

Lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi lokal untuk biokonversi CPO menjadi diasilgliserol

Specific lipase of 1,3-glyceride from indigenous fungi for bioconversion of CPO to produce diacylglycerol

TRI-PANJI ¹⁾, SUHARYANTO ¹⁾ & Nining ARINI ²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

Summary

Downstream industry of palm oil producing specialty oil with higher economic value compared to that of CPO in Indonesia is less developed due to technical obstacle and the availability of supporting materials. Specific lipase 1,3-glyceride for example which is used for oleochemical processing of healthy oil production is still imported with relatively high price. Healthy oil can be made from CPO bioconversion using the enzyme that produces oil rich in diacylglycerol (DAG). Although research on the production and the use of lipase has been well studied, production of specific lipase from microbes of local source is still very limited. This article reports one part of the series of the research activities on bioprocess and genetic engineering approaches to produce specific lipase for bioconversion of CPO i.e optimization of 1,3-glyceride-specific lipase production from fungi selected from local sources. Based on the fluorescence zone on the screening media, of the twenty isolates collection, it was found that P6 isolate, thereafter indentified as *Neurospora sitophila*, has the highest activity of 1,3-glyceride-specific lipase. The lipase of *N. sitophila* was able to catalyze glycerolysis of triacylglycerol (TAG) in CPO to produce DAG. The bioconversion products of lipase yielding ratio of DAG/TAG was higher than ratio of free fatty acids (FFA)/TAG (0.12 > 0.08). The optimum condition of the enzymatic bioconversion was at 40 °C, pH 6, and 10-day incubation. The primary fatty acids on the

DAG were oleic (56.2%), palmitic (40.0%), and myristic (2.7%) acids. The decrease of palmitic acid on DAG compared to on TAG, indicated that the lipase of *N. sitophila* worked relatively specific at C1 or C3 of the TAG.

[Keywords: Lipase optimization, *Neurospora sitophila*, fungi producing-lipase, indigenous fungi]

Ringkasan

Kurang berkembangnya industri hilir yang menghasilkan minyak khusus yang nilainya berlipat dibandingkan CPO antara lain karena hambatan teknis dan ketersediaan bahan pendukungnya. Lipase spesifik 1,3-gliserida misalnya, yang digunakan untuk produksi minyak kesehatan, masih diimpor dengan harga relatif tinggi. Minyak kesehatan dapat diproduksi dari biokonversi CPO dengan lipase spesifik 1,3-gliserida hingga diperoleh minyak yang kaya kandungan diasilgliserol (DAG). Tulisan ini melaporkan optimasi aktivitas lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi isolat lokal terpilih. Berdasarkan zona fluoresens pada medium penapis lipase, dari 20 isolat fungi yang diuji isolat P6 yang kemudian diidentifikasi sebagai *Neurospora sitophila* memiliki aktivitas tertinggi dan bersifat spesifik 1,3-gliserida. Lipase *N. sitophila* mampu mengkatalisis gliserolisis triasilgliserol (TAG) dalam CPO untuk menghasilkan DAG. Lipase tersebut menghasilkan nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari nilai per-

bandingan asam lemak bebas (ALB)/TAG (0,12 > 0,08). Kondisi optimum biokonversi enzimatis ini terjadi pada suhu 40 °C, pH 6, dan waktu inkubasi selama 10 hari. Asam lemak utama penyusun DAG adalah asam oleat (56,2%), palmitat (40,0%), dan miristat (2,7%). Berkurangnya asam palmitat pada DAG dibanding pada TAG menunjukkan bahwa lipase *N. sitophila* bekerja secara relatif spesifik pada C1 atau C3 dari gliserida.

Pendahuluan

Produk olahan minyak sawit baik untuk pangan maupun oleokimia memiliki nilai jual yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak sawit mentah (CPO). Produksi olahan CPO dapat dilakukan dengan efisien menggunakan proses biokonversi enzimatis. Kendala pengembangan proses biokonversi enzimatis dalam skala industri adalah ketersediaan dan harga lipase impor yang mahal karena hanya sedikit produsen lipase di dunia (Suzuki *et al.*, 1988; Elisabeth, 2003).

Lipase mikroba dapat diproduksi dari bakteri (*Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas* dan *Streptomyces* sp.) (Wingender *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1988), khamir (*Candida rugosa*, *Candida deformans*, *Pichia* sp. dan *Rhodotorula pilimanae*) (Muderhwa *et al.*, 1985), dan fungi (*Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium citrinum*, dan *Rhizopus* spp.) (Onion *et al.*, 1981; Yamane, 1987; Ibrahim *et al.*, 1991; Maliszewska & Mastalerz, 1992; Kosugi *et al.*, 1997). Olivia *et al.*, (1998) melaporkan bahwa fungi merupakan penghasil lipase yang baik.

