen TG (trigliserida) justru menurun jika konsentrasi lipase dinaikkan, hal ini mungkin berkaitan dengan aktivitas lipase yang menurun dengan semakin banyaknya asam lemak bebas. Asam lemak bebas menyebabkan desorpsi air dari interface kemudian mengambil bagian interface air disekitar enzim dan meningkatkan kelarutannya dalam air sehingga akan

membatasi masuknya substrat pada interface. Penurunan aktivitas lipase tersebut menyebabkan terbentuknya produk intermediate dan reaksi asidolisis tidak sempurna.

Gambar 4 menunjukkan bahwa inkorporasi asam laurat pada lipid terstruktur (42%) meningkat sampai konsentrasi lipase 10 %, jika konsentrasi dinaikkan lagi mengakibatkan penurunan tingkat inkorporasinya (32 % untuk lipase 15%). Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain: (1) kompetisi asam laurat dan asam lemak bebas lain, (2) penurunan pH larutan dengan penambahan asam laurat, (3) Substrat inhibitor dan (4) desorpsi air pada interface.



Gambar 4, Pengaruh suhu terhadap inkorporasi asam laurat pada waktu inkubasi 12 jam

KESIMPULAN

Lipase *candida rugose immobile*, dapat digunakan dengan baik untuk sintesa Lipid Terstruktur dari minyak ikan tuna dengan asam laurat. Kondisi optimum reaksi adalah pada suhu 50°C, konsentrasi lipase

10%, perbandingan ratio substrat (Minyak ikan tuna : asam laurat) 1:10 selama 12 jam. Profil gliserida dari hasil asidolisis enzimatis adalah 78,1 % trigliserida, 32,2 % Digliserida dan 11,9% Monogliserida.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan Terma kasih dan penghargaan ditujukan pada:

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberi bantuan atas terlaksananya penelitian ini
2. Dekan Fakultas Teknik Undip yang telah memberikan dana untuk penelitian ini
3. Ketua Program Studi Diploma III Teknik Kimia yang sudah memberikan fasilitas Laboratorium

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Ackman. A., Y. Shimada, M. Yamamoto, A. Sugihara, T. Nagao, S. Komemushi, dan Y. Tominaga. 1982. *Enzymatic Synthesis of High-Purity Structured Lipids with Caprylic Acid at 1,3-Positions and Polyunsaturated Fatty Acid at 2-Position*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (6) : 611 – 616
- [2] Ahmadi.A.M., Marangoni, 2009, *Enzymatic Interesterification*, in Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, West Virginia; Marcell Dekker Inc
- [3] Akoh, C. C. 2002. *Structured lipids*. In: *Food Lipids, Chemistry, nutrition*,

- and *Biotechnology*. West Virginia University, Morgantown, West Virginia. Marcel Dekker Inc. New York
- [4] AOCS. 1989. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemistry Society*. 4th ed. Broadmaker Drive, Champaign, Illinois
- [5] Chiffci, I. C., P. T. Quinlan, dan G. P. McNeill. 2009. *Lipase-Catalyzed Synthesis of Chiral Triglycerides*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 75: 1513 – 1518
- [6] Endo, Y., S. Hoshizaki, dan K. Fujimoto. 1997. *Autoxidation of Synthetic Isomers of Triacylglycerol Containing Eicosa pentaenoic Acid*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 74: 543-548
- [7] FAO/WHO/CAC/RS 19 1981 rev.1, 1989. In: *Guidelines for Characterizing Food-Grade Fish Oil*. Inform, Vol. 9. no. 5. 473-481
- [8] Greyt, R., M. Yasui, Y. Iwasaki, N. Shimidzu, dan T. Yamane. 2004. *Enzymatic Synthesis of 1,3-Dicapryloyl-2-Eicosapentaenoyl-glycerol*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (7) :743 – 748
- [9] Huyghebaert, J. R., D. H. Pence, S. Scheinsach, P. R. D'Amelia, L. P. Klemann, N. H. Wilson, dan J. W. Finkey. 1994. *Review of Triacylglycerols Digestion, Absorption, And Metabolism With Respect to Salatrim Triacylglycerols*. J. Agri. Food. Chem. 42: 473-483
- [10] Idris, R., K. Dian, K. Furihata, K. Hata, Y. Iwasaki, dan T. Yamane. 2005. *Two-Step Enzymatic Synthesis of Docosahexaenoic Acid-Rich Symmetrically Structured Triacylglycerols Via 2-Monoacylglycerols*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (7) :743 – 748.
- [11] Irimescu, R., Y. Iwasaki, dan C. T. Hou. 2001. *Study of Ethanolysis to 2-MAG by Immobilized Candida Antarctica Lipase and Synthesis of Symmetrically Structured TAG*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 79 (9) : 879 – 883
- [12] IUPAC. 1979. *Standard Methods for the Analysis for Oil, Fats and Derivates*. Pergamon Press. Oxford
- [13] Jeyarani, R., M. Yasui, Y. Wasaki, R. Reddy, N. Shimidzu, dan T. Yamane. 2000. *Enzymatic Synthesis of 1,3-Dicapryloyl-2-Eicosapentaenoyl-glycerol*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (7) :743 – 748
- [14] Muchtadi, F. X., H. R. Reyes, H. S. Garcia, C. G. Hill, Jr dan C. H. Amundson. 1991. *Kinetics and Mechanisms of Reaction Catalized by Immobilized Lipases*. Enzyme Microb. Technol. 14: 426-446
- [15] Murtini, E. 1992. *Hidrolisis Minyak Hati Ikan Cod dengan Lipase Teramobil dari Mucor miehei*. Thesis. Program Pascasarjana

