

Hidrolisis Enzimatis Minyak Kelapa dengan Lipase dari *Rhizomucor miehei*

Enzymatic Hydrolysis of Coconut Oil using Lipase from Rhizomucor miehei

STEIVIE KAROUW, LINDA TRIVANA, RINDENGAN BARLINA DAN BUDI SANTOSA

Balai Penelitian Tanaman Palma
Jln. Mapanget Raya, PO Box 1004, Manado 95001
E-mail: steivie_karouw@yahoo.com

Diterima 11 Januari 2016 / Direvisi 28 Maret 2016 / Disetujui 30 Mei 2016

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu dan lama reaksi yang dapat menghasilkan asam lemak bebas (ALB) paling banyak pada proses hidrolisis minyak kelapa menggunakan biokatalis lipase dari *Rhizomucor miehei*. Hidrolisis dilakukan pada variasi suhu reaksi (35, 40, 45 dan 50°C) dan lama reaksi (6, 12, 18 dan 24 jam). Reaksi hidrolisis dilakukan dalam *shaker waterbath* dengan pH 7,0 dan konsentrasi enzim 2,5% dari berat substrat. Hasil hidrolisis dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan larutan pengembang campuran pelarut heksan:diethyl eter:asam asetat = 80:20:1 pada pelat silica gel F254, pelat aluminium 20 cm x 20 cm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil hidrolisis minyak kelapa teridentifikasi lima spot yaitu satu spot trigliserida pada bagian atas, 1 spot asam lemak bebas, dua spot digliserida dan satu spot monogliserida pada bagian bawah. Kondisi hidrolisis minyak kelapa dengan lipase dari *R. miehei* untuk menghasilkan asam lemak bebas tertinggi yaitu pada suhu 50°C selama 24 jam yaitu sebanyak 37,10%.

Kata kunci: Hidrolisis enzimatis, minyak kelapa, lipase, *Rhizomucor miehei*.

ABSTRACT

The objectives of the research was to find the temperature and time of enzymatic hydrolysis reaction of coconut oil by lipase from *Rhizomucor miehei* as biocatalyze which could produce the highest free fatty acids. Enzymatic hydrolysis reaction was held at various of reaction temperature (35, 40, 45 dan 50°C) and reaction duration (6, 12, 18 and 24 hours). Enzymatic hydrolysis reaction was carried out in waterbath shaker on pH of 7.0 and enzyme concentration of 2.5% based on substrate weight. The hydrolysis products were monitored using TLC using hexane:diethyl eter:acetic acid = 80:20:1 as developing solvent on silica gel F254, 20 cm x 20 cm aluminium plat. The results showed that hydrolyzed coconut oil contained 5 spots, they were identified as 1 spot of triglyceride at upper, 1 spot of free fatty acid, 2 spots of diglyceride at the middle and 1 spot monoglyceride at the bottom. The condition of enzymatic hydrolysis reaction produce the highest of free fatty acid (37.10%) at 50°C of temperature for 24 hours.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, coconut oil, lipase, *Rhizomucor miehei*.

PENDAHULUAN

Minyak kelapa memiliki keunikan tersendiri dibandingkan dengan minyak nabati lain, karena sebagian besar asam lemak yang terkandung di dalamnya adalah asam lemak rantai medium (ALRM). Berdasarkan panjang rantai atom karbonnya, maka asam laurat termasuk dalam kelompok ALRM. Asam laurat (C-12) merupakan komponen utama dalam minyak kelapa dapat mencapai 46,64 - 48,80% (Marina *et al.*, 2009; Rao dan Lokesh, 2003). Asam laurat dalam tubuh akan diubah menjadi monolaurin. Monolaurin bersifat antivirus, antibakteri dan antijamur. Penelitian terhadap pasien *Human Immunodeficiency Virus*

(HIV) menunjukkan bahwa pemberian monolaurin murni maupun minyak kelapa memberikan pengaruh positif terhadap penderita HIV (Enig, 1999). Asam laurat terbukti secara *in vitro* dan *in vivo* dapat digunakan sebagai antibiotik alami pada kulit yang terinfeksi *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Asam laurat memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dan terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Listeria monocytogenes* (Wang dan Johnson, 1992).