Keunggulan penggunaan lipase dalam industri makanan adalah mengkatalis hidrolisis secara spesifik, proses dapat dilakukan pada suhu rendah, dan relatif aman dari risiko terbentuknya produk samping yang tidak dikehendaki. Modi-

fikasi oleh enzim lipase yang memiliki spesifitas reaksi 1,3-gliserida pada CPO, menghasilkan gliserida dengan produk utama diasilgliserol (DAG) dan produk samping monoasilgliserol (MAG) serta asam lemak bebas dan gliserol. Fraksi padat hasil biokonversi CPO dapat digunakan untuk pembuatan margarin, vanaspati dan oleokimia. Yasunaga *et al.* (2001) melaporkan bahwa minyak kaya DAG dapat berfungsi sebagai minyak kesehatan (*healthy oil*) karena antara lain dapat mengurangi trigliserida (TG) dalam serum darah, mencegah akumulasi lemak dalam tubuh dan memperbaiki rasio kolesterol serum darah.

Proses gliserolisis minyak sawit untuk menghasilkan MAG dan DAG dengan lipase *Lipozyme IM* impor telah dipelajari oleh Elisabeth *et al.* (1998) & Elisabeth *et al.* (1999). Harga lipase impor dari fungsi *Rhizomucor miehei* (*Lipozyme IM*) yang diproduksi oleh perusahaan Novo, Nordisk Bioindustry Inc, Denmark sekitar 25 juta rupiah per kg (Sigma, 2005) sehingga kurang ekonomis untuk diaplikasikan pada skala industri. Pengembangan industri dengan *input* bahan baku impor memiliki daya saing yang rendah dan menyebabkan *foot lose industry*.

Metode untuk memproduksi lipase secara murah perlu dikembangkan untuk mengatasi masalah tersebut. Salah satu metode yang dinilai memiliki peluang yang baik untuk dikembangkan adalah dengan cara fermentasi menggunakan fungi asli Indonesia. Indonesia dengan keanekaragaman hayati yang tinggi berpeluang besar untuk mengembangkan dan memproduksi lipase spesifik 1,3- gliserida dari fungi lokal. Penelitian bertujuan mendapatkan fungi penghasil enzim lipase spesifik 1,3-gliserida dan menetapkan kondisi optimum biokonversi CPO menjadi DAG.

Bahan dan Metode

Isolasi dan identifikasi fungi

Sampel untuk isolasi dan penapisan fungi lipolitik adalah tandan buah sawit dan minyak sawit mentah (CPO) dari kebun kelapa sawit, Kertajaya, PTPN VIII, Banten. Buah sawit disimpan dalam karung plastik dan CPO disimpan dalam jerigen. Fungi juga diisolasi dari sampel tempe segar yang diperoleh dari berbagai pasar tradisional di Bogor, Jakarta dan Kebumen, Jawa Tengah. Fungi koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) seperti *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera* juga digunakan untuk penapisan. Medium untuk isolasi adalah medium mineral yang mengandung 3% CPO (Steele & Stowers, 1991) atau potato dextrose agar (PDA).

Isolasi fungi lipolitik dilakukan dengan cara *direct plating* (Tomita, 1985). Sampel padat dipotong $\pm 1 \text{ cm}^2$, sedangkan sampel cair (CPO) diambil lima tetes kemudian diletakkan di atas permukaan medium dan diinkubasikan pada suhu ruang (26-30°C) selama empat hari. Koloni fungi yang tumbuh disubkultur sampai diperoleh isolat murni. Isolat dipelihara dalam PDA miring dan disimpan pada suhu ruang. Identifikasi fungi dilakukan terhadap isolat potensial berdasarkan ciri morfologi sel dan koloni dengan acuan Domsch *et al.* (1980).

Penyiapan inokulum

Isolat murni diremajakan setiap enam bulan. Untuk pembuatan inokulum, kultur ditanam dalam PDA miring dan diinkubasikan pada suhu ruang (26-30°C) selama tiga hari. Akuades steril (5 mL) ditambahkan ke dalam kultur dan spora dikerik kemudian diaduk dengan

pengaduk vorteks hingga diperoleh suspensi spora.

Penapisan fungi

Isolat yang diperoleh dari berbagai sumber diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim lipolitik menggunakan medium Hou & Johnston (1992) dengan komposisi 1 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g pepton, dan 20 g agar, yang dilarutkan dalam 1000 mL akuades sambil dipanaskan hingga homogen. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,2 kg/cm^2 selama 20 menit. Medium steril ditambahkan 2 mL rhodamin B steril 0,1% sambil diaduk kemudian dituang ke cawan Petri ($\varnothing 10 \text{ cm}$) sebanyak 15 mL dan dibiarkan mengeras. Permukaan medium kemudian ditutup dengan kertas saring steril berdiameter sama dengan cawan Petri yang telah ditetesi dengan 1 mL CPO secara merata. Bulatan kertas saring steril diameter 2 cm, dimasukkan ke dalam suspensi spora kemudian diletakkan pada permukaan medium penapisan dan diinkubasikan pada suhu ruang (26-30°C) selama 48 jam. Pengamatan aktivitas lipolitik dilakukan dengan mengukur diameter zona fluoresens yang terbentuk di sekitar koloni.

