

## OPTIMASI PEMBUATAN PRODUK TURUNAN MINYAK NABATI MONOASILGLISEROL SECARA ESTERIFIKASI ENZIMATIS

Prima Luna<sup>1)</sup>, Nuri Andarwulan<sup>2,3)</sup>, Tri Haryati<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapenen Pertanian

<sup>2)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

<sup>3)</sup> SEAFast Center, Institut Pertanian Bogor

Email : pemudikahfi@yahoo.co.id

Monoasilgliserol (MAG) dari asam laurat merupakan salah satu produk turunan dari minyak nabati yang memiliki keistimewaan, berfungsi sebagai emulsifier, pengawet pangan, *sanitizer*, dan *food supplement* untuk meningkatkan imunitas tubuh. Penelitian ini bertujuan mencari kondisi optimum pembuatan monoasilgliserol dengan parameter komposisi MAG melalui proses esterifikasi menggunakan enzim lipase imobil sebagai katalis. Metode esterifikasi enzimatis kontinyu dilakukan pada reaktor *packed bed* sirkulasi. Rancangan percobaan optimasi pada penelitian ini menggunakan *Central Composite Design* dari *Response Surface Methods* (RSM). Suhu dan waktu reaksi merupakan faktor percobaan penelitian ini. Kondisi reaksi esterifikasi enzimatis kontinyu menggunakan rasio gliserol/asam lemak (5:1); rasio pelarut/substrat 8,8:1 dan *residence time* 23,57 menit. Hasil reaksi esterifikasi menggunakan RSM menunjukkan persamaan kuadrat optimasi MAG adalah  $Y = -61,700 + 6,088 x_1 + 3,259 x_2 - 0,065 x_1^2 + 0,017 x_1 x_2 - 1,792 x_2^2$  dan menghasilkan MAG maksimum pada suhu dan waktu reaksi optimum 46,92°C (47±0,5)°C and 1,1 jam. Hasil validasi reaksi esterifikasi sebanyak lima kali ulangan menggunakan enzim lipase pada kondisi di atas menghasilkan rendemen 81,09±2,99% dengan komposisi MAG 83,15±3,51%. Koefisien keragaman untuk validasi rendemen dan komposisi MAG yaitu 3,69 and 4,25%. MAG memiliki sifat fisikokimia: bilangan asam 1,78±008%, bilangan peroksida 0,49±0,14 meq O<sub>2</sub>/kg MAG, kadar gliserol bebas 0,26%, dan memiliki kisaran titik leleh 53-53,5°C.

**Kata kunci:** Monoasilgliserol, esterifikasi enzimatis, reaktor *packed bed*, fisikokimia

**ABSTRACT.** Prima Luna, Nuri Andarwulan, and Tri Haryati. 2011. *Synthesis Optimization of Monoacylglycerol by Enzymatic Esterification*. Monoacylglycerol (MAG) from lauric acid is a superior product derived from vegetable oil, which can be used as emulsifier, food preservative, sanitizer, and food supplement for increased human immunity. The aim of this research was to obtain the optimum conditions for monoacylglycerol synthesis based on MAG content using commercialized lipase. The Central Composite Design of Response Surface Methods (RSM) was used to arrange the experiments. Temperature and reaction time were the two variables investigated in the present study. Continuous enzymatic esterification was conducted in a circulated packed bed reactor with glycerol/oil molar ratio 5:1, solvent/substrate ratio 8.8:1 (wt/wt) and residence time 23.57 minute. The result showed that the quadratic equation for synthesis optimization of MAG was  $Y = -61.700 + 6.088 x_1 + 3.259 x_2 - 0.065 x_1^2 + 0.017 x_1 x_2 - 1.792 x_2^2$  which produced maximum MAG at an optimum temperature of 46.92°C (47±0.5)°C and reaction time for 1.1 hour. Using the optimized conditions, lipase esterification, which was repeated five times, produced 81.09±2.99% yield with MAG content of 83.15±3.51%. Coefficients of variance for validation of the yield and MAG content were 3.69 and 4.25%, respectively. The MAG synthesized had the following physicochemical properties: acid value 1.78±008%, peroxide value 0.49±0.14 meq O<sub>2</sub>/kg MAG, free glycerol content 0.26%, and melting point 53-53.5°C

**Keywords:** monoacylglycerol, enzymatic esterification, packed bed reactor, physicochemical

### PENDAHULUAN

Perkebunan kelapa sawit dan kelapa di Indonesia merupakan komoditas perkebunan yang telah memberikan banyak kontribusi terhadap pendapatan negara. Menurut data Direktorat Jenderal Perkebunan Kementerian Pertanian Tahun 2010 produksi kelapa sawit berupa minyak sawit mentah atau CPO (*Crude Palm Oil*) Indonesia adalah 19.760.011 ton dengan luas lahan kelapa sawit 8.036.431 hektar, sedangkan produksi kelapa Indonesia pertahun menempati urutan kedua setelah Filipina, yakni sebesar 16,146 milyar butir (24,4% produksi dunia) dengan luas lahan kelapa mencapai 3,8 juta hektar. Oleh karena itu,

Indonesia mempunyai peluang yang sangat besar dalam pengembangan produk pangan maupun nonpangan yang berbahan dasar minyak nabati berasal dari kelapa sawit dan kelapa disertai dengan jaminan mutu dan nilai tambah terhadap produk minyak dan turunannya tersebut.

Komoditas kelapa sawit dan kelapa sebagian besar dimanfaatkan untuk minyak sayur dan minyak makan dengan nilai tambah yang rendah. Minyak inti sawit (PKO) telah banyak digunakan oleh industri oleokimia terutama sebagai bahan dasar pembuatan *fatty ester*, metil ester, *fatty alcohol*, dan gliserol. Namun pembuatan emulsifier dari minyak ini belum banyak dikembangkan oleh industri pangan maupun nonpangan. Pembuatan emulsifier yang

berasal dari minyak nabati ini akan memberikan nilai tambah tersendiri untuk komoditi perkebunan ini. Minyak inti sawit dan minyak kelapa memiliki potensi yang sangat besar untuk diolah menjadi emulsifier yang bermutu tinggi dikarenakan memiliki kandungan asam laurat yang cukup tinggi. Asam lemak laurat mendominasi proporsi asam lemak dalam PKO dan kelapa (sekitar 50%)<sup>1</sup>.