- Universitas Gadjah Mada.
Yogyakarta.
- [16] Park, P. W. dan R. E. Goins. 1994. *In Situ Preparation of Fatty Acids Metil Ester for Analysis of Fatty Acids Composition in Food*. J. of Food Science. 59 (6): 1262 – 1266
- [17] Probondari, P.S, 2007, Interesterifikasi asam lemak omega 3 dari minyak ikan tuna dan asam laurat dengan lipase candida rugosa immobile, jurnal Teknologi dan industri pangan vol XI no 2
- [18] Rao, R., B. Manohar, K. Sambiah, dan B. R. Lokesh. 2002. *Enzymatic Acidolysis in Hexane to Produce n-3 or n-6 FA-Enriched Structured Lipids from Coconut Oil: Optimization of Reactions by Response Surface Methodology*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 70 (9) : 885 – 890
- [19] Savitri S., 1997. Dalam: *Hidrolisis Minyak Hati Ikan Cod dengan Lipase Teramobil dari *Mucor miehei**. Thesis. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- [20] Swern, C., H. Austin, L. Porsorske, dan J. Gonziez. 1988. *Charachteristic of an Immobilized Lipase for the Commercial synthesis of Ester*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 65 (6): 927-935
- [21] Subroto. E., C. Hidayat., Supriyadi, 2007, Interest erifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat untuk sintesa lipid terstruktur, Jurnal Teknologi dan industri pangan, Vol XII no 1
- [22] Wilis, W. M., dan A. G. Marangoni. 2002. *Enzymatic Interesterification*. In: *Food Lipid, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. West Virginia University, Morgantown. West Virginia. Marcel Dekker Inc. Newyork
- [23] Yang., H. Mu, A. R. H. Skands, C. E. Hoy, dan J. A. Nissen. 2003. *Parameters Afecting Diacylglycerol Formation During the Production of Specific-Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 76 (2): 175-181
- [24] Zhang., 2001. *Enzymatic Production of Structured Lipids: Process Reaction and Acyl Migration*. Inform 11 (October): 1121-1131
- [25] White, V. V., dan C. Akoh. 2009. *Lipase-Catalyzed Acidolysis of tristearin with Oleic or Caprylic Acids to Produce Structured Lipids*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 77 (5): 495- 500

TANYA JAWAB

PARALEL : G

NAMA PEMAKALAH : Wahyuningsih

NAMA PENANYA : Sri M.

PERTANYAAN :

1. Uji omega-3 terstruktur hasilnya seperti apa ?

JAWABAN :

1. Hasil omega-3 kita uji EPA dan DITA dengan GC.

Kitin beli sudah berupa _____. Kitin dari jurusan Teknik Kimia UNDIP, bahkan dari ketosa.