Produksi lipase spesifik 1,3-gliserida

Produksi lipase dilakukan dengan kultur permukaan menggunakan medium basal menurut Ibrahim *et al.* (1991) mengandung (% b/b) 1 CPO; 0,5 NaCl; 0,01 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 1 ekstrak khamir, pH 7,0. Kultur film permukaan dilakukan dalam fermentor film permukaan volume 600 mL dengan ketebalan 2-3 cm, diinokulasi dengan suspensi spora fungi

dan diinkubasikan dalam kondisi suhu ruang selama 72 jam. Kultur filtrat mengandung lipase kasar dipisahkan dari biomassa miselium dengan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit, kemudian diendapkan dengan menambahkan aseton dingin 1 : 2. Pelet dicuci dan dilarutkan kembali dengan bufer sitrat-fosfat untuk mendapatkan pH 4 dan 5, bufer fosfat pH 6 dan 7, dan Tris-HCl pH 8,0. Lipase tersebut selanjutnya diuji aktivitasnya dan kemampuannya dalam biokonversi TAG pada CPO menjadi DAG.

Optimasi proses gliserolisis

Reaksi gliserolisis dilakukan dengan mencampurkan CPO, heksana, gliserol serta lipase dalam bufer Tris-HCl 50 mM pH 5,0. Rangkaian tahapan reaksi gliserolisis menggunakan metode Mappiratu (1999). Optimasi proses gliserolisis dilakukan meliputi variasi pH, suhu, dan waktu inkubasi, yaitu pH 6,7, dan 8; suhu 30, 40, dan 50°C; dan waktu 5, 7, dan 10 hari (Mappiratu, 1999).

Analisis fraksi minyak

Fraksi TAG, DAG, MAG dan ALB dalam produk reaksi dan hasil pemisahan ditentukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif (AOAC, 1995). Plat KLT dari gel silika G 60 F254 ketebalan 0,25 mm, berukuran 20 x 20 cm diaktifkan dalam oven suhu 100°C selama 60 menit. Sampel bebas pelarut, ditotolkan pada plat KLT, kemudian dimasukkan ke dalam larutan pengembang yang berisi 30 mL eluen campuran heksana: dietileter : asam formiat yaitu 80:20:2 (v/v/v) dan telah dijenuhkan selama satu jam. Pewarnaan noda dilakukan dengan uap iodin. Noda TAG, DAG, MAG dan ALB

dikerik dan ditampung dalam labu Erlenmeyer. Hasil kerikan setiap fraksi diekstrak tiga kali dengan 5 mL pelarut heksana untuk noda TAG, campuran heksana/dietil eter 1:1 (v/v) untuk noda DAG, sedangkan noda MAG dan ALB dengan pelarut dietil eter. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan gas nitrogen, kemudian disempurnakan dalam oven dengan suhu 100°C.

Analisis kadar DAG dan komposisi asam lemak

Analisis kadar DAG dalam produk reaksi dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom florisil (AOAC, 1995). Kolom kromatografi (panjang 50 cm, diameter 2,5 cm) diisi dengan 10 mL pelarut heksana. Kolom selanjutnya diisi dengan serbuk florisil berukuran partikel 60-80 mesh sebanyak 60 g. Florisil dalam kolom dipadatkan, kemudian dilapisi kertas saring pada permukaannya, yang diikuti dengan natrium sulfat anhidrat dalam jumlah terbatas. Produk reaksi bebas pelarut (2 g) dipindahkan ke dalam kolom secara kuantitatif tepat pada permukaan adsorben. Kolom dielusi dengan eluen campuran dietileter : heksana yaitu 1:4 (v/v), kemudian diikuti dengan eluen dietileter.

