

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

Enzymatic glycerolysis of CPO using immobilized lipase for production of diacyl- and monoacyl glycerol

Tri-PANJI^{1*)}, Irma KRESNAWATY¹⁾, Firda DIMAWARNITA¹⁾, Susy SAADAH²⁾, Tri AMININGSIH³⁾ & Mira MIRANTI³⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128, Indonesia

²⁾Program Studi Biokimia Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dramaga Kampus IPB Dramaga Bogor 16680, Indonesia

³⁾Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Pakuan Bogor, Jl. Pakuan PO Box 452 Bogor 16143, Indonesia

Diterima tgl 6 November 2018 / disetujui tgl 14 April 2019

Abstract

CPO is one of the largest plantation commodities that has a lot of derivative products, among others are DiAcyl Glycerol (DAG) and MonoAcyl Glycerol (MAG). These derivative products have much higher added value because these can serve as healthy oil that able to prevent fat accumulation in human body. The industry of the derivative products is not yet developed in Indonesia, among others are caused by underdeveloped technology of specific lipase enzyme for the production of DAG 1,3-glycerides, the stability and the activity of lipase enzyme need to be improved. This research was conducted with the aim to develop the production technology for 1,3-glycerides, develop the technology for lipase immobilization, develop the technology for CPO glycerolysis with immobilized lipase, and obtain the data composition of glycerolysis products. Lipase-producing fungi were isolated from tempeh, then cultured in a growth medium containing CPO. Lipase was then immobilized on several solid support. Glycerolysis product composition was analyzed by Thin Layer Chromatography. The research results showed that the immobilization of lipases from *Rhizopus oryzae* with adsorption techniques can be performed using zeolite, CaCO₃, silica gel, and cow bones. The highest activity of immobilized lipase is on CaCO₃ as much as 99.46%, then on cow bones (91.56%), on zeolite (90.69%), and silica gel (59.63%). The optimum condition of non immobilized lipase is pH 7 and temperature 30 °C, while immobilized lipase on CaCO₃ is at pH 8 and temperature 35 °C. Lipase immobilized on zeolite is at pH 8 and temperature of 30 °C, on cow bone is at pH 7 and temperature of 30 °C, and on silica gel is at pH 8 and temperature of 30 °C. The all immobilized lipases are more stable than the free enzyme since the first week of storage. The optimum time of DAG production by immobilized lipase on CaCO₃

is 18 hours to produce DAG level of 34.49% of the substrate.

[Keywords: enzymatic glycerolysis, lipase, DAG, MAG, enzyme immobilization]

Abstrak

CPO merupakan komoditas perkebunan yang memiliki banyak produk turunan, di antaranya Diasil Gliserol (DAG) dan Monoasil Gliserol (MAG). Produk turunan tersebut memiliki nilai jual yang tinggi karena dapat berfungsi sebagai minyak sehat dengan kemampuannya mencegah akumulasi lemak dalam tubuh. Industri produk turunan ini belum banyak berkembang di Indonesia 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 ini bertujuan untuk mengembangkan teknologi produksi lipase spesifik 1,3-gliserida, teknologi amobilisasi lipase, teknologi gliserolisis CPO dengan lipase amobil, dan memperoleh data komposisi produk gliserolisis. Fungi penghasil lipase diisolasi dari tempe atau oncom, kemudian dibiakkan dalam media tumbuh mengandung CPO. Lipase kemudian diamobilisasi dalam beberapa padatan pendukung. Komposisi produk gliserolisis dianalisis dengan metode Kromatografi Lapis Tipis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa amobilisasi enzim lipase *Rhizopus oryzae* dengan teknik adsorpsi dapat dilakukan menggunakan zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi. Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada enzim yang diamobilisasi CaCO₃ 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 lipase teramobil pada CaCO₃ ialah pH 8 temperatur 35 °C, lipase teramobil zeolit ialah pH 8 temperatur 30 °C, lipase teramobil tulang sapi ialah pada pH 7 temperatur 30 °C, dan lipase

teramobil silika gel ialah pH 8 temperatur 30 °C. Seluruh lipase teramobil lebih stabil dibandingkan enzim bebas sejak penyimpanan pada minggu pertama. Waktu optimum produksi DAG dengan lipase teramobil pada CaCO₃ ialah selama 18 jam menghasilkan kadar DAG sebesar 34,49% dan MAG 29,22% dari substratnya.