Monoasilgliserol (MAG) adalah salah satu emulsifier yang banyak digunakan sebagai bahan tambahan pangan<sup>2</sup>. MAG dan turunan minyak lainnya seperti Diasilgliserol (DAG), sebanyak 75% digunakan sebagai emulsifier pangan di dunia dan di Amerika Serikat sekitar 100 juta kilogram digunakan per tahunnya<sup>3</sup>. MAG secara luas digunakan dalam produk bakeri, margarine, produk susu, dan *confectionary* karena fungsinya sebagai emulsifier, penstabil, dan *conditioning*<sup>4</sup>. Monoasilgliserol dari asam laurat, merupakan salah satu produk turunan minyak nabati, yang memiliki keistimewaan. Keistimewaan kegunaan MAG dari asam laurat antara lain: sebagai bahan pengawet pangan dan sanitizer, memiliki kemampuan menghancurkan virus herpes dan HIV-1 serta menurunkan resiko penularan virus ini pada bayi dari ibu hamil yang terinfeksi HIV-1<sup>5</sup>, selain itu MAG dari asam laurat juga efektif menghambat sel vegetative *Bacillus cereus* dengan cara merusak membran sehingga terjadi kebocoran protein intraselular<sup>6,7,8</sup>.

MAG dari asam laurat dalam bidang pangan digunakan sebagai emulsifier sekaligus antiviral, antibakteri, dan antifungal<sup>9,10</sup>. MAG dari asam laurat dapat menghambat bahkan membunuh virus, bakteri-bakteri penyebab kebusukan dan penyebab penyakit (patogen) seperti bakteri-bakteri gram positif<sup>6</sup>, *Bacillus cereus*<sup>6,7</sup>, *Clostridium perfringens*<sup>10</sup>, *Bacillus anthrax*<sup>11</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>12,13,14</sup>. Selain itu, MAG dari asam laurat memiliki aktivitas untuk mencegah infeksi di kulit<sup>15,16,17</sup>, sehingga merupakan produk teknologi yang bernilai tinggi karena digunakan pula di industri kosmetik dan farmasi. Atas dasar pertimbangan tersebut maka diperlukan kajian tentang teknologi pengolahan produk turunan minyak atau lemak untuk menghasilkan MAG tersebut. Pada penelitian ini monoasilgliserol dilakukan dengan cara esterifikasi yaitu mereaksikan asam laurat dan gliserol menggunakan lipase imobil komersial.

Faktor-faktor yang menentukan agar pembuatan MAG secara esterifikasi enzimatis berlangsung optimal antara lain: faktor suhu, waktu reaksi, dosis enzim, dan jumlah pelarut yang digunakan. Suhu dan waktu reaksi pada penelitian ini sebagai faktor percobaan. Pembuatan monoasilgliserol dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatis. Cara kimia merupakan cara yang paling banyak digunakan dalam industri, namun reaksi kimiawi seperti ini berlangsung lama, tidak selektif, dan menggunakan energi dalam jumlah besar. Selain itu, cara ini akan

menghasilkan produk samping yang tidak dikehendaki seperti warna gelap, rasa pahit, dan flavor yang menyimpang. Pembuatan MAG secara enzimatis menjadi pilihan peneliti beberapa tahun terakhir, karena aktivitas katalitik enzim yang sangat tinggi dan kemampuannya bekerja pada suhu relatif rendah<sup>18</sup>.

Berkembangnya teknologi enzim imobil meningkatkan stabilitas enzim<sup>19</sup>. Lipase dalam penyangga padat (imobil) pada siklus 10 kali belum mengalami penurunan aktivitas enzim yang signifikan. Menurut penelitian Fernandez-Lorente<sup>20</sup>, Lipase imobil yang berikatan hidrofobik dapat digunakan dalam 10 kali reaksi esterifikasi tanpa penurunan yang signifikan sebagai biokatalis. Yang *et al.*<sup>21</sup>, melakukan penelitian penggunaan ulang Novozyme® 435 dengan *recovery* lipase pada reaksi esterifikasi dan menggunakan kembali enzim hasil *recovery* pada percobaan selanjutnya dan menghasilkan tidak ada penurunan yang signifikan pada aktivitas enzim setelah beberapa reaksi *batch* setelah 14 kali reaksi. Imobilisasi lipase akan memperbaiki stabilitas, pemisahan produk, dan pemisahan enzim dari reaksi untuk digunakan kembali<sup>22</sup>.

*Candida* dan *Rhizopus* yang merupakan organisme yang paling sering dipakai sebagai sumber penghasil lipase<sup>23</sup>. Salah satu lipase imobil yang banyak digunakan adalah Lipozyme dan Novozyme. Monteiro *et al.*<sup>24</sup> melakukan penelitian reaksi esterifikasi enzimatis dengan substrat asam laurat dan gliserol (rasio molar 1:5) dalam sistem homogen dengan katalis Lipozyme IM. Aktivitas Lipozyme IM adalah 5-6 BAUN/g (*Batch Acidolysis Units Novo*). Pelarut yang digunakan adalah n-heksan dan tert-butanol (1:1 v/v). Hasil reaksi pada sistem homogenus n-heksan/tert butanol (1:1 v/v) lebih baik karena produk yang dihasilkan adalah 65% monolaurin dengan sedikit sekali dilaurin.

Tahap optimasi dan validasi dilakukan untuk mencari kondisi optimum pembuatan MAG dari asam laurat secara enzimatis. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan kondisi optimum untuk pembuatan MAG melalui proses esterifikasi dengan bahan baku asam lemak laurat komersial menggunakan enzim lipase imobil.