Untuk mengetahui akhir proses elusi, komponen dalam eluat dideteksi menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Pada deteksi tersebut diperoleh keterangan komponen TAG + DAG terelusi sempurna pada penggunaan eluen campuran dietil eter : heksana yaitu 1 : 4 (v/v) sebanyak 500 mL, sedangkan komponen MAG terelusi sempurna setelah penggunaan eluen dietil eter sebanyak 300 mL. Eluat yang mengandung DAG diuapkan pelarutnya dengan gas nitrogen sampai diperoleh

berat yang tetap, kemudian dihitung kadar DAG dalam produk reaksi. Komposisi asam lemak DAG dan CPO ditentukan menggunakan kromatografi gas dengan kolom FFAP (25 mm x 0,25 mm) menurut Tri Panji (1997).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan penapisan fungi

Isolasi menghasilkan empat isolat fungi dari CPO, 16 isolat fungi dari buah sawit dan 6 isolat fungi dari tempe (*Rhizopus* sp.). Dari 26 isolat fungi tersebut 20 isolat menghasilkan zona fluoresens pada medium penapisan yang disertai dengan adanya pertumbuhan koloni (Tabel 1). Menurut Hou & Johnston (1992) terbentuknya zona fluoresens menunjukkan kemampuan isolat menghasilkan lipase yang memecah TAG pada CPO menjadi DAG, MAG atau ALB dan berikatan dengan rhodamin B membentuk senyawa berpendar. Lima isolat dari buah sawit dan satu isolat dari CPO tumbuh pada medium penapisan tetapi tidak menghasilkan lipase Hasil isolasi menunjukkan tidak seluruh isolat memiliki kemampuan lipolitik karena kemungkinan merupakan mikroba selulolitik yang terkait dengan kandungan serat buah sawit yang mencapai 21% (Lubis, 1992).

Enam isolat fungi dari tempe seluruhnya menghasilkan zona fluoresens. Dua koleksi kultur fungi yaitu *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera* juga menghasilkan zona fluoresens. *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera* masih dalam ordo yang sama yaitu Zygomycetes. Lima isolat memiliki zona fluoresens yang cukup tinggi yaitu P2, P3 dan P6 serta *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera*. Isolat

yang diperoleh dalam penelitian ini menghasilkan zona fluoresens yang lebih tinggi (84 mm) dibandingkan dengan fungi terbaik yang diseleksi Olivia *et al.* (1998) yaitu *R. stolonifer* dengan zona fluoresens 77 mm. Isolat yang menghasilkan zona fluoresens tertinggi (isolat P6) diduga mampu menghasilkan lipase dengan aktivitas yang tinggi pula dan memiliki spesifitas 1,3-gliserida dari CPO. Untuk mengetahui kemampuan isolat tersebut, aktivitas lipase akan diuji untuk hidrolisis CPO dengan mengukur kadar hasil pecahannya.

Jumlah isolat fungi yang diperoleh dari buah sawit lebih banyak dibandingkan dari CPO diduga karena ketersediaan nutrisi dalam komponen penyusun buah yang lebih lengkap dan ketersediaan oksigen yang mendukung pertumbuhan mikroba. Selain itu, proses pengolahan CPO menggunakan uap panas bertekanan tinggi untuk sterilisasi tandan buah segar (TBS) dapat mematikan miselium dan spora fungi. Hasil seleksi yang dilakukan Ibrahim *et al.* (1991) menunjukkan bahwa fungi pada umumnya mempunyai kemampuan lipolitik pada minyak sawit yang lebih baik dari pada bakteri dan khamir. Fungi dalam tempe diisolasi untuk mikroba sumber dan seluruhnya menghasilkan zona fluoresens. Olivia *et al.* (1998) melaporkan bahwa *Rhizopus* spp. memiliki kemampuan lipolitik yang cukup baik.

Hasil gliserolisis TAG dalam CPO ditunjukkan oleh terbentuknya spot komponen lemak dalam pelat gel silika, yaitu berturut-turut dari yang paling bawah DAG, ALB, TAG, dan karoten. Hasil perhitungan persentase luasan spot masing-masing komponen lemak menjadi TAG, DAG dan ALB (Tabel 2) oleh ketiga isolat fungi (P2, P3 dan P6) berbeda-beda. Nilai perbandingan DAG/

Tabel 1. Penapisan fungi penghasil lipase hasil isolasi dari CPO, buah kelapa sawit, dan tempe pada suhu ruang (26-30 °C) selama 48 jam kultur.

Table 1. Screening for lipase -producing fungi isolated from CPO, fruit of oil palm, and tempe at room temperature (26-30°C) after 48 hours of culture.

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Diameter zona fluoresens <i>Diameter of fluorescence zone (mm)</i>	Pertumbuhan miselium <i>Mycelium growth</i>
Isolat asal CPO & buah sawit <i>Isolate from CPO & oil palm fruit</i>		
P1	48	+
P2	50	++
P3	55	++
P4	46	+
P5	27	+
P6	84	+++
P7	24	+
P8	31	+
P9	35	+
P10	-	+
P11	21	++
P12	32	++
P13	-	+
P14	35	++
P15	-	+
P16	-	+
P17	25	++
P18	-	+
P19	-	-
P20	33	+
Isolat asal tempe/ <i>tempe isolate</i>		
T1 (Psr Gn Batu, Bogor)	37	+++
T2 (Pasar Rawa Sari, Jakarta)	28	++
T3 (Pasar Wr Jambu, Bogor)	42	++
T4 (Pasar Kebumen, Jawa Tengah)	27	+
T5 (Pasar Ciluar, Bogor)	29	++
T6 (Pasar Ciseeng, Parung)	52	+
Isolat koleksi / <i>collection isolate</i>		
<i>Rhizopus oryzae</i>	50	++
<i>Absidia corymbifera</i>	52	++

Keterangan/Note : + sedikit (*slight*), ++ banyak (*robust*), +++ sangat banyak dan padat (*abundant and dense*).