[Kata kunci: gliserolisis enzimatik, lipase, DAG, MAG, amobilisasi enzim]

Pendahuluan

Indonesia merupakan penghasil minyak sawit mentah (crude palm oil/CPO) terbesar di dunia. Berdasarkan data dari Gabungan Pengusaha Kelapa Sawit Indonesia (GAPKI), produksi CPO tahun 2017 mencapai 38,17 juta ton dan diprediksi akan meningkat pada tahun 2018 (Sitanggung, 2018). 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 (Lo *et al.*, 2008). DAG bersama-sama dengan MAG juga dapat digunakan sebagai bahan pengemulsi pangan, produk farmasi, nutrifikan, ataupun nutrasetikal. Menurut Cheong & Lai (2009); Eom *et al.* (2010) 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 MAG dapat digunakan sebagai surfaktan (Feltes *et al.*, 2013).

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, atau berkisar 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 (Jamulus *et al.*, 2016; Treichel *et al.*, 2010). Selain itu gliserolisis secara kimiawi

membutuhkan energi dan biaya produksi yang tinggi.

Proses gliserolisis menggunakan enzim lipase sebagai biokatalis memerlukan 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 (Zhong *et al.*, 2013). Keunggulan lain penggunaan lipase dalam industri makanan adalah reaksi hidrolisis yang dikatalisis bersifat spesifik.

Modifikasi CPO oleh enzim lipase yang memiliki spesifisitas 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.

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 enzimatis akan lebih praktis (Garcia *et al.* 2011) dan dapat dilakukan lebih mudah dan murah dibandingkan dengan penggunaan enzim bebas. Amobilisasi enzim telah berhasil dilakukan untuk enzim desaturase dan enzim lipase (Ren *et al.*, 2011; Suharyanto *et al.*, 2011; Tri-Panji *et al.*, 2014). Namun, aktivitas dan stabilitas lipase masih perlu ditingkatkan. Penggunaan enzim amobil juga memungkinkan proses biokonversi dilakukan secara kontinu. 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. Teknologi amobilisasi ini diharapkan juga dapat diterapkan untuk amobilisasi enzim lain seperti protease, amilase, pektinase yang dibutuhkan dalam pengembangan agroindustri berbasis CPO dan produk primer lainnya di Indonesia.

Bahan dan Metode

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

Fungi penghasil lipase diisolasi dari tempe menggunakan media PDA. Selanjutnya isolat disubkultur 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 5 buah Erlenmeyer @ 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 menggunakan kertas saring yang telah diketahui bobotnya. Biomassa sel dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C hingga bobotnya konstan dan dihitung biomassa sel keringnya, sedangkan filtrat diambil untuk dilakukan proses pengendapan dan isolasi enzim.

Produksi dan analisis spesifisitas lipase

Isolat fungi ditumbuhkan pada 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 lipasenyanya. Fermentat lipase dipisahkan dari biomassa sel melalui penyaringan dengan vakum dan aktivitas lipase dihitung dengan titrasi. 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 lipasenyanya. Lipase juga dapat diisolasi dengan pengendapan menggunakan aseton dingin. Pemurnian lipase dilakukan dengan metode dialisis dan kromatografi kolom silika gel.

Analisis aktivitas enzim lipase

Aktivitas lipase ditentukan menurut metode Palilingan *et al.* (2013), berdasarkan peningkatan kadar asam lemak bebas (ALB) dalam sampel.