## BAHATAN METODE

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni 2010 sampai dengan Januari 2011 bertempat di Laboratorium Kimia SEAFast Center IPB dan Laboratorium Kimia Pangan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan (ITP), IPB.

### A. Bahan dan Alat

Bahan baku untuk pembuatan monoasilgliserol adalah asam lemak laurat teknis. Bahan kimia yang digunakan gliserol, standar monolaurin (Sigma), heksan teknis, tert-butanol p.a (Sigma), (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,1 N, larutan

Wijs, larutan Alkohol 95%, indikator phenophtalein dan pati, Larutan NaOH 0,01 N, larutan kloroform, Dimetil formamida (DMF), benzena, dan aquades. Enzim imobil yang digunakan pada penelitian ini adalah Novozyme<sup>®</sup> 435. Novozyme<sup>®</sup> 435 dibeli dari Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark) adalah lipase komersial yang berasal dari *Candida antarctica* yang diproduksi melalui rekayasa genetik dengan *submerged fermentation* dari mikroorganisme *Aspergillus oryzae* dan diadsorpsi dalam macroporous resin<sup>3,25</sup>. Novozyme<sup>®</sup> 435 adalah katalis yang stabil pada suhu tinggi dan pelarut organik. Berdasarkan informasi dari Novo Nordisk Bioindustrial Ltd. Novozyme<sup>®</sup> 435 mempunyai aktivitas inesterifikasi 10000 PLU/g (*Propyl Laurate Units/gram*).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rangkaian reaktor *packed bed* yang dilengkapi dengan tangki stok, pompa peristaltik (BT 100-1 F), waterbath (Stephen Haake, Germany), *rotary vapor*, dan wadah penampung produk, serangkaian peralatan GC (*Gas Chromatography*) dengan detektor FID (*Flame Ionization Detector*), neraca analitik, Aw-meter (Shibaura WA-360), pH meter, kertas saring dan peralatan gelas.

## B. Metode Penelitian

### 1. Analisis Bahan Baku

Asam lemak dan enzim yang digunakan dalam proses esterifikasi dianalisis terlebih dahulu untuk menentukan kualitas bahan baku. Analisis yang dilakukan meliputi kadar air<sup>26</sup>, asam lemak bebas (ALB)<sup>27</sup>, dan bilangan peroksida<sup>26</sup>, analisis GC-FID<sup>27</sup>. Enzim dilakukan karakterisasi terlebih dahulu dengan dilakukan pengukuran pH dan aw enzim<sup>28</sup>.

### 2. Optimasi Reaksi Esterifikasi Enzimatis Secara Kontinyu

Pada tahap ini dilakukan penelitian untuk mencari kondisi optimum proses esterifikasi yang dapat menghasilkan produk dengan komposisi MAG maksimum dimana asam lemak laurat dan gliserol direaksikan dalam tabung erlenmeyer sebanyak 1:5 (mol/mol substrat), ditambah campuran pelarut organik, kemudian diagitasi menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan 200 rpm. Reaksi dilakukan pada suhu 50° C. Setelah suhu reaksi yang diinginkan dalam *rotary shaker* tercapai, ditambahkan lipase dengan perbandingan 5% (w/w minyak). Reaksi dibiarkan berjalan hingga waktu tertentu. Kemudian produk dari enzim dipisahkan dengan cara disaring dan filtrat dievaporasi menggunakan *rotary vapor* untuk memisahkan dari pelarut. Setelah itu di fraksinasi 16-18 jam pada suhu 7° C. Pemisahan endapan yang merupakan produk hasil fraksinasi kemudian dilakukan dengan cara penyaringan (Gambar 1).

### 3. Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah *Central Composite Design*. Model permukaan respon digunakan untuk melihat pengaruh perlakuan waktu dan suhu reaksi terhadap rendemen produk dan komposisi MAG dalam produk. Titik tengah perancangan penelitian diambil dari suhu dan waktu reaksi pada hasil penelitian pendahuluan.

Model *Response Surface Methodology* atau RSM adalah kumpulan teknik matematika dan statistik yang digunakan untuk membentuk model dan menganalisis masalah dalam suatu respon yang dipengaruhi oleh beberapa peubah dan bertujuan untuk mengoptimisasi respon tersebut. RSM digunakan untuk mengetahui hubungan antara faktor percobaan dengan variabel respon. Berdasarkan hubungan tersebut dapat diperoleh nilai faktor percobaan yang akan menghasilkan nilai variabel respon yang dikehendaki. Seluruh perlakuan terdiri dari 13 set percobaan, dimana model umum rancangan percobaan yang digunakan adalah:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1, j=2}^{k-1, k} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

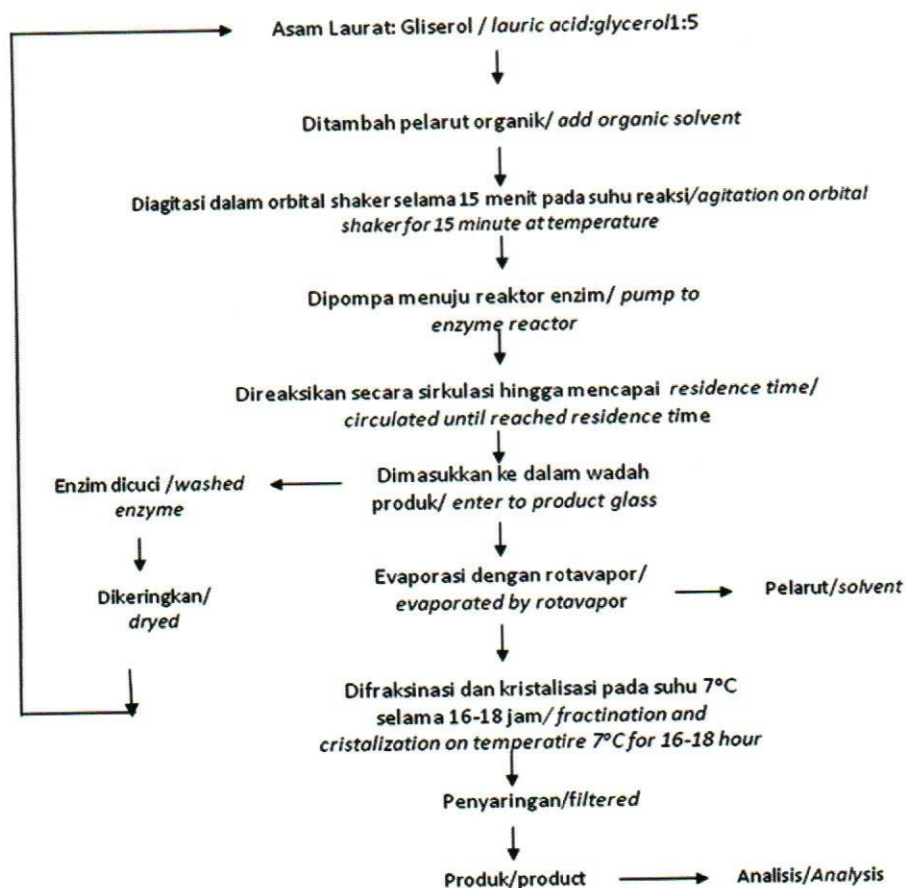
Keterangan:

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| Y            | = Respon Pengamatan            |
| $\beta_0$    | = Intercept                    |
| $\beta_i$    | = Pengaruh linier              |
| $\beta_{ii}$ | = Pengaruh kuadrat             |
| $\beta_{ij}$ | = Pengaruh interaksi percobaan |
| $X_i$        | = Kode untuk faktor ke-i       |
| $X_j$        | = Kode untuk faktor ke-j       |
| k            | = Jumlah faktor yang dicobakan |

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan *program SAS 9.1.3*

### 4. Validasi Kondisi Optimum Reaksi Esterifikasi Kontinyu

Tahap validasi merupakan tahap pengujian terhadap kondisi proses optimum yang terpilih. Validasi dilakukan dengan maksud untuk memperbaiki tingkat keyakinan bahwa berdasarkan kondisi optimum yang diasumsikan, model yang dikembangkan dapat mewakili sistem yang sebenarnya. Validasi dilakukan dengan cara mengaplikasikan kondisi proses tersebut sebanyak lima kali ulangan. Tujuan validasi adalah melihat konsistensi produk yang dihasilkan berdasarkan pada nilai CV (*Coefficient Varians*). Parameter yang dianalisis pada tahap validasi adalah komposisi MAG dan rendemen. Setelah validasi, produk MAG dianalisis meliputi bilangan Peroksida<sup>26</sup>, kadar asam lemak bebas (ALB)<sup>27</sup>, analisis kadar gliserol bebas<sup>27</sup>, analisis titik leleh<sup>29</sup>.



Gambar 1. Diagram alir optimasi pembuatan MAG dengan metode esterifikasi  
 Figure 1. Flow chart of synthesis optimization of MAG by esterification

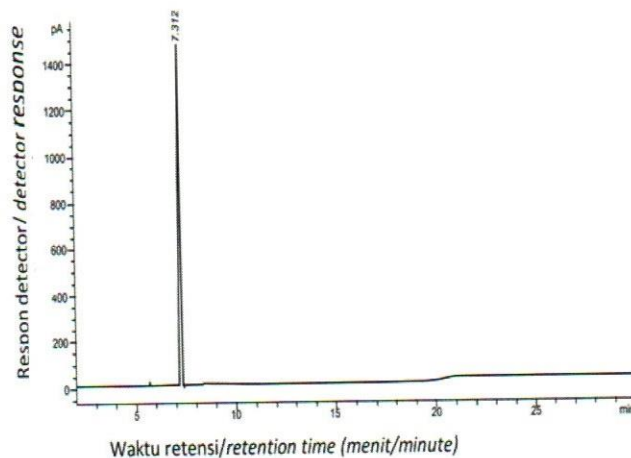
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Karakteristik Bahan Baku

Asam laurat yang digunakan dalam pembuatan monolaurin ini memiliki kadar air  $0,3369 \pm 0,017\%$  (bk). Kadar asam lemak bebas (ALB)  $98,9108 \pm 0,3389\%$ , bilangan peroksida  $1,226 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ . Syarat bilangan peroksida yang terdapat pada bahan baku lebih rendah dari  $10 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ <sup>30</sup>. Selain bahan baku asam laurat, katalis yaitu enzim Novozyme® 435 dianalisis pH dan  $a_w$ . Hasil pengukuran pH dan  $a_w$  berturut-turut adalah  $4,375 \pm 0,021$  dan  $0,62 \pm 0,004$  pada suhu  $29,5^\circ\text{C}$ . Lipase (*triasilgliserol ester hidrolase*, EC. 3.1.1.3) adalah enzim yang memiliki kemampuan mensintesis minyak atau lemak. Lipase juga mengkatalisis hidrolisis triasilgliserol pada interfase minyak dalam air dan akan membentuk ikatan ester pada lingkungan dengan kondisi sedikit air. Reaksi yang mungkin terjadi pada kondisi lingkungan tersebut adalah esterifikasi, transesterifikasi, polimerisasi, laktonisasi<sup>31</sup>.

Komposisi asam lemak bebas (ALB) dalam bahan baku asam laurat dapat diketahui pula kemurniannya dengan *gas chromatography* (GC). Asam laurat yang

digunakan sebagai bahan baku berdasarkan hasil kromatogram gas chromatography (GC) hanya menunjukkan satu puncak dengan waktu retensi 7,312 menit (Gambar 2), sehingga bahan baku asam laurat yang digunakan memiliki kemurnian tinggi.



