

Pemurnian diasilgliserol dari produk gliserolisis minyak sawit mentah dengan kromatografi kolom

Purification of diacylglycerol from glycerolysis products of crude palm oil using column chromatography

TRI-PANJI*) SUHARYANTO & Urip PERWITASARI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16151, Indonesia

Diterima tgl 17 Desember 2010/Disetujui 9 Maret 2011

Abstract

*Vegetable oil enriched with diacylglycerol (DAG) is known as healthy oil. This oil is much more expensive than cooking oil. Production of DAG could be performed by glycerolysis process of CPO using specific lipase of 1,3-glyceride from *Rhizopus oryzae* mold. Product derived from glycerolysis process of CPO is a mixture of DAG, monoacylglycerol (MAG), free fatty acid (FFA) and residual of unglycerolysed triacylglycerol (TAG). Therefore the DAG product has to be isolated from other components in order to get high purity of DAG. The objective of the research was to purify and to find out optimal concentration of DAG derived from a mixture product of CPO glycerolysis at laboratory scale experiment (total reactant for glycerolysis was 93.8 mL) and semipilot scale experiment (10 times of laboratory scale) using column chromatography with silica gel as stationary phase. The research showed that the highest DAG content could be collected at fraction of 26th i.e 65%, while at semipilot scale experiment the highest content of DAG (97%) was achieved at 64 to 66th fraction. Reglycerolysis of residual CPO only yielded 8.24% glycerolysis product which was much lower than that of the first glycerolysis reaching 46.67%. The highest DAG derived from the second reglycerolysis product was achieved at 24th fraction reaching 35.71 %.*

[Keywords: *Vegetable oil, lipase enzyme 1,3-glyceride, CPO, diacylglycerol.*]

Abstrak

Minyak nabati kaya kandungan diasilgliserol (DAG) dikenal sebagai minyak sehat (*healthy oil*). Minyak ini jauh lebih mahal dari minyak makan biasa. Produksi DAG dapat dilakukan dengan proses gliserolisis CPO menggunakan enzim lipase spesifik 1,3-gliserida dari kapang *Rhizopus oryzae*. Produk gliserolisis CPO triasilgliserol adalah campuran DAG, monoasilgliserol (MAG) dan asam lemak bebas (ALB) serta residu triasilgliserol (TAG) yang tidak tergliserolisis. Oleh karena itu DAG yang terbentuk harus dipisahkan dari komponen lainnya agar diperoleh fraksi DAG dengan kemurnian tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan dan menetapkan konsentrasi DAG yang dapat diperoleh dari gliserolisis CPO skala lab (total reaktan 93,8 mL) dan skala semipilot (10 kali skala laboratorium) dengan kromatografi kolom menggunakan fase padat silika gel. Residu TAG dari gliserolisis pertama digunakan untuk gliserolisis kedua atau gliserolisis ulang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi DAG dengan konsentrasi

tertinggi diperoleh pada fraksi ke-26 yaitu sebesar 65%, sedangkan pada percobaan dengan skala semipilot (10 kali skala laboratorium) diketahui bahwa konsentrasi DAG tertinggi (97%) diperoleh pada fraksi ke-64 sampai dengan ke-66. Gliserolisis kedua dari residu CPO hanya mampu menghidrolisis TAG menjadi campuran DAG, MAG dan ALB sekitar 8,24%, lebih kecil dari reaksi gliserolisis pertama yaitu sebesar 46,67%. DAG tertinggi yang berhasil dikumpulkan dari produk gliserolisis kedua adalah pada fraksi ke-24 yaitu sebesar 35,71%.

[Kata kunci: Minyak nabati, enzim lipase 1,3-gliserida, CPO diasilgliserol]

Pendahuluan

Salah satu produk olahan CPO yang mempunyai nilai ekonomi tinggi adalah diasilgliserol (DAG). Diasilgliserol dikenal sebagai minyak sehat (*healthy oil*) karena dapat mengurangi trigliserida (TG) dalam serum darah, mencegah akumulasi lemak dalam tubuh, dan memperbaiki rasio kolesterol serum darah (Yasunaga *et al.*, 2001). Reyes *et al.* (2008) melaporkan bahwa konsumsi minyak yang diperkaya dengan DAG selama lima minggu tidak meningkatkan kandungan plasma TG sehingga dapat mengurangi risiko serangan jantung. Harga minyak sehat dapat mencapai 5-7 kali dari harga minyak goreng biasa. Campuran DAG dan monoasilgliserol (MAG) juga merupakan surfaktan non-ionik untuk bahan pengemulsi dan penstabil pada produk-produk pangan dan kosmetika (Hasanuddin *et al.*, 2003).