Sebanyak 3 g CPO dan 1 g polivinil alkohol dilarutkan 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. Kadar asam lemak bebas dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

Kadar asam lemak bebas =

$$\frac{V_{NaOH} (mL) \times [NaOH] (M)}{bobot\ sampel}$$

Sedangkan aktivitas lipase dihitung dengan persamaan berikut:

Aktivitas enzim lipase =

$$\frac{kadar\ asam\ lemak\ bebas\ (sampel\ blanko)}{waktu\ inkubasi\ (menit)} = \frac{V_{NaOH} (mL) \times [NaOH] (M) (sampel - blanko)}{bobot\ sampel (g) \times waktu\ inkubasi (menit)}$$

Keterangan :

V : Volume

M : Molaritas

Amobilisasi lipase pada padatan pendukung

Lipase yang telah dimurnikan diamobilisasi dalam padatan pendukung. Empat jenis padatan pendukung yang digunakan adalah zeolit, serbuk tulang sapi, silica gel dan CaCO₃. Amobilisasi Lipase dengan zeolit dilakukan dengan metode yang digambarkan oleh Agaian *et al.*, (2017) sebagai berikut. Butiran zeolit alam asal Bayah, Banten, berukuran 3-5 mm sebelum digunakan sebagai padatan pendukung dicuci dengan air sampai air cucian jernih (tidak keruh). Zeolit kemudian direndam dalam larutan NaCl 1 M selama 12 jam dengan dua kali penggantian larutan perendam sambil digoyang perlahan. Butiran zeolit kemudian diaktivasi dengan memanaskan 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.

Amobilisasi menggunakan serbuk tulang sapi dilakukan dengan cara sebagai berikut: 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. Amobilisasi dengan silika gel dan CaCO₃ dilakukan masing-masing menurut Kawakami *et al.* (2011) dan Sawangpanya *et al.* (2010).

Pengaruh pH, suhu, dan waktu penyimpanan terhadap stabilitas lipase amobil

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.

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 (Tri-Panji *et al.*, 2014) dan b) 0,8 g gliserol, 20 mL heksana, 50 mL buffer tris-HCl dan 3 g CPO (Suharyanto *et al.*, 2011). Kemudian campuran diinkubasi pada suhu kamar, pH 7, dengan variasi waktu hingga 18 jam. Sampel hasil gliserolisis diambil setiap 6 jam, untuk dianalisis komposisinya.

Analisis komposisi produk gliserolisis

Fraksi masa komponen TAG, DAG, MAG, dan ALB 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 G60 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, ALB, dan MAG) dalam campuran.

Hasil dan Pembahasan

Produksi dan uji spesifitas enzim lipase Rhizopus oryzae

Lipase yang diisolasi dari filtrat kultur *R. oryzae* memiliki spesifitas tinggi terhadap trigliserida/TriAsil Gliserol (TAG), terlihat dari data perbandingan luas area TAG, DAG, MAG, dan ALB (Tabel 2). Suatu lipase akan bersifat spesifik 1,3 jika nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari ALB/TAG (Valério *et al.*, 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio

DAG/TAG = 0,23, jauh lebih besar dibandingkan rasio ALB/TAG yang bernilai 0,04 (Tabel 1). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa waktu optimum produksi DAG ialah selama 15 jam.

Amobilisasi lipase Rhizopus oryzae pada padatan pendukung

Empat bahan pendukung yang diuji untuk amobilisasi lipase *R. oryzae* ialah zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi. Persentase protein enzim yang diserap pada setiap bahan pendukung dihitung dengan basis jumlah atau konsentrasi protein yang terkandung dalam larutan enzim bebas adalah mula-mula =100%.

% Protein (enzim) teramobilisasi =

$$\frac{[Protein\ awal] - [Protein\ akhir]}{[Protein\ awal]} \times 100\%$$

Nilai konsentrasi protein dapat diketahui dengan menggunakan data kalibrasi standar protein (gambar tidak ditampilkan), dimana kurva ini memberikan konversi nilai absorbansi menjadi nilai konsentrasi protein (Wulan *et al.*, 2011).