Tabel 2. Hasil kromatografi lapis tipis komponen hasil biokonversi CPO dengan lipase isolat P2, P3 dan P6 dan waktu gliserolisis tiga hari, suhu 30 °C.

Table 2. Result of thin layer chromatography of components from CPO bioconversion with lipase from isolate P2, P3 and P6 and glycerolysis for three days, at temperature 30 °C.

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Fraksi minyak (%) <i>Oil fraction (%)</i>		
	TAG	DAG	ALB (FFA)
P2	87	5	8
P3	81	8	11
P6	83	10	7

	Nilai perbandingan <i>Ratio</i>		Keterangan <i>Remark</i>
	DAG/TAG	ALB/TAG (FFA/TAG)	
	P2	0,06	0,09
P3	0,01	0,14	lipase tak spesifik (<i>unspecific lipase</i>)
P6	0,12	0,08	lipase spesifik 1,3-gliserida (<i>specific lipase 1,3-gliseride</i>)

TAG atau ALB/TAG dapat mengindikasikan spesifitas lipase. Jika nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari ALB/TAG, maka diindikasikan bahwa lipase yang bekerja merupakan lipase spesifik 1,3-gliserida. Isolat P6 memiliki nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari ALB/TAG, yaitu 0,12 > 0,08. Berbeda dengan dua isolat lainnya, nilai perbandingan DAG/TAG pada isolat P6 lebih kecil dari ALB/TAG. Oleh karena itu isolat P6 diindikasikan memiliki kemampuan menghasilkan lipase spesifik 1,3-gliserida. Hasil identifikasi dari penampakan karakteristik morfologi koloni dan pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa isolat P6 adalah *N. sitophila* Shear & Dodge. Fungi yang adaptif pada substrat berlemak ini juga dikenal sebagai jamur roti merah atau jamur oncom.

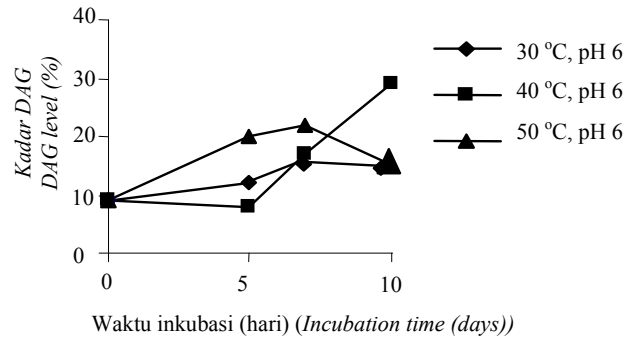
Optimasi Biokonversi

N. sitophila P6 selanjutnya digunakan untuk optimasi biokonversi CPO menjadi DAG melalui proses gliserolisis. Lipase *N. sitophila* mampu mengkatalisis gliserolisis triasilgliserol (TAG) dalam CPO menghasilkan DAG. Secara umum, aktivitas gliserolisis yang dikatalisis lipase masih terus berlangsung sampai inkubasi hari ke-10, dilihat dari penurunan kadar TAG dan kenaikan kadar DAG maupun ALB (Gambar 1-6). Namun, pada kondisi tertentu seperti pada suhu 30 °C dan pH 8, 50 °C dan pH 6, atau 50 °C dan pH 7, aktivitas sudah mencapai optimal pada inkubasi selama tujuh hari. Hasil optimasi gliserolisis untuk produksi DAG pada variasi pH 6, 7, dan 8 dengan waktu inkubasi 0 sampai 10 hari pada suhu 30 –50 °C

menunjukkan bahwa kadar DAG tertinggi diperoleh pada pH 6 suhu 40°C, dengan kadar DAG mencapai 29% waktu inkubasi 10 hari (Gambar 1). Hasil yang sedikit lebih rendah, yaitu kadar DAG sebesar 27% diperoleh dalam gliserolisis pada pH 7 dan suhu 40°C (Gambar 2). Kadar DAG makin menurun pada pH gliserolisis 8,0 (Gambar 3)