Asam Lemak Rantai Medium adalah asam lemak yang memiliki 6-12 atom karbon. Asam Lemak Rantai Medium dinyatakan oleh *Food and Drug Administration* sebagai makanan yang aman untuk dikonsumsi sejak tahun 1994 (Marten *et al.*,

2006). Produk pangan komersial tinggi ALRM antara lain Caprenin, Neobee dan Captex yang mengandung asam kaprat dan kaprilat (Akoh, 2002 dalam Akoh dan Min, 2002). Asam Lemak Rantai Medium telah digunakan sebagai sumber lemak untuk susu formula yang diproduksi oleh Mellin-Star Italia. Susu formula dengan merk dagang *Mellin O brand formula* tersebut mengandung ALRM sekitar 34,1% (Carnielli *et al.*, 1995). Asam Lemak Rantai Medium telah digunakan sebagai bahan formulasi makanan untuk pasien yang mengalami gangguan penyerapan, pasien pasca operasi dan orang lanjut usia (Marten *et al.*, 2006). Konsumsi ALRM terbukti dapat mencegah kegemukan karena dengan mengkonsumsi ALRM dapat menyebabkan rasa kenyang sehingga mengurangi nafsu makan (St-Onge dan Jones, 2002).

Proses sintesis untuk menghasilkan ALRM dari minyak kelapa melalui beberapa tahap reaksi, yaitu hidrolisis minyak untuk menghasilkan asam lemak bebas, pemisahan ALRM dari asam lemak jenuh rantai panjang dan asam lemak tak jenuh, serta reaksi re-esterifikasi asam lemak untuk menghasilkan ALRM. Proses hidrolisis dapat dilakukan secara enzimatis dan kimiawi. Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa kelebihan, yaitu suhu yang digunakan relatif rendah < 55°C, bahan kimia yang digunakan sedikit sehingga produk yang dihasilkan tidak berwarna, aman dikonsumsi dan proses katalisis enzimatis bersifat regiospesifik (Mer *et al.*, 2000). Karouw *et al.* (2013) melaporkan proses hidrolisis trigliserida (stearin sawit) menggunakan lipase dari *Rhizomucor miehei*. Hidrolisis dilakukan pada suhu yang relatif rendah, yaitu 37°C dan lama reaksi 24 jam, dihasilkan asam lemak bebas sekitar 30%. Hidrolisis minyak ikan pada suhu reaksi 35°C dengan lipase dari *Candida cylindracea* dan *Candida rugosa* sebagai biokatalis menghasilkan asam lemak bebas 36,3% (Sharma *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu dan lama reaksi yang dapat menghasilkan asam lemak bebas paling banyak pada proses hidrolisis minyak kelapa menggunakan lipase dari *Rhizomucor miehei* sebagai biokatalis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai November 2015. Hidrolisis minyak kelapa dan analisis kualitatif dikerjakan di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Palma Manado. Analisis kuantitatif dilakukan di Laboratorium Pengolahan

Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu minyak kelapa yang diproses dari buah kelapa Dalam Mapanget, lipase dari *Rhizomucor miehei* sebagai biokatalis dan silica gel F₂₅₄. Bahan-bahan kimia yang digunakan, yaitu Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·H₂O, heksan, asam asetat dan dietil eter.

Prosedur hidrolisis minyak kelapa pada variasi suhu reaksi

Minyak kelapa sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7,0. Enzim yang ditambahkan sebanyak 2,5% dari berat substrat. Reaksi hidrolisis berlangsung dalam *waterbath shaker* selama 6 jam. Suhu reaksi divariasikan pada suhu 35, 40, 45 dan 50°C. Hasil reaksi dipisahkan dari enzim dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring. Residu yang diperoleh diidentifikasi secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan secara kuantitatif dengan *Camag TLC (Thin Layer Chromatography) scanner*.