Gambar 2. Kromatogram Gas Chromatography (GC) Asam Laurat  
 Figure 2. GC Chromatogram of lauric acid

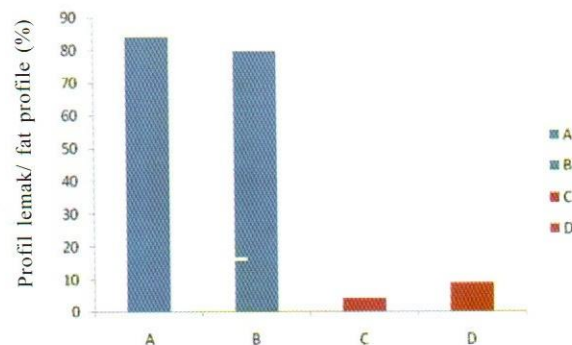
## B. Optimasi Reaksi Esterifikasi untuk Pembuatan Monoasilgliserol

Pada reaksi esterifikasi secara kontinyu ditentukan terlebih dahulu *residence time*. Esterifikasi kontinyu berlangsung secara sirkulasi dalam reaktor *packed bed*, dimana reaktor berisi substrat mengalir menuju reaktor enzim kemudian kembali ke reaktor substrat sampai waktu dan suhu reaksi tercapai. Waktu dimana molekul melalui reaktor enzim dengan kecepatan alir tertentu disebut *residence time*<sup>32</sup>. *Residence/Space time* analog dengan waktu reaksi pada sistem *batch* dan didefinisikan sebagai waktu yang diperlukan untuk mengolah reaktan sebanyak satu volume reaktor pada kondisi tertentu<sup>33</sup>. Pada penelitian ini *space time* yang didapatkan adalah 23,57 menit, dimana laju aliran substrat yang digunakan adalah 0,7 ml/menit. Reaktor *packed bed* dibuat berjaket dari bahan gelas dengan volume kerja 15 mililiter, kemudian berat enzim Novozyme® 435 sebanyak 4,6 gram.

Reaksi esterifikasi enzimatis secara kontinyu dengan komposisi molar substrat dan pelarut sama dengan penelitian pendahuluan, saat diujicobakan mengalami kendala karena gliserol tidak larut. Namun, uji coba reaksi esterifikasi sirkulasi tetap dilakukan walaupun gliserol tidak larut untuk mengetahui pengaruh terhadap komposisi monoasilgliserol (MAG). Setelah diagitasi 15 menit dalam *orbital shaker*, reaktan dimasukkan ke dalam reaktor wadah reaktan dan dialirkan menuju reaktor enzim melalui pompa peristaltik, lalu dilakukan *sampling* jam ke-2 dan ke-4. *Sampling* mulai dilakukan pada jam ke-2, karena setelah reaktor beroperasi selama 2 jam akan mencapai kondisi *steady state*<sup>34</sup> dan komposisi monoasilgliserol tinggi pada sistem tert butanol sekitar 60-70% diagitasi pada tangki setelah 2 jam reaksi berlangsung<sup>35</sup>.

Lipase menunjukkan stabilitas dan aktivitas yang baik pada pelarut hidrofobik dengan  $2 < \log P < 4$ , seperti n-hexane<sup>35</sup>, namun pada medium tersebut gliserol tidak larut. Gliserol sering mengikat partikel enzim, sehingga reaksi antara molekul asam laurat dengan enzim menjadi sulit<sup>24</sup>. Oleh karena itu dilakukan percobaan untuk melarutkan gliserol dalam reaktan dilakukan dengan tiga cara dan diperoleh komposisi pelarut terbaik yaitu dengan perbandingan pelarut organik 7:3 yang menghasilkan komposisi MAG diatas 80%.

Proses reaksi esterifikasi enzimatis secara kontinyu dilakukan dengan komposisi pelarut terbaik dan gliserol larut berdasarkan penelitian pendahuluan, yaitu: rasio jumlah substrat (1:5 mol/mol) dan rasio jumlah substrat dengan pelarut 1:8,8 (w/v). Hasil reaksi tersebut menunjukkan komposisi MAG pada *sampling* jam ke-2 dengan 2 siklus (A) sebesar 83,91% dan jam ke-4 dengan 4 siklus (B) sebesar 79,38%. Komposisi monoasilgliserol



Keterangan:

- A = Komposisi MAG pada sampling jam ke-2/MAG composition after 2 hours
- B = Komposisi MAG pada sampling jam ke-4/MAG composition after 4 hours
- C = Asam Lemak Bebas (ALB) pada sampling jam ke-2/FFA after 2 hours
- D = Asam Lemak Bebas (ALB) pada sampling jam ke-4/FFA after 4 hours

Gambar 3. Komposisi MAG dan asam lemak bebas pada sampling jam ke-2 (A) dan ke-4 (B) reaksi esterifikasi

Figure 3. MAG and free fatty acid (FFA) composition after 2 hours (A) and 4 hours (B) of esterification reaction

pada *sampling* jam ke-2 dan ke-4 lebih tinggi pada kondisi gliserol tercampur sempurna dalam reaktan (Gambar 3).

Berdasarkan komposisi MAG pada reaksi esterifikasi enzimatis pada *packed bed reactor* baik yang gliserol larut maupun tidak larut memiliki kesamaan yaitu *sampling* jam ke-2 tinggi sekitar 80%, kemudian reaksi setelah jam ke-4 nya menurun. Oleh karena itu waktu reaksi 2 jam menjadi titik tengah untuk optimasi reaksi, sedangkan suhu 50°C dipilih menjadi titik tengah dikarenakan beberapa penelitian sintesis MAG secara enzimatis terdahulu dilakukan pada suhu tersebut<sup>3,25,36,37</sup>. Suhu konstan selama proses selalu dijaga dengan menggunakan *circulated water bath* agar pengaruh suhu terhadap proses esterifikasi dapat diminimalkan. *Circulated water bath* akan memanaskan aliran air sesuai dengan suhu yang telah diatur. Aliran tersebut akan menuju ke wadah reaktan berjaket kemudian ke jaket reaktor enzim dan selanjutnya akan kembali ke *waterbath*. Jadi aliran air sebagai media pemanasan bersifat kontinyu dan tertutup.