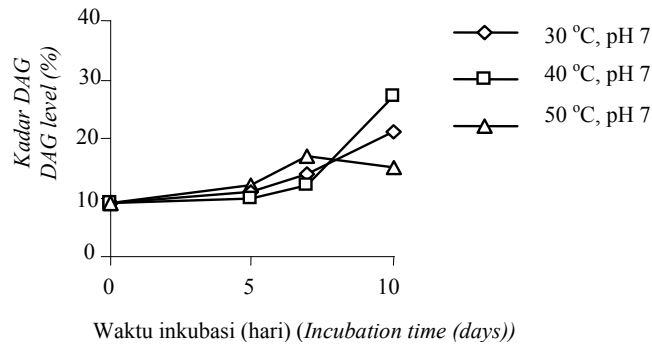
Pada kondisi optimal tersebut, isolat

P6 juga menghasilkan ALB paling rendah, yaitu sebesar 6% (Gambar 4). Kondisi lain yang cukup baik, yaitu pada suhu 40°C pada pH 7 yang menghasilkan DAG sebesar 27%, sisa TAG paling kecil yaitu 48%. Tetapi pada kondisi ini, ALB yang dihasilkan sangat tinggi, yaitu mencapai 25% (Gambar 5). Pada umumnya standar kandungan ALB untuk bahan baku minyak konsumsi maksimum 3%.



Gambar 1. Produksi diasilgliserol (DAG) dari biokonversi CPO dengan lipase *N. sitophila* pada berbagai suhu dan waktu inkubasi pada pH 6.

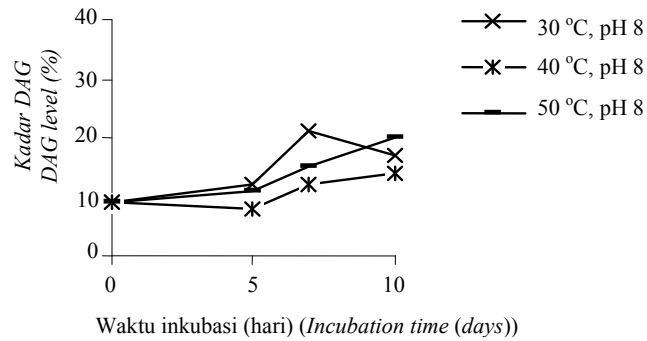
Figure 1. Diacylglycerol (DAG) production from bioconversion of CPO with lipase from *N. sitophila* at several different temperatures and incubation times at pH 6.0



Gambar 2. Produksi diasilgliserol (DAG) dari biokonversi CPO dengan lipase *N. sitophila* pada berbagai suhu dan waktu inkubasi pada pH 7.

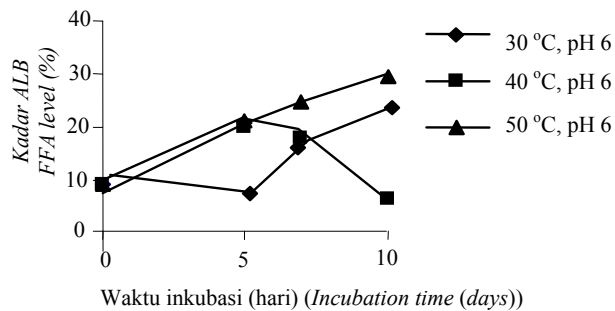
Figure 2. Diacylglycerol (DAG) production from bioconversion of CPO with lipase from *N. sitophila* at several different temperatures and incubation times at pH 7.0

Lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi lokal untuk biokonversi CPO...



Gambar 3. Produksi diasilgliserol (DAG) dari biokonversi CPO dengan lipase *N. sitophila* pada berbagai suhu dan waktu inkubasi pada pH 8.

Figure 3. Diacylglycerol (DAG) production from bioconversion of CPO with lipase from *N. sitophila* at several different temperatures and incubation times at pH 8.0



Gambar 4. Perubahan kadar asam lemak bebas (ALB) dari biokonversi CPO dengan lipase *N. sitophila* pada berbagai suhu dan waktu inkubasi pada pH 6.

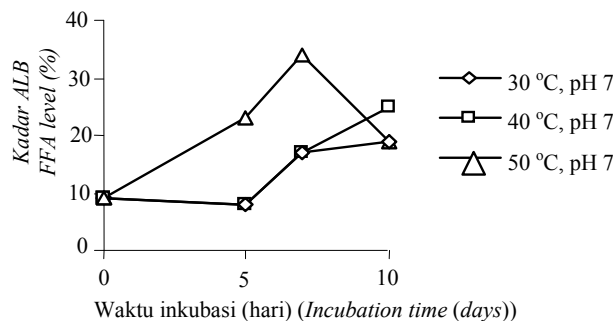
Figure 4. Change of free fatty acid (FFA) content from bioconversion of CPO with lipase from *N. sitophila* at several different temperatures and incubation times at pH 6.0.