Persentase enzim (protein) yang teramobilisasi yang diperoleh dari selisih konsentrasi enzim sebelum dan setelah amobilisasi terhadap konsentrasi enzim awal, pada masing-masing bahan pendukung secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

Bahan pendukung CaCO₃ menunjukkan kemampuan menyerap protein (enzim) tertinggi, yaitu sebesar 99,46%, dibandingkan tulang sapi (91,56%) dan zeolit (90,69%). Hal ini dapat disebabkan oleh luas permukaan dan daya serap CaCO₃ yang lebih besar dibandingkan tulang sapi dan zeolit. Semakin besar luas permukaan dan daya serap 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.*, 2011).

Tulang sapi merupakan adsorben organik yang sudah dideproteinasi dan didemineralisasi, meninggalkan pori yang dapat diisi oleh zat lain. Dengan pori yang besar dan luas permukaan yang besar, tulang sapi dapat menyerap lipase dengan baik (Kharrat *et al.*, 2011). 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).

Silika gel menunjukkan aktivitas terendah dalam menyerap lipase, yaitu sebesar 59,63%. Silika adalah material Si yang *porous* dan *amorphous*. Silika gel merupakan partikel adsorben alamiah, dimana zat ini akan menyerap

Tabel 1. Komposisi hasil gliserolisis CPO dengan menggunakan enzim lipase bebas

Table 1. The composition of glycerolysis result of CPO by using free lipase enzyme

Waktu (jam) Time (hour)	Persentase area (%) Percentage of area (%)				Perbandingan persentase area Comparison of area percentage	
	ALB FFA	MAG MAG	DAG DAG	TAG TAG	DAG/TAG DAG/TAG	ALB/TAG FFA/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 Average				0,23	0,04

*) Titik optimum (*Optimum point*)

Tabel 2. Konsentrasi protein yang teramobil

Table 2. Concentration of immobilized protein

Bahan pendukung Supporting material	Persentase enzim teramobilisasi dalam bahan pendukung (%) Percentage of immobilized enzyme in supporting material (%)
Zeolit (Zeolite)	90,69
CaCO ₃	99,46
Silica gel	59,63
Tulang sapi (Cow bone)	91,56

air dengan batas tertentu. Kemampuan adsorpsi permukaan dan intra molekul silika gel sudah terbukti luas. Namun, silika gel yang berbentuk padat memiliki kekuatan tarik antar partikel yang rendah sehingga menyebabkan daya adsorpsi silika gel rendah (Wulan *et al.*, 2011). Selain itu, permukaan silika gel tidak bersifat inert dengan lipase (Yanget *et al.*, 2010).

Pengaruh pH terhadap kestabilan lipase teramobil

Lingkungan dimana enzim akan mengkatalisis 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 (Kharrat *et al.*, 2011).

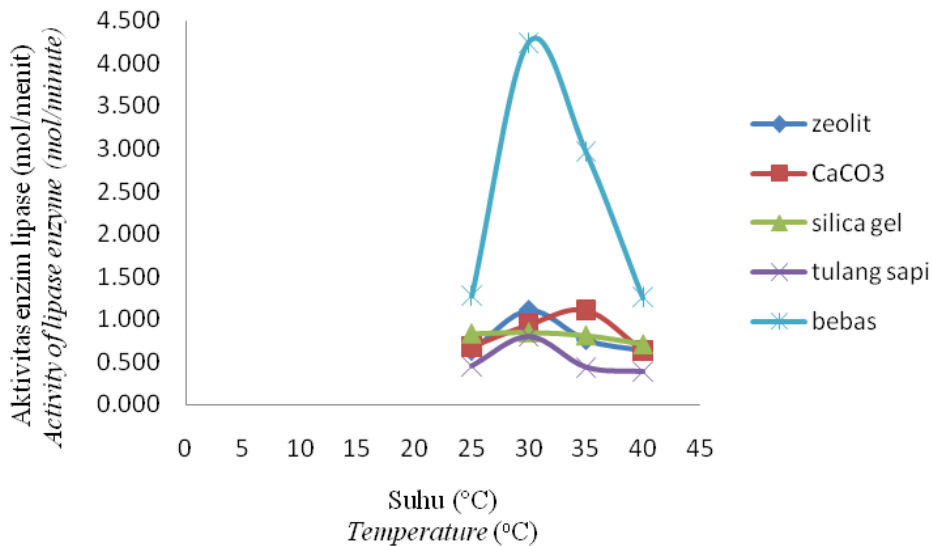
Penurunan pH menjadi kondisi asam menyebabkan penurunan aktivitas, begitu juga kenaikan pH menjadi basa dapat menyebabkan struktur enzim menjadi rusak. Kondisi pH yang terlalu rendah mengakibatkan ion H⁺ akan berikatan dengan -NH₂ pada struktur asam amino protein membentuk -NH₃⁺. Proses pengikatan tersebut 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 H₂O. Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Rodrigues *et al.*, 2013).