Volume reaktan yang diujicobakan pada penelitian ini adalah 50 ml dan 100 ml. Percobaan dilakukan pada kondisi reaksi pada kedua volume reaktan adalah tetap. Berdasarkan hasil reaksi menunjukkan pada volume reaktan 50 ml menghasilkan komposisi MAG 81,12% dan rendemen 67,17%, sedangkan penggunaan volume reaktan 100 ml menghasilkan komposisi MAG 74,96%, DAG 1,84%, dan rendemen 77,9%. Berdasarkan hasil reaksi esterifikasi, maka tidak ada perbedaan yang nyata dari hasil kromatogram GC. Oleh karena itu untuk efisiensi biaya pelarut maka pada penelitian ini digunakan volume 50 ml.

### C. Optimasi Monoasilgliserol dengan Reaksi Esterifikasi

Hasil optimasi dengan 13 perlakuan pada reaktor *Packed bed* sirkulasi kemudian divisualisasi dengan RSM sehingga memperoleh persamaan kuadratik seperti tampak pada Tabel 1. Persamaan kuadratik hasil optimasi respon kadar MAG adalah  $Y = -61,700 + 6,088 x_1 + 3,259 x_2 - 0,065 x_1^2 + 0,017 x_1 x_2 - 1,792 x_2^2$  dengan nilai  $R^2$  adalah 54,08% dan karakteristik model adalah maksimum. Sedangkan, hasil optimasi respon rendemen memiliki persamaan  $Y = 48,859 + 4,639 x_1 - 120,524 x_2 - 0,104 x_1^2 + 3,340 x_1 x_2 - 9,271 x_2^2$  dengan nilai  $R^2$  adalah 71,37% dan karakteristik model adalah *saddle point*. Hal ini menunjukkan bahwa kadar MAG terpilih menjadi parameter respon utama dikarenakan memiliki karakteristik model maksimum.

Gambar 4 menunjukkan pengaruh suhu dan waktu reaksi terhadap respon kadar MAG. Berdasarkan Gambar tersebut sumbu Y (waktu reaksi) memiliki pengaruh lebih besar dalam meningkatkan MAG daripada kurva pada sumbu X (suhu reaksi). Hal ini dikarenakan rentang waktu reaksi lebih sempit daripada suhu. Pada sumbu Y tampak MAG akan mencapai maksimum pada waktu reaksi 1,1 jam, namun MAG akan semakin menurun dengan semakin

meningkatnya waktu lebih dari 1,1 jam. Pada sumbu X tampak bahwa MAG akan mencapai maksimum pada suhu reaksi 46,92°C, namun akan semakin menurun seiring dengan semakin meningkatnya suhu reaksi yang lebih dari 46,92°C. Hasil analisis kanonik menunjukkan bahwa MAG pada titik stasioner menunjukkan nilai maksimum yaitu sebesar 82,96%.

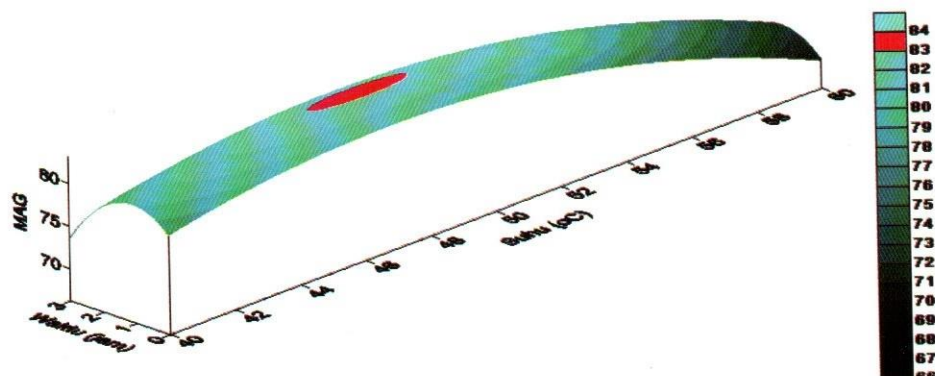
Validasi hasil optimasi dilakukan sebanyak lima kali ulangan terhadap kondisi optimum reaksi pembuatan monoasilgliserol dengan suhu 46,92°C ( $47 \pm 0,5$ )°C dan waktu 1,1 jam. Berdasarkan data hasil validasi, maka nilai kadar MAG yang dihasilkan sebesar  $83,15 \pm 3,51\%$ , nilai tersebut lebih tinggi dari prediksi nilai hasil analisis kanonik respon yaitu 82,96%. Kemudian rendemen yang diperoleh lebih tinggi dari hasil analisis kanonik rendemen yaitu sebesar  $81,09 \pm 2,99\%$ .

Nilai CV dari validasi kadar MAG dan rendemen berturut-turut adalah 4,25 dan 3,69. Keseluruhan CV hasil validasi dapat diterima karena kurang dari 15%. Patel *et al.*<sup>38</sup> melaporkan bahwa CV sangat bervariasi tergantung pada jenis percobaan, faktor dan karakter yang diukur. Kisaran CV yang dapat diterima adalah kurang dari 15% untuk berbagai percobaan.