Diasilgliserol dapat diproduksi dengan cara gliserolisis CPO menggunakan enzim lipase spesifik 1,3-gliserida. Kandungan DAG dalam CPO dapat ditingkatkan dari sekitar 4-5% menjadi 29% setelah proses gliserolisis (Tri-Panji *et al.*, 2008). Hidrolisis CPO menghasilkan beberapa produk seperti DAG, MAG, asam lemak bebas (ALB), dan karoten yang dapat dipisahkan dan dimurnikan dari minyak. Produk tersebut digunakan untuk memperkaya minyak goreng menjadi minyak sehat, sebagai contoh minyak kedelai yang diperkaya DAG (Yong *et al.*, 2009). Pemurnian merupakan proses hilir yang sangat menentukan dalam pengembangan industri pengolahan. Dalam proses gliserolisis CPO, proses pemurnian dilakukan untuk

*) Penulis korespondensi: tri_panji@yahoo.com

pemisahan fraksi-fraksi minyak. Pemisahan fraksi-fraksi minyak dapat dilakukan dengan ekstraksi (Irimescu *et al.*, 2002), kromatografi kolom (Mappiratu, 1999), kristalisasi (Chen & Ju, 2001), dan pendinginan (*winterisasi*) bertahap (Watanabe *et al.*, 2006) serta destilasi molekular (*molecular distillation*) (Compton *et al.*, 2008). Pada penelitian ini pemisahan DAG dilakukan menggunakan cara kromatografi kolom dengan fase padat atau fase stasioner dari silika gel. Alumina dan silika gel merupakan dua adsorben yang sering dipakai dalam kromatografi kolom karena memiliki permukaan partikel yang luas. Silika gel mempunyai luas permukaan sekitar 500 m²/g dan sesuai untuk pemisahan senyawa-senyawa organik yang peka oleh aktivitas katalitik (Adnan, 1997). Penelitian bertujuan menetapkan konsentrasi DAG optimum yang dapat diperoleh dari produk gliserolisis CPO skala laboratorium dan skala semipilot dengan pemisahan menggunakan kromatografi kolom.

Bahan dan Metode

Bahan

Contoh minyak untuk produksi DAG adalah CPO segar berasal dari pabrik kelapa sawit (PKS) Kertajaya, PTPN VIII, Banten. *Rhizopus oryzae* TP2 untuk produksi lipase adalah isolat koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) yang dipelihara pada PDA miring dan diremajakan setiap tiga minggu.

Penyiapan lipase

Biakan kapang *Rhizopus oryzae* TP2 dalam *potato dextrose agar* (PDA) miring umur 3-4 hari ditambahkan akuades 3 mL kemudian spora dikerik dan divorteks hingga diperoleh suspensi spora. Suspensi spora diinokulasikan dalam 200 mL medium cair PDB yang mengandung CPO 2 % dan diinkubasi pada suhu ruang (27-30°C) selama lima hari sambil dikocok dengan kecepatan 75 rpm. Setelah lima hari, miselium dan spora dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring kasar dan filtrat diambil sebagai ekstrak kasar lipase. Filtrat dikeringbekukan (*freeze dried*) untuk mempertahankan kestabilan lipase. Sebanyak 7 g serbuk ekstrak enzim kasar diperoleh dari 500 mL filtrat yang dikeringbekukan. Serbuk lipase disimpan dalam *freezer* untuk produksi DAG.

Produksi DAG

Produksi DAG dilakukan dalam medium gliserolisis pada suhu 37°C, dengan substrat CPO 3 g, gliserol 0,8 g, pelarut heksana 40 mL, bufer Tris-HCl pH 7.0 50 mL dan ekstrak kasar lipase 10 µL serta waktu inkubasi selama 18 jam. Ekstrak kasar lipase disiapkan dengan melarutkan serbuk enzim hasil pengeringan beku (0,05 g) ke dalam 1 mL bufer Tris-HCl pH 7 (Tri-

Panji *et al.*, 2009). Reaktan disaring dengan kain halus dan filtrat dipanaskan dalam oven suhu 60°C untuk menguapkan pelarut heksan. Filtrat hasil gliserolisis mengandung campuran komponen DAG, MAG, ALB dan residu TAG. Produksi DAG skala semipilot dilakukan dengan kondisi reaksi yang sama dengan total reaktan 10 kali skala laboratorium yang dilakukan pada bejana kapasitas 2 L. Residu komponen TAG dari pemisahan DAG pertama digunakan kembali untuk proses gliserolisis kedua.