Pada seluruh kondisi yang diteliti, kadar DAG tertinggi mencapai 29%, yaitu pada pH 6, suhu 40 °C, dan waktu inkubasi 10 hari. Kadar DAG ini masih terlalu rendah dibandingkan dengan tuntutan kadar DAG yang dikehendaki oleh kalangan industri untuk minyak nutrasetikal, yaitu kadar DAG minimum 80%. Untuk mencapai kadar DAG sebesar ini mungkin dapat dicapai dengan cara pemisahan komponen TAG melalui fraksinasi bertingkat. Pada proses pendinginan, secara bertahap TAG yang memiliki bobot molekul paling tinggi akan membeku terlebih dahulu, baru kemudian disusul oleh DAG dan kemudian MAG (Muderwa *et al.*, 1985). Dengan pemisahan TAG melalui pendinginan bertahap, kandungan DAG akan meningkat. TAG yang dipisahkan dapat digunakan kembali dalam proses gliserolisis untuk memproduksi DAG.

Asam lemak utama penyusun DAG adalah asam oleat (56,2%), palmitat (40,0%), dan miristat (2,7%). Komposisi ini berbeda dengan komposisi asam lemak CPO yang didominasi oleh palmitat 64,5%

dan oleat 41,6%. Analisis sebelumnya menunjukkan bahwa komposisi asam lemak CPO tersusun atas asam palmitat 39,5%, oleat 25,5%, stearat 15,8%, linoleat 13,7%, linolenat 2,5%, dan miristat 2,4% (Tri-Panji, 1997).

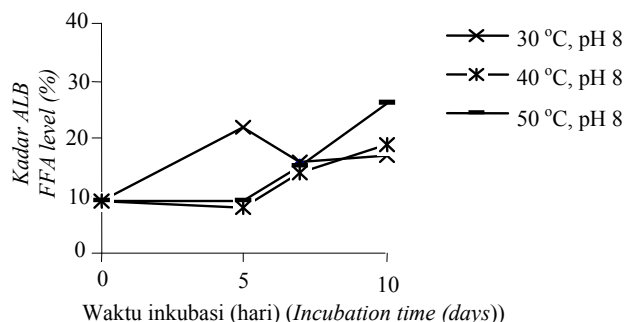
Menurut Muderhwa *et al.* (1985) struktur gliserida minyak sawit tersusun atas palmitat yang 90% berada di posisi luar dari gliserida sehingga berakibat minyak sawit (CPO) berbentuk padat pada suhu ruang. Berkurangnya asam palmitat pada DAG dibanding pada TAG menunjukkan bahwa lipase *N. sitophila* bekerja secara relatif spesifik pada posisi luar, yaitu pada C1 atau C3, dari gliserida. Hasil ini berbeda dengan hasil uji aktivitas lipase dari *Pseudomonas fluorescens* yang menunjukkan aktivitas yang tidak spesifik (Tri-Panji & Siswanto, 1998). Kerja lipase yang spesifik ini penting dalam produksi DAG agar reaksi dapat dikendalikan sehingga tidak menghasilkan pemecahan total gliserida menjadi ALB seperti yang biasa terjadi pada pemecahan secara non enzimatis.



Gambar 5. Perubahan kadar asam lemak bebas (ALB) dari biokonversi CPO dengan lipase *N. sitophila* pada berbagai suhu dan waktu inkubasi pada pH 7.

Figure 5. Change of free fatty acid (FFA) content produced from bioconversion of CPO with lipase from *N. sitophila* at several different temperatures and incubation times at pH 7.0.

Lipase spesifik 1,3-gliserida dari fungi lokal untuk biokonversi CPO...



Gambar 6. Perubahan kadar asam lemak bebas (ALB) dari biokonversi CPO dengan lipase *N. sitophila* pada berbagai suhu dan waktu inkubasi pada pH 8.

Figure 6. Change of free fatty acid (FFA) produced from bioconversion of CPO with lipase from *N. sitophila* at several different temperatures and incubation times at pH 8.0.

Kesimpulan

1. Sebanyak 26 isolat telah diisolasi dari buah sawit dan CPO dan dari hasil penapisan dengan medium penapis lipase diperoleh 20 isolat penghasil lipase. Isolat yang menghasilkan zona fluoresens tertinggi pada medium penapis lipase adalah isolat P6. Lipase dari isolat yang diidentifikasi sebagai *N. sitophila* tersebut spesifik 1,3-gliserida karena menghasilkan nilai perbandingan DAG/TAG lebih besar dari nilai perbandingan ALB/TAG (0,12 > 0,08).
2. Lipase *N. sitophila* mampu mengkatalisis gliserolisis triasilgliserol (TAG) dalam CPO menghasilkan DAG. Kondisi optimum biokonversi enzimatis ini diperoleh pada suhu 40°C, pH 6, dan waktu inkubasi selama 10 hari. Asam lemak utama penyusun DAG adalah asam oleat (56,2%), palmitat (40,0%), dan miristat (2,7%). Berkurangnya asam palmitat pada DAG dibanding pada

TAG menunjukkan bahwa lipase *N. sitophila* bekerja secara relatif spesifik pada C1 atau C3 dari gliserida.