Prosedur hidrolisis minyak kelapa pada variasi lama reaksi

Minyak kelapa sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7,0. Enzim yang digunakan sebanyak 2,5% dari berat substrat. Reaksi hidrolisis berlangsung dalam *waterbath shaker* pada suhu terbaik hasil optimasi tahap sebelumnya. Lama reaksi divariasikan yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam. Hasil reaksi dipisahkan dari enzim dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring. Residu yang diperoleh diidentifikasi secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan secara kuantitatif dengan *Camag TLC scanner*.

Analisis hasil hidrolisis

Identifikasi profil gliserida hasil pemurnian mengacu pada Subroto *et al.* (2008) dan Djarkasi (2009). Analisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat silika gel F254 berukuran 20 cm x 20 cm sebagai fase stasioner. Fase mobil digunakan campuran pelarut heksan, dietil eter, asam asetat dengan perbandingan 80:20:1 (v/v) sesuai yang dilaporkan oleh Trivana dan Karouw (2015). Pelat diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 60 menit. Pelat diberi tanda tiga cm pada bagian bawah dan dua cm pada bagian atas. Sampel ditetes menggunakan mikropipet pada

bagian bawah pelat yang telah ditandai kemudian dikering angin. Pelat dimasukkan ke dalam tabung pengembang KLT sampai pelarut mencapai bagian atas kemudian pelat diangkat dan dikering angin. Spot atau noda yang terbentuk divisualisasi dengan uap kristal iod. Identifikasi spot dilakukan dengan menghitung nilai *Retention factor* (Rf) masing-masing spot dan dibandingkan dengan Rf standar dari hasil-hasil penelitian sebelumnya. Hasil pengembangan dilanjutkan dengan analisis secara kuantitatif menggunakan *Camag TLC (Thin Layer Chromatography) Scanner*.

Analisis data

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan tahap pertama adalah variasi suhu reaksi, yaitu suhu 35, 40, 45 dan 50°C selama 6 jam. Suhu reaksi yang menghasilkan asam lemak bebas paling banyak, selanjutnya digunakan pada tahap kedua. Perlakuan tahap kedua adalah variasi lama reaksi, yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 12 satuan percobaan pada masing-masing tahap reaksi.

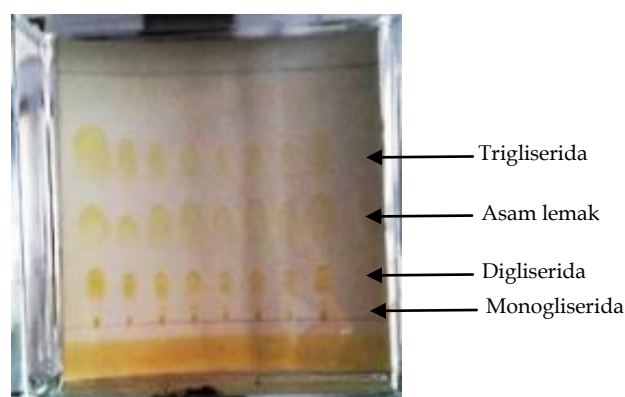
Peubah yang diamati, yaitu trigliserida, digliserida, monogliserida dan asam lemak bebas. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Program SPSS, apabila terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis kualitatif

Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan bahwa, hasil hidrolisis minyak kelapa terdiri atas lima spot (Gambar 1). Lima spot tersebut teridentifikasi, yaitu satu spot trigliserida pada bagian atas, satu spot asam lemak bebas, dua spot digliserida dan satu spot monogliserida pada bagian bawah. Hasil identifikasi hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Karouw (2013) pada hidrolisis stearin sawit menggunakan lipase pankreas sebagai biokatalis menghasilkan lima spot. Jumlah spot yang sama tersebut, karena lipase dari *R. miehei* dalam hidrolisis enzimatis minyak kelapa dalam penelitian ini dan lipase pankreas yang digunakan dalam hidrolisis stearin sawit memiliki kemampuan regiospesifik yang sama. Keduanya merupakan enzim yang spesifik untuk mengkatalisis posisi *sn*-1 dan 3 dari trigliserida. Nilai Rf monogliserida sebesar 0,026 dibanding penelitian Karouw (2013) mencapai