Pemisahan DAG

Pemisahan DAG dilakukan dengan kolom kromatografi menggunakan cara Watanabe *et al.* (2006) dengan silika gel sebagai fasa diam dan larutan heksana : etilasetat (80:20) sebagai fasa gerak. Kolom berdimensi (panjang 30 cm x diameter 2,5 cm) diisi dengan *glass wool* setinggi 1 cm dan silika gel. Silika gel (7 g) terlebih dahulu dibuat bubuk dengan cara melarutkannya dalam larutan heksana: etilasetat (80:20) kemudian bubuk silika dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan dan dibiarkan pada suhu ruang hingga memadat. Sampel hasil gliserolisis (20 mL) dimasukkan ke dalam kolom lalu dielusikan dengan campuran heksana:etil asetat (80:20). Setiap fraksi dikumpulkan sebanyak 1 mL. Fraksinasi dihentikan bila hasil fraksinasi sudah terlihat jernih. Komposisi hasil gliserolisis tiap-tiap fraksi dianalisis menggunakan metode KLT.

Pemurnian DAG skala semipilot

Diasilgliserol produksi skala semipilot diisolasi dengan kromatografi kolom dengan eluen heksana:etil asetat (80:20). Jumlah silika gel sebagai fasa diam pada kromatografi kolom yang digunakan juga diperbesar menjadi 10 kali lipat dari percobaan skala laboratorium. TAG hasil fraksinasi dikumpulkan kemudian pelarutnya diuapkan pada suhu 60°C selama 15 menit. Setelah sampel bebas dari pelarut, TAG yang tersisa ditimbang bobotnya kemudian digliserolisis ulang dan difraksinasi kembali. Setelah proses gliserolisis, lapisan heksana dipisahkan dari lapisan air, kemudian lapisan heksana dipanaskan dalam oven pada suhu 60°C sampai seluruh pelarut menguap sehingga jumlah fraksi yang terkumpul lebih pekat.

Analisis komponen

Fraksi komponen TAG, DAG, MAG, dan ALB dari reaksi gliserolisis dianalisis dengan metode KLT (AOAC, 1995). Lempeng yang digunakan adalah lempeng silika gel G 60. Sebanyak 10 µL contoh ditotolkan sedikit demi sedikit ke dalam lempeng tersebut dan dielusikan dengan campuran petroleum benzene:dietileter:asam asetat glasial (90:10:1). Lempeng KLT 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 KLT yang sudah kering diletakkan di atas cawan Petri selama dua menit hingga terlihat noda cokelat. Noda yang terlihat langsung diberi tanda menggunakan pensil. Noda yang terlihat dari setiap komponen minyak (DAG, MAG, ALB dan TAG) dijiplak menggunakan kertas HVS 80 g lalu ditimbang bobotnya. Fraksi komponen dihitung dengan persamaan:

$$\text{Fraksi komponen } x (\%) = \frac{\text{Berat komponen } x (\text{g})}{\text{Berat komponen total}} \times 100\%$$

Hasil dan Pembahasan

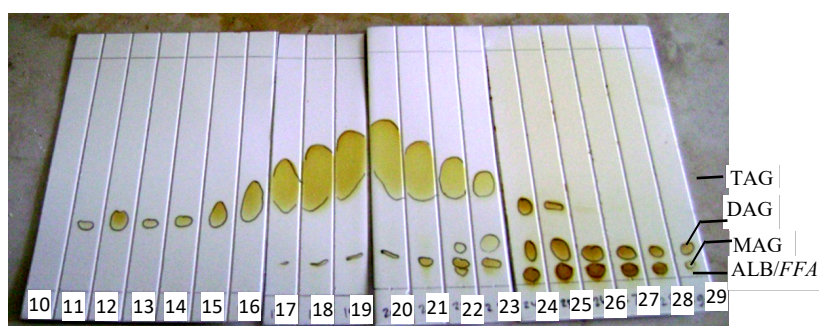
Isolasi DAG skala laboratorium

Setiap fraksi minyak terpisah dengan baik menggunakan kromatografi kolom seperti yang ditunjukkan pada spot KLT (Gambar 1). TAG baru muncul pada fraksi ke-11, sedangkan fraksi yang muncul sebelumnya adalah pelarut yang sifatnya non-