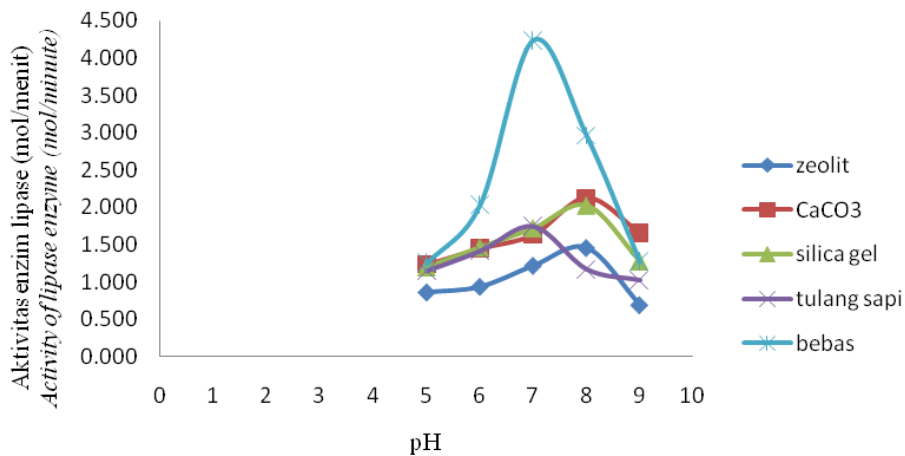
Pada Gambar 1 terlihat bahwa pH optimum lipase bebas sama seperti pH optimum lipase teramobil pada tulang sapi yaitu pada pH 7. Namun pH optimum untuk lipase yang teramobil pada zeolit, CaCO₃, dan silika gel diperoleh pada pH 8. Hal ini menunjukkan matriks bersifat polianion. Pendistribusian ion hidroksida yang berbeda antara yang dekat dengan permukaan dan yang di dalam matriks, dimana muatan positif dekat dengan sisi pengikatan enzim, mengakibatkan enzim yang teramobil pada zeolit, CaCO₃, dan silika gel memiliki pH optimum yang lebih tinggi dibandingkan pH optimum pada lipase bebas (Tran *et al.*, 2011).

Pengaruh suhu terhadap kestabilan lipase teramobil

Seperti halnya perubahan kondisi pH, aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh temperatur (Gambar 2). Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan temperatur sampai pada batas



Gambar 1. Pengaruh pH pada aktivitas lipase amobil
 Figure 1. The effect of pH on the activity of immobilized lipase



Gambar 2. Pengaruh temperatur pada aktivitas lipase amobil
 Figure 2. The effect of temperature on the activity of immobilized lipase