0,054. Hal ini antara lain disebabkan oleh perbedaan substrat yang digunakan. Substrat minyak kelapa, komponen utamanya adalah asam lemak jenuh rantai medium, sedangkan substrat stearin sawit komponen dominannya adalah asam lemak jenuh rantai panjang. Asam lemak jenuh rantai medium bersifat lebih polar dibandingkan dengan asam lemak jenuh rantai panjang. Asam lemak jenuh rantai medium diduga lebih kuat diadsorpsi pada adsorben dibandingkan asam lemak jenuh rantai panjang. Arindah (2010) mengemukakan bahwa suatu senyawa memiliki Rf yang kecil apabila makin kuat diadsorpsi oleh fase diam dan makin kurang larut pada eluen. Kondisi sebaliknya nilai Rf senyawa akan lebih besar apabila senyawa makin lemah diadsorpsi pada adsorben dan makin larut pada eluen yang digunakan.



Gambar 1. Kromatogram hasil pengujian dengan KLT menggunakan fase stasioner pelat silika gel F₂₅₄ dengan pelarut heksan : dietileter : asam asetat = 80:20:1

Figure 1. Resulted chromatogram analyzed by TLC on silica gel F₂₅₄ plate, developed in hexane:diethyl ether:acetic acid=80:20:1

Hasil hidrolisis pada variasi suhu reaksi

Proporsi gliserida yang dihasilkan melalui reaksi enzimatis pada variasi suhu reaksi disajikan pada Tabel 1. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa proporsi asam lemak bebas meningkat dengan meningkatnya suhu reaksi (dari suhu reaksi 35-45°C ke 50°C). Hasil yang diperoleh sejalan dengan penelitian sebelumnya, yaitu kondisi optimum untuk aktivitas lipase dari *R. miehei* pada kisaran suhu 50 - 60°C (Ilyasoglu et al., 2011; Kim et al., 2004; Maduko et al., 2008; Mu et al., 1998; Sahin et al., 2006). Peningkatan suhu reaksi pada kondisi air berlebih akan meningkatkan asam lemak bebas yang dihasilkan. Apabila telah melewati suhu optimum enzim, maka asam lemak

bebas yang dihasilkan akan menurun. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka untuk tahap selanjutnya akan dilakukan hidrolisis pada suhu 50°C.

Tabel 1. Profil gliserida dan asam lemak bebas hasil hidrolisis enzimatis pada variasi suhu reaksi.

Table 1. Glyceride profile and free fatty acid content of enzymatic hydrolysis products on various of temperature reaction.

Suhu reaksi (°C) Temperature reaction (°C)	Gliserida (%) Glyceride (%)			
	MG	DG	ALB	TG
35	11,15 a	35,03 c	32,88 a	19,08 a
40	24,12 b	28,49 b	31,53 a	15,86 a
45	23,04 b	28,83 b	33,28 a	14,86 a
50	22,69 b	19,38 a	39,99 b	18,00 a

Keterangan: MG = monogliserida; DG= digliserida; ALB= asam lemak bebas; TG= trigliserida

Angka yang diikuti oleh huruf berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata pada taraf 5% dengan uji DMRT.