polar. Pada fraksi ke-26, TAG tidak muncul lagi karena sudah terelusikan secara sempurna sehingga yang berada di dalam kolom merupakan senyawa yang lebih polar dibandingkan TAG. DAG yang sifatnya lebih polar dibandingkan TAG tertahan pada fasa diam dan baru muncul pada fraksi ke-22. Hasil perhitungan persentase DAG tertinggi terletak pada fraksi ke-26 yaitu sebesar 65% (Gambar 2). Pada fraksi yang sama persentase MAG dalam jumlah minimal yaitu sebesar 34%. Teknik kolom kromatografi adalah berdasarkan pada kelarutan suatu bahan. TAG yang bersifat non-polar terelusi lebih dahulu karena kesamaan sifat dengan pelarut yang digunakan. Pelarut yang didominasi oleh heksana menyebabkan TAG cenderung terikat pada pelarut yang bersifat nonpolar dibandingkan pada fasa diam yaitu silika yang bersifat polar.

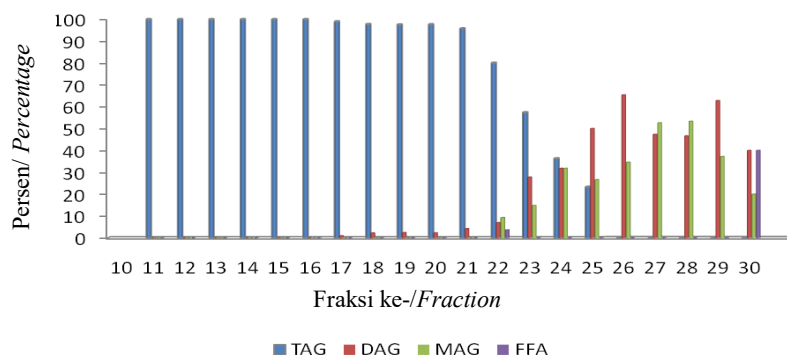
Isolasi DAG skala semipilot

Hasil pemisahan pada percobaan dengan skala semipilot menunjukkan bahwa TAG baru muncul pada fraksi ke-15, sedangkan DAG muncul pada fraksi ke-47 (Gambar 3). Hasil ini berbeda dengan yang diperoleh pada percobaan skala laboratorium



Gambar 1. Fraksinasi minyak sawit hasil gliserolisis dengan kromatografi kolom pada skala laboratorium.

Figure 1. Fractionation of oil palm resulted from glycerolysis using column chromatography at laboratory scale experiment.



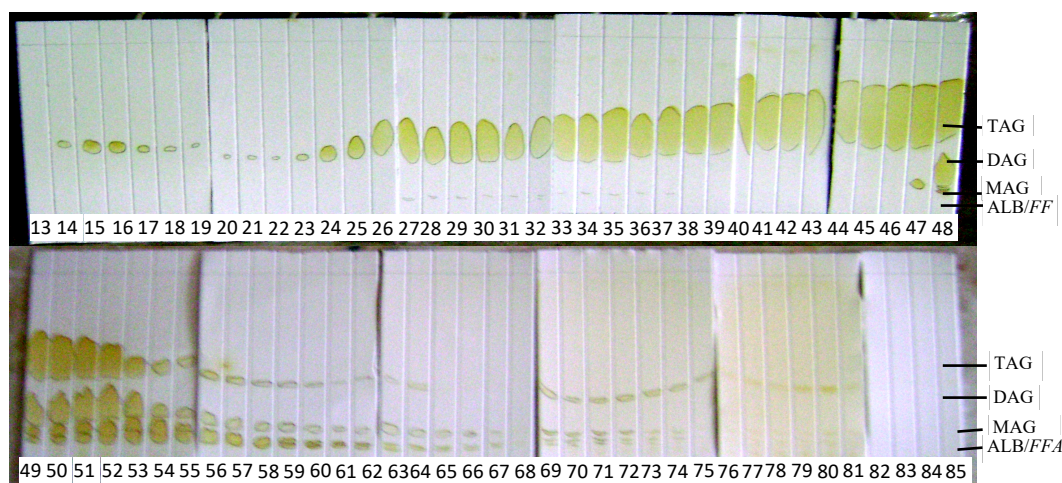
Gambar 2. Hasil pemisahan fraksi DAG dari produk gliserolisis lainnya dengan kromatografi kolom pada percobaan skala laboratorium.