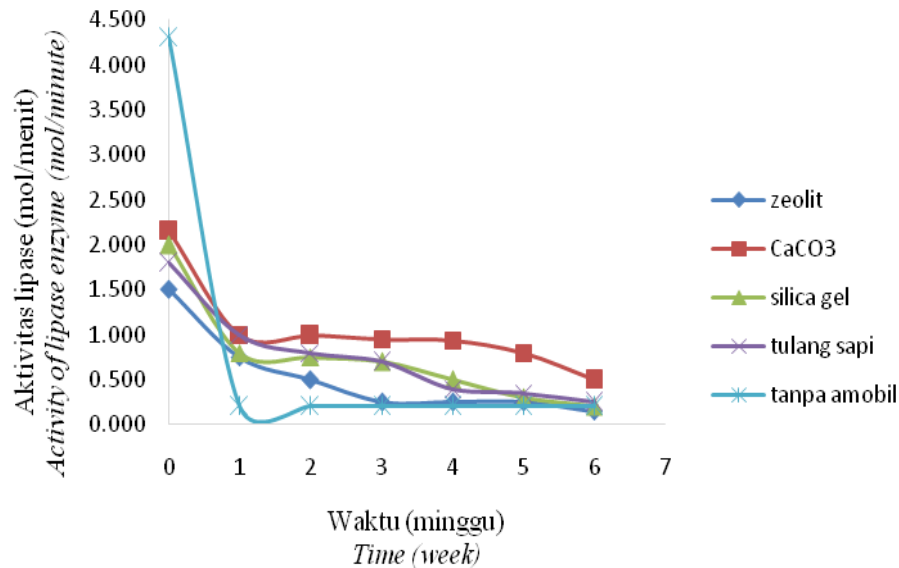
optimalnya, kemudian aktivitas akan menurun setelah melewati kondisi tersebut karena enzim akan mengalami denaturasi. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzim kurang baik (Nelson, 2008).

Pada Gambar 2 terlihat bahwa temperatur optimum lipase bebas sama seperti temperatur optimum lipase teramobil pada zeolit, silika gel, dan tulang sapi yaitu sebesar 30°C. Namun terjadi peningkatan temperatur optimum pada lipase teramobil pada CaCO₃ yaitu sebesar 35°C. Amobilisasi lipase *R. oryzae* pada CaCO₃ dapat mengakibatkan meningkatnya termostabilitas enzim dan memperluas potensi bioteknologi, karena bioproses yang berjalan pada suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan tingkat difusi, menurunkan viskositas substrat, dan meningkatkan kelarutan reaktan (Ghattas et al., 2014). Hal

ini mungkin merupakan hal yang diinginkan, karena suhu operasional yang lebih tinggi akan memperkecil resiko kontaminasi oleh beberapa jenis mikroba yang hanya bekerja optimal pada suhu di bawah suhu kamar.

Kestabilan lipase *R. oryzae* amobil selama penyimpanan

Penyimpanan lipase amobil dalam jangka waktu dan 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 kestabilan lipase bebas dan lipase teramobil dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh waktu penyimpanan pada suhu 4°C terhadap aktivitas lipase amobil
 Figure 3. Effect of storage at 4°C on the activity of immobilized lipase

Lipase teramobil lebih stabil dibandingkan enzim bebas dikarenakan dukungan matriks yang mencegah proses yang terjadi antarmolekul seperti proteolisis dan agregasi, oleh karena itu menciptakan molekul enzim yang lebih kaku (Yesiloglu & Sit, 2011). Lipase teramobil pada CaCO₃ memiliki stabilitas yang paling tinggi dibandingkan lipase teramobil pada media lain yang diuji. Lipase teramobil pada CaCO₃ masih menunjukkan aktivitasnya pada penyimpanan selama 5 minggu dan menurun pada minggu ke-6.

Optimasi aktivitas gliserolisis dengan lipase teramobil pada CaCO₃

Lipase yang teramobil pada media terbaik, yaitu pada padatan CaCO₃, memiliki aktivitas gliserolisis optimum untuk produksi DAG dan MAG pada waktu inkubasi yang sama, yaitu 18 jam. Pada kondisi ini, kadar DAG yang diperoleh sebesar 34,49% dan MAG sebesar 29,22% (Tabel 3). Kadar ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kadar DAG dan MAG yang dihasilkan oleh lipase bebas, yaitu masing-masing sebesar 18,41% dan 13,00% (Tabel 1). Dengan demikian, amobilisasi lipase menghasilkan beberapa keuntungan, yaitu enzim lebih stabil, dapat digunakan kembali untuk proses berulang, dan aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan enzim bebas. Terlihat pada Tabel 3 bahwa data komposisi hasil gliserolisis berupa rata-rata persentase rasio DAG/TAG jauh lebih besar dibandingkan rata-rata rasio ALB/TAG. Hal ini

menunjukkan bahwa lipase amobil juga bersifat spesifik 1,3 gliserida.