Note: MG= monoglyceride; DG= diglyceride; FFA= free fatty acid; TG= triglyceride

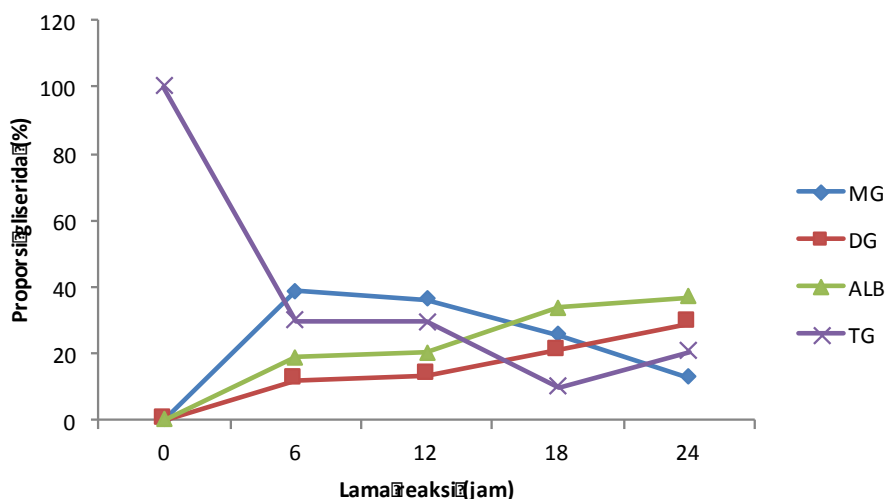
Numbers followed by the different letter at the same column are significantly difference at 5% of DMRT.

Hasil hidrolisis pada variasi lama reaksi

Proporsi gliserida hasil hidrolisis enzimatis dengan lipase dari *R. miehei* pada variasi waktu reaksi disajikan dalam Gambar 1. Pada awal

reaksi (0 jam) komponen utama adalah trigliserida yang terdeteksi dengan KLT scanner mencapai 100%. Kondisi ini sama dengan yang dilaporkan oleh Martati *et al.* (1999), yaitu pada analisis minyak hati ikan cod menggunakan KLT. Pada hidrolisis selama 6 jam trigliserida menurun sangat tajam, lalu cenderung menurun sedikit sampai hidrolisis selama 18 jam, kemudian meningkat setelah 18 jam. Monogliserida meningkat sampai 6 jam reaksi kemudian menurun, sedangkan digliserida meningkat sampai 24 jam reaksi. Asam lemak bebas sedikit meningkat pada tahap awal reaksi (6 sampai 12 jam), selanjutnya meningkat secara nyata setelah 12 - 24 jam. Pada 18 - 24 jam reaksi, terlihat bahwa asam lemak bebas yang dihasilkan meningkat dari 33,72% menjadi 37,10%.

Pada 6 jam pertama lipase dari *R. miehei* menunjukkan kecepatan pemotongan trigliserida menjadi digliserida yang tinggi dan terlihat pada penurunan trigliserida yang tajam. Digliserida dan asam lemak bebas masih menunjukkan peningkatan sampai 24 jam reaksi. Kondisi ini mengindikasikan bahwa masih terus terjadi pemotongan trigliserida menjadi digliserida dan asam



Keterangan: MG= monogliserida; DG= digliserida; ALB= asam lemak bebas; TG= trigliserida

Note: MG= monoglyceride; DG= diglyceride; FFA= free fatty acid; TG= triglyceride

Gambar 1. Proporsi gliserida dan asam lemak bebas yang dihasilkan melalui reaksi hidrolisis enzimatis VCO dengan lipase dari *R. miehei* pada variasi waktu reaksi

Figure 2. Glyceride profile and free fatty acid content during enzymatic hydrolysis of VCO by lipase from *R. miehei* on various of reaction time

lemak bebas. Apabila reaksi terus dilanjutkan maka kemungkinan masih terjadi pemotongan trigliserida. Berdasarkan hasil penelitian ini, maka reaksi enzimatis yang terbaik untuk menghasilkan asam lemak bebas paling banyak, yaitu pada suhu 50°C selama 24 jam.