Figure 2. Result of DAG isolation from other glycerolysis product using column chromatography at laboratory scale experiment.

yaitu TAG muncul pada fraksi ke-11 dan DAG pada fraksi ke-22. Lambatnya pemisahan fraksi TAG tersebut kemungkinan disebabkan oleh masih banyaknya eluen yang tersisa dalam kolom pada saat fraksinasi dimulai yang pada gilirannya DAG ikut lambat terelusi. Menurut Craven & Lencki (2010) terjadinya ko-elusi sering menyebabkan hasil fraksinasi kurang murni. Walaupun pemisahan relatif lambat, fraksi DAG yang terpisahkan cukup murni. Fraksi ke-47 sampai dengan fraksi ke-62 menghasilkan DAG dengan kemurnian sekitar 10-60%, sedangkan fraksi ke-63 sampai dengan ke-66 DAG relatif terpisah sempurna yaitu sekitar 97% (Gambar 4). Hasil ini setara dengan yang diperoleh Compton *et al.* (2008) pada pemisahan DAG dari minyak kedelai dan minyak bunga matahari yang dilakukan dengan proses destilasi molekular.

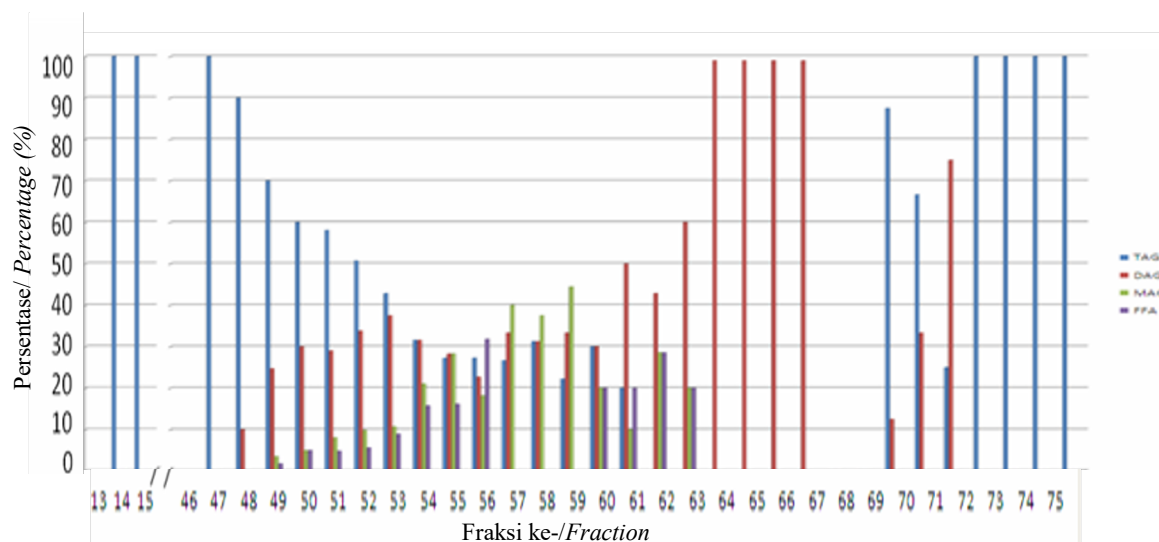
Jumlah TAG menurun mulai fraksi ke-47, kemudian hilang pada fraksi ke-63 namun muncul kembali setelah fraksi ke-69. Munculnya kembali TAG di akhir fraksinasi kemungkinan disebabkan oleh masih aktifnya enzim lipase yang dapat menyebabkan reaksi esterifikasi. Reaksi tersebut terjadi karena setelah proses gliserolisis tidak dilakukan inaktivasi untuk menghentikan aktivitas enzim lipase. Enzim lipase yang masih aktif dalam medium yang bersifat hidrofob akan bekerja dalam lapisan heksana yang mengandung DAG, MAG, dan ALB sehingga memungkinkan terjadinya reaksi esterifikasi (Price & Stevens, 1996).