Daftar Pustaka

- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. Washington DC, AOAC Press.
- Domsch, K.H., Gams W. & Anderson T.H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Vol 1. London, Academic Press.
- Elisabeth, J (2003). *Roadmap dan agenda Rusnas kelompok kerja farmasi dan nutrasetikal. Dalam Panduan Lokakarya Nasional: Identifikasi Agenda Riset Strategis Dalam Rangka Pengembangan Industri Hilir Kelapa Sawit*. Jakarta, Masyarakat Perkelapa-Sawitan Indonesia.
- Elisabeth, J., A. Jatmika & E. Nainggolan (1998). Preparasi mono- dan digliserida dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatis. *J. Penelitian Kelapa Sawit*, 6(1), 79-87.

- Elisabeth, J., A. Jatmika & O.P. Sitanggang (1999). Optimasi proses gliserolisis enzimatis pada minyak sawit untuk meningkatkan hasil monogliserida. *J. Penelitian Kelapa Sawit*, **7**(3), 173-185.
- Hou, C.T. & T.M. Johnston (1992). Screening of lipase activities with culture from agricultural research services culture collection. *JAOCs*, **69**, 1088-1097.
- Ibrahim, C.O., N.J. Noor & I. Darah (1991). Isolation and identification of an exogenous lipase producing fungi using palm oil medium. *J. Bioscience*, **2**, 59-69.
- Kosugi, Y., C. Qing-long, K. Kanazawa & H. Nakanishi (1997). Changes in hydrolysis specificities of lipase from rhizomucor miehei to polyunsaturated fatty acyl ethyl esters in different aggregation states. *JAOCs*, **74** (11), 1395-1399.
- Lubis, A.U (1992). *Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) di Indonesia*. Medan, Pusat Penelitian Perkebunan Marihat. 383 p.
- Mappiratu (1999). Penggunaan biokatalis dedak padi dalam biosintesis antimikroba monoasilgliserol dari minyak kelapa. *Disertasi*. Bogor, Program Pascasarjana, IPB.
- Maliszewska, I & P. Mastalerz (1992). Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 190-193.
- Muderhwa, J.M., R. Ratomahenina, M. Pina, J. Graille & P. Galzy (1985). Purification and properties of the lipases from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra, *JAOCs*, **62** (6), 1031-1036.
- Olivia, A., A.W. Gunawan & A. Suwanto (1998). Isolasi dan deteksi aktivitas lipase *Rhizopus* spp. *Hayati*, **5**(4), 113-115.
- Onion, A.H.S., D. Allsoop & H.O.W. Eggins (1981). *Smith's Introduction to Industrial Mycology*. 7 th (eds). British, Edward Arnold. p. 140-142.
- Sigma (2005). *Biochemicals & Reagents for Life Science Research*. Singapore, Sigma-Aldrich Pte. Ltd., 2935 p.
- Suzuki, T., Y. Mushiga, T. Yamane & S. Shimizu (1988). Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 417-422.
- Steele, D.B. & M.D. Stowers (1991). Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Ann. Rev Microbiol.*, **45**, 89-106.
- Tomita, F (1985). Screening of useful of lipid strains international. *In Post University Course in Microbiology*. Japanese National Commission for UNESCO, 320 p.
- Tri-Panji (1997). Growth and the content of polyunsaturated fatty acids of *Absidia corymbifera* biomass on media containing crude palm oil. *Menara Perkebunan*, **65**, (3), 104-110.
- Tri-Panji & Siswanto (1998). Lipase production of *Pseudomonas fluorescens* growing on media containing crude palm oil (CPO) and its potential application for triglyceride biotransformation. *In Annual Reports of ICBiotech, International Center for Biotechnology*. Japan Osaka University.
- Wingender, J., S. Volz, & U.K. Winkler (1987). Interaction of extracellular *Pseudomonas* lipase with alginate and its potential use in biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 139-145.
- Yamane, T (1987). Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview. *In Applewhite, T.H. (ed). Proceeding Of World Conference on Biotechnology for Fats and Oils Industry*. AOAC Champaign, 17-22.
- Yasunaga, K., Y. Katsuragi & T. Yasukawa (2001). Nutritional characteristics of diacylglycerol. *In 2001 PIPOC International Palm Oil Congress*, 149-155.