KESIMPULAN

Hasil hidrolisis minyak kelapa teridentifikasi lima spot, yaitu satu spot trigliserida pada bagian atas, satu spot asam lemak bebas, dua spot digliserida dan satu spot monogliserida pada bagian bawah. Kondisi hidrolisis minyak kelapa dengan biokatalis lipase dari *R. miehei* untuk menghasilkan asam lemak bebas tertinggi (37,10%), yaitu pada suhu 50°C selama 24 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Maria Luang Kapu'Allo atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Akoh, C.C. dan Min, D.B. Editor: Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Second edition, Revised Expanded. Marcel Dekker, New York, Basel. p 877-908.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan identifikasi golongan senyawa pada daging buah pepino (*Solanum muricatum* Aiton) yang berpotensi sebagai antioksidan. [Skripsi]. Universitas Islam Negeri. Malang.
- Carnielli, V.P., Rossi, K., Badon, T., Gregori, B., Verlato, G., Arzali, A. dan Zacchello, F. 1995. Medium-chain triacylglycerols in formulas for preterm infants: effect on plasma lipids, circulating concentrations of medium-chain fatty acids, and essential fatty acids. The American Journal of Clinical Nutrition 64(2): 152-158.
- Djarkasi, G.S.S. 2009. Karakterisasi dan stabilitas oksidatif minyak biji kenari. [Disertasi]. Sekolah Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Enig, M. E. 1999. "Coconut : In Support of Good Health in the 21st Century", Paper presented on APPC'S XXXVI session and 30th Anniversarry in Pohnpei. Federated States of Micronesia.
- Ilyasoglu, H., Gultekin-Ozguven, M. and Pzcelik, B. 2011. Production of human milk fat substitute with medium chain fatty acids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization by response surface methodology. LWT-Food Science and Technology. 44: 999-1004.
- Karouw, S., Suparmo, Hastuti, P. dan Utami, T. 2013. Hidrolisis enzimatis stearin sawit menjadi monogliserida oleh lipase dari *Rhizomucor miehei* dan pankreas. Agritech Jurnal Teknologi Pertanian. 33(1): 53-59.
- Kim, I.H, Ko, S.N, Lee, S.M., Chung, S.H., Kim, H., Lee, K.T. and Ha, T.Y. 2004. Production of structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis in supercritical carbon dioxide : effect on acyl migration. J Am Oil Chem Soc 81(6): 537-541.
- Maduko, C.O., Y.W. Park dan C.C. Akoh. 2008. Characterization and oxidative stability of structured lipid : infant milk fat analog. J of American. Oil Chem. Soc. 85:197-204.
- Marina, A.M., Che Man, Y.B. dan Nazimah, S.A.H. 2009. "Chemical Properties of Virgin Coconut Oil". Journal of the American Oil Chemists' Society 86: 301-307.
- Martati, E., Utami, T. dan Hastuti, P. 1999. Profil gliserida dan kandungan EPA (eicosapentaenoat) dan DHA (docosaheksaenoat) hasil hidrolisis minyak hati ikan cod oleh lipase teramobil dari *Mucor miehei*. Agritech 19(1); 5-10.
- Marten, B., Pfeuffer, M. dan Schrezenmeir, J. 2006. Medium-Chain Triglycerides: Review. International Dairy Journal 16: 1374-1382.
- Mer, F., Sant Anna Jr, G.L. dan Nobrega, R. 2000. Enzyme hydrolysis of babassu oil in a membrane bioreactor. Journal of

- the American Oil Chemists' Society 77(10): 1043-1048.
- Mu, H., Xu, X. and Hoy, C.E. 1998. Production of Specified-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. *J Am Oil Chem Soc* 75(9): 1187-1193.
- Rao, R. dan Lokesh, B.R. 2003. Nutritional Evaluation of Structured Lipid Containing Omega 6 Fatty Acid Synthesized from Coconut Oil in Rats. *Molecular and Cellular Biochem.* 248 : 25-33.
- Sahin, N., Akoh, C.C. and Karaali, A. 2006. Human milk fat substitute containing omega 3 fatty acids. *Journal of Agric. Food Chem* 54: 3717-3722.
- Sharma, A., Chaurasia, S.P. dan Dalai, A.K. 2013. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acid production. *Catalysis Today* 207: 93- 100.
- Subroto, E., C. Hidayat dan Supriyadi. 2008. Enzymatic interesterification of fish oil with lauric acid for synthesis of structured lipid. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* XIX(2): 105-112.
- St-Onge, M.P. dan Peter J.H. 2002. Physiological effect of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *The Journal of Nutrition* 132(3): 329-332.
- Wang, L.L. dan Johnson, E.A. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 624-629.