DAG yang dihasilkan pada gliserolisis skala semipilot ini dapat dimurnikan pada fraksi ke-64 sampai fraksi ke-66 (Gambar 4). Fraksi ke-14 sampai fraksi ke-46 yang berisi TAG dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan serta ditimbang. Bobot TAG yang diperoleh sebesar 14,49 g. Sampel ini kemudian dimasukkan kembali ke dalam medium gliserolisis kedua. Sampel hasil gliserolisis kedua adalah sebanyak 200 mL kemudian dipekatkan menjadi 40 mL. Hasil analisis menggunakan KLT menunjukkan bahwa gliserolisis kedua hanya mampu menghidrolisis CPO menjadi campuran DAG, MAG dan ALB sekitar 8,24%. Nilai ini lebih kecil jika dibandingkan dengan reaksi gliserolisis pertama yang dapat menghidrolisis CPO menjadi campuran DAG, MAG dan ALB sebesar 46,67% (Tabel 1). DAG tertinggi yang berhasil dikumpulkan dari reaksi gliserolisis kedua adalah pada fraksi ke-24 yaitu sebesar 35,71% (Gambar 5). Rendahnya hasil gliserolisis kedua mungkin disebabkan masih adanya eluen yang tertinggal pada fraksi yang mengandung TAG sehingga kerja enzim terganggu. Kemungkinan tertinggalnya eluen dapat terjadi karena sampel hasil fraksinasi hanya dipanaskan pada suhu 60°C sehingga masih ada kemungkinan tertinggalnya etil asetat dalam sampel. Reaksi gliserolisis mungkin masih dapat diulang lagi jika residu pelarut setelah fraksinasi dalam kromatografi kolom dapat dihilangkan secara sempurna.



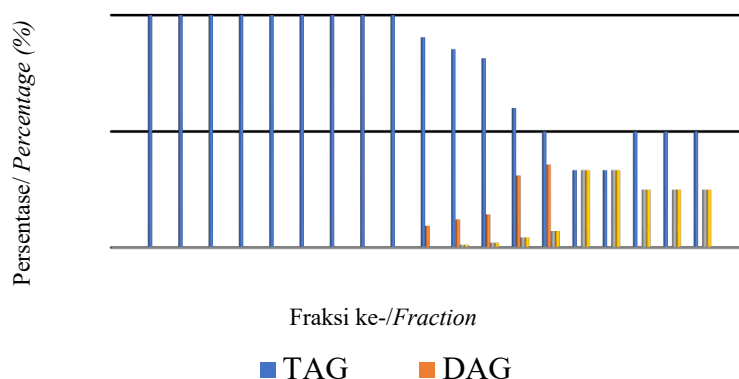
Gambar 3. Spot DAG dan fraksi minyak lainnya hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dari hasil gliserolisis skala semipilot. Spot KLT dari baris paling atas sampai baris terbawah berturut-turut adalah TAG, DAG, MAG, dan FFA.

Figure 3. DAG and other fraction spots resulted from fractionation using column chromatography at semi pilot scale glycerolysis. Spots of TLC at the upper row spots to the lower row spots are TAG, DAG, MAG and FFA, respectively.



Gambar 4. Persentase DAG dan fraksi minyak lainnya hasil pemisahan dengan kromatografi kolom pada percobaan skala semipilot

Figure 4. Percentage of DAG and other oil fraction resulted from separation by column chromatography at semipilot scale experiment



Gambar 5. Persentase DAG hasil gliserolisis ulang terhadap sisa TAG yang kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom.

Figure 5. Percentage of DAG resulted from reglycerolysis at the residual TAG which then fractionated by column chromatography.

Tabel 1. Rekapitulasi hasil gliserolisis CPO pada siklus pertama dan kedua.

Table 1. Recapitulation of glycerolysis yield of CPO at the first and second cyclus.