Tabel 1. Karakteristik persamaan matematika berdasarkan *central composite design* dari *response surface method* (RSM) dan nilai prediksi optimum untuk parameter mutu produk

Table 1. Characteristics of equation based on *central composite design* (CCD) from *response surface methods* (RSM) and optimum prediction value for product quality

| Mutu Produk<br>Validasi<br>Verification<br>product quality | Persamaan kuadratik<br>Quadratic equation                                          | $R^2$  | Karakteristik<br>Model<br>Model<br>characteristic | Prediksi<br>Variabel<br>Optimum<br>Optimum<br>variable<br>prediction | Nilai Prediksi<br>Parameter<br>Maksimum<br>Maximum<br>prediction value |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Kadar MAG<br>(%)/<br>MAG content<br>(%)                    | $Y = -61,700 + 6,088 x_1 + 3,259 x_2 - 0,065 x_1^2 + 0,017 x_1 x_2 - 1,792 x_2^2$  | 0,5408 | Maximum                                           | Suhu 46,92 °C & waktu 1,1 jam.                                       | 82,96%                                                                 |
| Rendemen<br>(%)/<br>Yield (%)                              | $Y = 48,859 + 4,639 x_1 - 120,524 x_2 - 0,104 x_1^2 + 3,340 x_1 x_2 - 9,271 x_2^2$ | 0,7137 | Saddle Point                                      | Suhu 46 °C dan waktu 1,8 jam.                                        | 73,65%                                                                 |



Gambar 4. Respon permukaan tanggap tiga dimensi optimasi monoasilgliserol (MAG)  
Figure 4. Three dimensional (3D) response surface of optimization MAG

Tabel 2. Karakteristik produk MAG hasil penelitian dan komersial  
Table 2. Characteristics of produced MAG and commercial MAG

| Parameter/ Parameters                       | MAG hasil penelitian/<br>Produced MAG | MAG komersial/ Comercial<br>MAG <sup>b)</sup> |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Bilangan Asam/ Acid value                   | 1,78±0,08%.                           | Max 2%                                        |
| Bilangan Peroksida/ Peroxide value          | 0,49 ± 0,14 meq O <sub>2</sub> /kg    | -                                             |
| Kadar Gliserol Bebas/ Free glycerol content | 0,26 %                                | 2%                                            |
| Titik Leleh/ Melting point                  | 53-53,5 °C                            | -                                             |
| Komposisi Gliserida/ Glyceride composition  | 83,15% Monolaurin                     | Destilat monolaurin 75%                       |

#### D. Sifat Fisikokimia Produk Monoasilgliserol

Karakterisasi produk meliputi kadar asam lemak bebas, bilangan peroksida, kadar gliserol bebas, komposisi gliserida, dan titik leleh. Berdasarkan hasil analisis produk MAG hasil validasi memiliki kadar asam lemak bebas (ALB) 1,78±0,08%. Sedangkan pada produk komersial gliserol monolaurat yang berfungsi sebagai emulsifier memiliki kadar asam lemak bebas max 2%. Hal ini berarti produk MAG yang dihasilkan telah memenuhi spesifikasi MAG komersial lebih rendah dari 2% kadar ALB-nya.

Bilangan peroksida produk MAG yang dihasilkan adalah 0,49 ± 0,14 meq O<sub>2</sub>/kg produk MAG, nilai tersebut dapat dikatakan relatif kecil. Reaksi oksidasi kemungkinan terjadi dikarenakan suhu yang terlampaui tinggi pada saat evaporasi dan terdifusinya oksigen pada saat reaksi esterifikasi berjalan. Kadar gliserol bebas produk MAG adalah 0,26%. Nilai tersebut lebih rendah dari MAG komersial gliserol monolaurat yang memiliki kadar gliserol bebas 2%. Gliserol bebas berpengaruh terhadap titik asap minyak. Semakin tinggi titik asap maka minyak tersebut semakin baik. Gliserol bebas hadir karena proses reaksi esterifikasi yang tidak sempurna.

Kisaran titik leleh produk MAG adalah 53-53,5°C (Tabel 2). Perbedaan titik leleh disebabkan oleh adanya perbedaan jumlah ikatan hidrogen pada gugus karboksil serta interaksi hidrofobik di sepanjang rantai hidrokarbon masing-masing produk. Komposisi Gliserida produk MAG yang dihasilkan sebesar 83,15% adalah MAG dari asam laurat, sedangkan sisanya adalah DAG dan gliserol. Irimescu *et al.*<sup>39</sup> menunjukkan bahwa daerah isomer murni 2-monogliserida (98%) dapat diperoleh melalui etanolisis triasilgliserol menggunakan lipase Novozyme® 435 dengan pelarut polar (etanol), sedangkan reaksi esterifikasi kontinyu menggunakan Novozyme® 435 dengan pelarut organik menghasilkan lebih banyak fraksi 2-Monogliserida (96%). Komposisi MAG dapat lebih tinggi (>90%) jika dilakukan proses purifikasi.

#### KESIMPULAN

1. Kondisi optimum pembuatan MAG pada penelitian ini didapatkan dengan kondisi rasio asam lemak/gliserol

(1:5); volume pelarut 50 ml, rasio substrat/ pelarut (1:8,8), dan *residence time* 23,57 menit.

2. Hasil optimasi reaksi esterifikasi menggunakan permukaan respon tanggap menunjukkan persamaan kuadrat optimasi MAG adalah  $Y = -61,700 + 6,088 x_1 + 3,259 x_2 - 0,065 x_1^2 + 0,017 x_1 x_2 - 1,792 x_2^2$  dengan suhu dan waktu reaksi optimum adalah 46,92°C (47±0,5 °C) dan 1,1 jam.
3. Rendemen produk MAG hasil validasi sebesar 81,09±2,99% dengan komposisi MAG 83,15±3,51%

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Eckey SW. Vegetable fat and oil. Di dalam: Handbook of food agriculture. New York: Reinhold Publishing Corporation; 1995.
2. Mappiratu, Fardiaz D, Hasanuddin A. Produksi dan aplikasi produk monoasilgliserol dari minyak kelapa dalam pengolahan santan awet. J Teknol dan Industri Pangan. 2003; 14(3):223-240.
3. Chetpattananondh P, Tongurai C. Synthesis of high purity monoglycerides from glycerol and palm stearin. Songklanakarin J. Sci. Tech. 2008; 30(4):515-521.
4. Damstrup ML, Jensen T, Sparso FV, Kiil SZ, Jensen AD, Xu X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. JAOCS. 2005; 82:559-664.
5. Kovacs A, Schluter M, Easley K. Cytomegalovirus infection and HIV-1 disease progression in infants born to HIV-1 infected woman. New England Journal of Medicine. 1999; 341:77-84.
6. Mansour M, Milliere JB. An inhibitory synergistic effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus* sp. Vegetative cells in milk. Food Micro. 2001; 18:87-84.
7. Cotton LN, Marshall DL. Monolaurin preparation method affects activity against vegetative cells of *Bacillus cereus*. Journal of Food Science and Technology. 1997; 30:830-833.
8. Kabara JJ. Medium-chain fatty acids and esters. Di dalam : Alfred LB, Davidson PM, editor. Antimicrobials in foods. New York: Mercel Dekker Inc.; 1983.
9. Lieberman S, Enig MG, Preuss HG. A review of monolaurin and lauric acid natural virucidal and bactericidal agents. Alternative & complementary therapies. December 2006; 310-314.
10. Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrimsdottir O, Thormar H. In vitro killing of candida albicans by fatty acids and monoglycerides. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:3209-3212.