Produksi MAG dan DAG melalui gliserolisis menggunakan lipase amobil (Tabel 3) jauh lebih tinggi dibandingkan dengan produksi MAG dan DAG menggunakan lipase bebas (Tabel 1). Waktu optimum untuk produksi DAG dan MAG menggunakan lipase bebas berbeda dibandingkan dengan yang menggunakan lipase amobil. Produksi MAG optimum menggunakan lipase bebas sebesar 13,00% diperoleh pada waktu gliserolisis selama 24 jam, sedangkan produksi DAG optimum sebesar 18,41% diperoleh pada waktu gliserolisis selama 15 jam (Tabel 1).

Produksi DAG dan MAG optimum dengan gliserolisis menggunakan lipase teramobilisasi pada CaCO₃ dicapai pada waktu kontak yang sama, yaitu 18 jam (Tabel 3). Dengan demikian metode produksi DAG dengan lipase amobil ini sekaligus sesuai untuk produksi MAG. Produksi DAG pada kondisi ini mencapai angka sebesar 34,49 %, jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang dihasilkan menggunakan lipase bebas sebesar 18,41%. Sedangkan MAG yang diperoleh pada waktu optimum tersebut mencapai 29,22%, juga jauh lebih tinggi dibandingkan yang dihasilkan melalui gliserolisis dengan lipase bebas sebesar 13%. Kandungan TAG berkebalikan dengan kandungan DAG dan MAG, karena kandungan TAG tersebut merupakan sisa TAG yang tidak/ belum terkonversi menjadi DAG dan MAG.

Tabel 3. Komposisi campuran hasil gliserolisis CPO menggunakan enzim lipase amobil

Table 3. The composition mixture resulted from CPO glycerolysis with immobilized lipase enzyme

Waktu (jam) Time (hours)	Persentase area (%) Percentage of area (%)			Perbandingan persentase area Comparison of area percentage		
	ALB FFA	MAG MAG	DAG DAG	TAG TAG	DAG/TAG DAG/TAG	ALB/TAG FFA/TAG
0	2,30	0	0	97,69	0	0,02
3	0,95	2,85	1,54	94,64	0,02	0,01
6	1,36	9,76	2,76	86,09	0,03	0,02
9	1,66	7,37	3,82	87,11	0,04	0,02
12	1,39	5,18	5,15	88,26	0,06	0,02
15	1,97	8,99	30,58	58,31	0,52	0,03
18	2,24	29,22*)	34,49*)	33,88	1,02	0,07
21	5,61	11,40	32,08	50,78	0,63	0,11
24	12,71	24,75	8,26	54,12	0,15	0,23
27	1,87	14,77	3,34	79,94	0,04	0,02
	Rata-rata (Average)				0,25	0,05

*) Titik optimum produksi MAG dan DAG (Optimum point of production of DAG and MAG)

Kesimpulan

Lipase *R. oryzae* bersifat spesifik 1,3-gliserida. Amobilisasi enzim lipase *R. oryzae* dengan teknik adsorpsi dapat dilakukan menggunakan zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi. Adsorpsi enzim lipase tertinggi terjadi pada CaCO₃ yaitu sebesar 99,46%, disusul kemudian dengan 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 CaCO₃ 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 dan MAG dengan lipase teramobil pada CaCO₃ ialah selama 18 jam, menghasilkan kadar DAG sebesar 34,49% dan MAG 34,49% .

Daftar Pustaka

Agaian G, Ridhawati MM, Chumaidi A & Hendrawati N (2017). Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Lipase Terimobilisasi Zeolit pada Pembuatan Perisa Alami. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan* 5(2), 84-91.