Gliserolisis ke Glycerolysis stage	Jumlah substrat Amount of substrate (g)	Sisa substrat Residual substrate (g)	Sebelum fraksinasi Before fractionation		Setelah fraksinasi After fractionation	
			TAG (%)	Hasil gliserolisis Glycerolysis yield ¹⁾ (%)	TAG (%)	Hasil gliserolisis Glycerolysis yield ¹⁾ (%)
1	30,00	14,49	53,33	46,67	48,30	28,62
2	14,49	11,92	91,76	8,24	82,25	6,83

1) Hasil gliserolisis adalah total DAG, MAG dan ALB (Glycerolysis yield is the sum of DAG, MAG and FFA)

Kesimpulan

Isolasi DAG dari campuran TAG, DAG, MAG dan ALB hasil gliserolisis CPO secara enzimatik dapat dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel sebagai fase stasioner. Pemisahan DAG skala laboratorium menggunakan kromatografi kolom menghasilkan DAG sebesar 65 % yang diperoleh pada fraksi ke-26. Pada percobaan skala semipilot, DAG relatif murni (97 %) dapat diperoleh pada fraksi ke-64 sampai dengan ke-66. Gliserolisis kedua dari residu CPO menghasilkan campuran DAG, MAG dan ALB sekitar 8,24 %, lebih kecil dibandingkan dengan hasil reaksi gliserolisis pertama yaitu sebesar 46,67 %. DAG tertinggi yang berhasil dikumpulkan dari reaksi gliserolisis kedua adalah pada fraksi ke-24 yaitu sebesar 35,71 %. Penghilangan residu pelarut minyak dari hasil gliserolisis pertama perlu dipelajari agar gliserolisis ulang lebih optimal.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan pendanaan dari DIPA 2009 No. 4025.0/018/09.2/XII/2009 melalui Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Kementerian Pertanian sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

Daftar Pustaka

- Adnan, M (1997). *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan*. Yogyakarta: Andi Offset AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. Washington DC, AOAC Press.
- Chen TC & YH Ju (2001). Polyunsaturated fatty acids concentration from borage oil and linseed oil fatty acids. *JAACS* 78,1030-1036.
- Compton DL, JA Laszlo, F J Eller & SL Taylor (2008). Purification of 1,2-diacylglycerols from vegetable oils: Comparison of molecular distillation and liquid CO₂ extraction. *J Industrial Crops Products* 28, 113–121.
- Craven RJ & RW Lencki (2010). Preparation of diacid 1,3-diacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* 87, 1281–1291.
- Iremescu R, Y Iwasaki & CT Hou (2002). Study of ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structure TAG. *J Am Oil Chem Soc* 79, 879-883.
- Hasanuddin A, Mappiratu & GS Hutomo (2003). Pola perubahan mono dan diasilgliserol dalam reaksi etanolisis minyak sawit mentah. *J Tekn Indust Pangan* 14 (3), 241-247.
- Mappiratu (1999). Penggunaan biokatalis dedak padi dalam biosintesis antimikroba monoasilgliserol dari minyak kelapa [Disertasi]. Bogor, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Price NC & L Stevens (1996). *Fundamentals of Enzymology*. New York, Oxford University Press.
- Reyes G, K Yasunaga, E Rothenstein, W Karmally, R Ramakrishnan, S Holleran & HN Ginsberg (2008). Effects of a 1,3-diacylglycerol oil-enriched diet on postprandial lipemia in people with insulin resistance. *J Lipid Res* 49, 670-678.
- Saberia AH, L Oi-Ming & JT Vázquez (2011). Crystallization kinetics of palm oil in blends with palm-based diacylglycerol. *J Food Res Intl* 44 (1), 425-435.
- Tri-Panji, Suharyanto & N Arini (2008). Lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi lokal untuk biokonversi CPO menjadi diasilgliserol. *Menara Perkebunan* 76 (1), 11-22.
- Tri-Panji, A Budiani, Suharyanto & Irma Kresnawaty (2009). Rekayasa genetika mikroba dan produksi lipase spesifik 1,3- digliserida untuk menghasilkan produk bernilai tinggi >10 kali lipat. *Laporan Akhir Kegiatan Penelitian*. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan.
- Watanabe Y, T Nagao, S Kanatani, T Kobayashi, T Terai & Y Shimada (2006). Purification of mono-acylglycerol with conjugate linoleic acid synthesized through a lipase-catalyzed reaction by solvent winterization. *J Oleo Sci* 55 (10), 537-543.
- Yasunaga K, Y Katsuragi & T Yasukawa (2001). Nutritional characteristics of diacylglycerol. In: *Proc. Internat Palm Oil Congress. Food Technology & Nutrition Conf*, 20-22 August 2001. p, 149-155.
- Yong W, M Zhao, OU Shiyi, L Xie & S Tang (2009). Preparation of a diacylglycerol-enriched soybean oil by phospholipase A1 catalyzed hydrolysis. *J Mol Catalysis B Enzymatic* 56 (2-3), 165-172.