11. Sikes A, Ehioba R. Feasibility of using food-grade additives to control the growth of *Clostridium perfringens*. *Int. J. Food. Micro.* 1999; 46:179-185.
12. Vetter S, Tripp TJ, Schlievert PM. Glycerol monolaurate inhibits virulence factor production in *Bacillus anthracis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:1302-1305.
13. Ruzin A, Richard PN. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(9):2668-2671.
14. Schlievert PM, Strandberg KL, Brosnahan AJ, Peterson L, Pambuccian SE, Nephew KR, Brunner KG, Schultz-Darken NJ, Haase AT. Glycerol monolaurate does not alter rhesus macaque (*Macaca mulatta*) vaginal lactobacilli and is safe for chronic use. *Am. Soc. for Micro.* 2008; 52(12):4448-4454.
15. Carpo BG, Verallo-Rowell VM, Kabara J. Novel antibacterial activity of monolaurin compared with conventional antibiotics against organisms from skin infections: an in vitro study. *Journal of Drugs in Dermatology.* 2007; 6(10):991-998.
16. Schweiger ES, Weinberg JM. Novel antibacterial agents for skin and skin structure infections. *J Amer Acad Dermatol.* 2004; 3:331-340.
17. Abraham ER, Verallo-Rowell VM. Testing of lauricidin versus isopropyl alcohol for antisepsis of cutaneous hand microbes to prevent infection. *Philippine Journal of Microbiology and Infectious Disease.* 2000; 29:128-135.
18. Mc Neill PG, Borowitz D, Berger RR. Selective distribution of saturated fatty acids into monoglyceride fraction during enzymatic glycerolysis. *JAACS* 1992; 69:1098-1103.
19. Haryadi P. Katalis enzimatis dalam pelarut organik. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan.* 1996; 1(1):52-60.
20. Lorente GF, Terreni M, Mateo C, Bastida A, Lafuente RF, Dalmases P, Huguest J, Guisan JM. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme and Microbial Tech.* 2001; 28:389-396.
21. Yang Y, Vali SR, Ju Y. A process for synthesizing high purity monoglyceride. *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.* 2003; 34(6):617-623.
22. Nawani N, Rajvinder S, Jagdeep K. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotech.* 2006; 9(5):559-565.
23. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The real of microbial lipases in biotechnology. *biotechnol. Applm. Biochem.* 1999; 29:119-131.
24. Monteiro JB, Nascimento MG, Ninow JL. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogenous system. *Biotech. Letters.* 2003; 25:641-644.
25. Damstrup ML, Jensen T, Sparso FV, Kiil SZ, Jensen AD, Xu X. Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in tert-pentanol: process optimization by response surface methodology. *J.Am. Oil Chem. Soc.* 2006; 83:27-33.
26. Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> edition, 5<sup>th</sup> Revision, USA: AOAC Inc; 1995.
27. Official methods and recommended practices of the AOCS. USA: AOCS; 1998.
28. Agustini TW, Darmanto YS, Susanto E. Pshycocemical properties of some dried fish product in Indonesia. *Journal Of Coastal Development.* 2009; 12(2):73-80.
29. PORIM test methods. Malaysia: Palm Oil Research Institute of Malaysia. Ministry of Primary Industries; 2005.
30. De Greyt W, Huyghebaert A, Kellens M. Chemical and physicochemical modification of lipids. Dalam : Armand B, Christophe, editor. *Structural modified food fats : synthesis, biochemistry, and use.* Illionis: AOCS Press; 1997.
31. Divakar S, Manohar B. Use of lipases in the industrial production of esters. Di dalam: Polaina J, MacCabe AP, editor. *Industrial enzymes.* Netherlands: Springer; 2007. Hal 283-300.
32. Yang T, Rebsdorf M, Engelrud U, Xu X. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids trough an efficient glycerolysis system. *J. Agric and Food Chem.* 2005; 53:1475-1481.
33. Levenspiel. *Chemical reaction engineering* 2<sup>nd</sup> ed. New York : John Wiley and Sons; 1972.
34. Soekopitojo S. Produksi MAG kaya dha dari minyak ikan tuna secara alkoholisis enzimatis dalam reaktor *packed bed kontinyu* [Tesis]. Bogor: Pascasarjana Institut Pertanian Bogor; 2003.
35. Laane C, Boeren S, Vos K, Veegek C. Rules for optimization of biocatalyst in organic solvent. *Bioeng.* 1987; 42:953-962.
36. Nuraeni F. Sintesis mono-diasilgliserol (M-DAG) dari destilat asam lemak minyak sawit (dalms) melalui esterifikasi enzimatis [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor; 2008.
37. Watanabe T, Shimizu M, Sugiura M, Sato M, Kohorib J, Yamadab N, Nakanishic K. Optimization of reaction conditions for the production of dag using immobilized 1,3- regiospesific lipase lipozyme RM IM. *JAACS.* 2003; 80(12): 1201-1207.
38. Patel JK, Patel NM, Shiyani RL. Coefficient of variation in field experiments and yardstick there of- an empirical study. *Curr Sci.* 2001; 81(9):1163-1164.
39. Irimescu R, Iwasaki Y, Hou CT. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *JAACS.* 2002; 79(2):879-883.