Cheong LZ & Lai OM (2009). Diacylglycerol oil: Healthful or hype?. *Inform (champaign)* 20(6), 391-393.

Datta S, Christena LR & Rajaram YRS (2013). Enzyme immobilization: an overview on

techniques and support materials. *Journal Biotech* 3,1-9.

Eom TK, Kong CS, Byun HG, Jung WK & Kim SK (2010). Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice. *Process Biochemistry*, 45(5), 738-743.

Feltes MMC, de Oliveira D, Block JM & Ninow JL (2013). The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest. *Food and Bioprocess Technology* 6(1), 17-35.

Garcia- Galan C, Berenguer- Murcia Á, Fernandez- Lafuente R & Rodrigues RC (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 353(16), 2885-2904.

Ghattas N, Abidi F, Galai S, Marzouki MN & Salah AB (2014). Monoolein production by triglycerides hydrolysis using immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. *International journal of biological macromolecules* 68, 1-6.

Jamlus NNA, Salimon J & Derawi D (2016). Enzymatic glycerolysis of methyl laurate utilizing *Candida antarctica* Lipase b. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 20(6), 1365-1372.

Kawakami, Koei, Yasuhiro Oda, & Ryo Takahashi (2011). "Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude *Jatropha* oil." *Biotechnology for biofuels* 4 (1)42.

- Kharrat N, Ali YB, Marzouk S, Gargouri YT & Karra-Châabouni M (2011). Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry* 46(5), 1083-1089.
- Lo SK, Tan CP, Long K, Yusoff MSA & Lai OM (2008). Diacylglycerol oil—properties, processes and products: a review. *Food and Bioprocess Technology* 1(3), 223.
- Nelson DL, Cox MM (2008). *Lehninger: Principles of Biochemistry 5th Edition*. New York: WH Freeman and Company.
- Palilingan SC (2013). Optimasi produksi enzimatis diasilgliserol dari CPO dengan sistem kontinu. [Tesis]. Bogor (ID) : Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.2013.
- Ren Y, Rivera JG, He L, Kulkarni H, Lee DK & Messersmith P B (2011). Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC biotechnology*, 11(1), 63.
- Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R & Fernández-Lafuente R (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290-6307.
- 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.
- Sitanggang Togar (2018). Refleksi Industri Kelapa Sawit 2017 dan Prospek 2018. <https://gapki.id/news/4140/refleksi-industri-kelapa-sawit-2017-dan-prospek-2018>. Diakses pada 19 Oktober 2018.
- 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.
- Tran D N, & Balkus Jr KJ (2011). Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *Acs Catalysis* 1(8), 956-968.
- Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M & Oliveira JV (2010). A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology* 3(2), 182-196.
- Tri-Panji, Palilingan SC & Artika IM (2014). Optimasi produksi enzimatis diasilgliserol melalui gliserolisis kontinu. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 25(1), 16.
- 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.
- Valério A, Rovani S, Treichel H, de Oliveira D & Oliveira JV (2010). Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. *Bioprocess and biosystems engineering* 33(7), 805-812.
- Wulan PP, Rejoso MT & Hermansyah H (2011). Reaksi hidrolisis minyak zaitun menggunakan lipase *Rhizopus oryzae* yang di imobilisasi melalui metode adsorpsi. *Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia, Depok, Laporan Penelitian*.
- Yang G, Wu J, Xu G & Yang L (2010). Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78(2), 351-356.
- Yesiloglu Y & Sit L (2011). Biochemical properties of free and immobilized *Candida rugosa* lipase onto Al₂O₃: a comparative study. *Artificial cells, blood substitutes and biotechnology* 39,247-251.
- 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* 140(6), 1122-1126.
- Zhong N, Li L, Xu X, Cheong LZ, Xu Z & Li B (2013). High yield of monoacylglycerols production through low-temperature chemical and enzymatic glycerolysis. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115(6), 684-690.
- 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.