

BIOKATALIS LIPASE RHIZOPUS ORYZAE PADA REAKSI TRANSESTERIFIKASI LIPID TERSTRUKTUR KAYA ASAM LEMAK OMEGA -3

Wahyuningsih¹, Edy Supriyo², R. TD. Wisnu Broto³

PSD III Teknik Kimia, Fak. Teknik, Undip, Jl Prof Sudharto SH, Semarang 50275, Indonesia
wahyunimachin@gmail.com, edyspy2000@yahoo.co.id, vieshnoe@gmail.com

Abstrak

Immobilisasi merupakan teknik recovery enzim yang menjadi perhatian dalam beberapa tahun belakangan, dilakukan dengan bantuan support sebagai media yang dapat mencegah terlarutnya enzim. Metode immobilisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode adsorpsi, dengan menggunakan lipase rhizopus oryzae, reaksi yang diamati adalah reaksi transesterifikasi Lipid Terstruktur kaya omega-3. Tujuan Penelitian ini adalah, mengkaji teknik immobilisasi enzim lipase dengan bantuan support dengan melakukan pengamatan teknik adsorpsi fisik dan mengembangkan penggunaan enzim lipase Rhizopus oryzae immobile sebagai biokatalisator untuk reaksi transesterifikasi minyak ikan tuna. Optimalisasi kondisi operasi proses terhadap produktifitas lipid terstruktur kaya asam lemak omega-3, dengan kajian kecepatan reaksi. Tujuan utama dilakukan immobilisasi enzim adalah untuk melihat apakah enzim tersebut dapat digunakan kembali dalam reaksi selanjutnya (reuse). Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimum reaksi pada suhu 50°C, pH lipase 8 perbandingan ratio substrat (Minyak ikan tuna : asam laurat) 1:10 selama 6 jam. Profil gliserida dari hasil asidolisis enzimatis adalah 78,1 % trigliserida, 32,2 % Digliserida dan 11,9% Monogliserida. Inkoorporasi asam laurat mencapai 62,8 mol %. Pada waktu inkubasi 12 jam, trigliserida menurun seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi, sedangkan digliserida meningkat seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Pada suhu reaksi di atas 50°C, trigliserida menurun seiring dengan meningkatnya suhu reaksi. Metode interesterifikasi ini cukup efektif untuk mensintesis lipid terstruktur spesifik.

Kata kunci: Lipid terstruktur, immobilisasi lipase, minyak ikan tuna

Abstract

Immobilization of an enzyme recovery techniques are a concern in recent years, carried out with the help of support as a medium that can prevent the dissolution of enzim. Method immobilization used in this study is the adsorption method, using rhizopus oryzae lipase, a reaction observed was a reaction transesterifikasi. Structured Lipids rich in omega-3 the aim of this study is, reviewing techniques immobilization of lipase with the assistance of support by observing techniques physical adsorption and develop the use of lipase Rhizopus oryzae immobile as biokatalisator for the transesterification reaction tuna fish oil optimization of operating conditions of the process to the productivity of structured lipids rich in fatty acids omega-3, with an assessment of the speed of the main reaction. Purpose do immobilisation of enzymes is to see whether the enzyme can be reused in a subsequent reaction (reuse) the results of the research showed the optimum reaction conditions at 50 ° C, pH 8 comparisons ratio lipase substrate (tuna fish oil : lauric acid) 1:10 for 6 hours. Profil gliseride result is 78.1% asidolisis enzymatic triglycerides, 32.2% and 11.9% diglycerides Monogliserida. Inkoorporasi lauric acid reached 62.8 mol%. %. At the 12 hour incubation period, triglyceride decreases with increasing time of incubation, whereas diglycerides increased with increasing incubation time. At reaction temperatures above 50° C, triglycerides decreased with increasing reaction temperature. Interesterification method is quite effective to synthesize specific structured lipids.

Keywords: structured lipids, immobilization of lipases, tuna fish oil

PENDAHULUAN

Lipase merupakan enzim yang memiliki peran penting dalam bioteknologi modern. Banyak industri yang telah mengaplikasikan penggunaan enzim sebagai biokatalis.

Lipase terkenal memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis, esterifikasi dan transesterifikasi (asidolisis), alkoholisis dan aminolisis *candida* dan *Rhizopus* yang merupakan organisme yang paling sering dipakai sebagai sumber sintesis penghasil lipase

(Jeyarani, 2010). Enzim lipase yang diamati berasal dari sekresi mikroba *rhizopus oryzae* yaitu lipase yang bereaksi secara spesifik memutus rantai *fatty acid* trigliserol pada posisi sn 1 dan sn 3, sering disebut dengan *lipase spesifik region 1,3* (Irimescu, 2000). Harga lipase komersial biasanya sangat tinggi (Rp 4 juta/ 100 mg) karena proses produksinya yang sulit dan memakan waktu. Selain itu, dalam proses reaksi enzimatis, lipase tidak dapat digunakan kembali karena terlarut dalam media reaksi (Greyt, 2004). Hal ini menyebabkan biaya reaksi yang dikatalisis lipase menjadi meningkat. Perlu adanya penelitian tentang teknik penggunaan kembali lipase, salah satunya adalah teknik reaksi immobilisasi dengan bantuan *support* sebagai media pembantu yang dapat menahan enzim dalam struktur molekulnya, diharapkan enzim dapat digunakan kembali sehingga biaya produksi reaksi enzimatis dapat ditekan (Akoh, 2002)

Perlu dilakukan studi lebih lanjut untuk melakukan immobilisasi enzim untuk berbagai reaksi enzimatis. Efektivitas reaksi immobilisasi dilihat dengan menggunakan reaksi asidolisis (Gandi, 2007). Pengamatan yang harus dilakukan adalah pemilihan *support* berdasarkan kemampuan bahan dalam membantu suatu reaksi enzimatis, dilihat dari konsentrasi enzim yang dapat terserap oleh *support*. Reaksi transesterifikasi diamati sebagai reaksi dasar dalam melakukan reaksi dan dapat menghasilkan konversi yang baik (Greyt, 2004).

Sebelum melakukan immobilisasi, enzim lipase akan dikarakterisasi terlebih dahulu, dalam hubungannya dengan aktivitas enzimatis persatuan waktu (*biochemical engineering and biotechnology handbook*). Pengamatan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi lipase yang optimal, kondisi temperatur yang optimal dalam reaksi transesterifikasi, dan pengujian stabilitas enzim pada *support* yang ditunjukkan dengan penggunaan kembali lipase *terimmobilisasi* untuk reaksi. Dari hasil pengamatan ini, akan dibuat pemodelan matematika sederhana untuk menggambarkan reaksi hidrolisis enzimatis lipase.

METODE PENELITIAN

Karakterisasi Minyak ikan

Karakterisasi minyak ikan meliputi beberapa sifat fisik dan kimianya, yaitu kadar air dan senyawa volatil (AOCS, 1989), angka asam dan asam lemak bebas (AOCS, 1989), angka penyabunan (AOCS, 1989), Angka peroksida

(FAO, 2001), komposisi gliserida (Probondari, 2007), dan berat molekul rata-rata.

Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai pH lipase terimmobilisasi

Interesterifikasi dilakukan pada berbagai pH lipase terimmobilisasi (4-9) untuk mengetahui pH lipase terimmobilisasi terhadap efisiensi inkorporasi dan profil gliserida yang diperoleh. Reaksi dilakukan dalam Erlenmeyer tertutup yang diinkubasi dalam waterbath shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 40°C selama 12 jam. Hasil reaksi selanjutnya diperlakukan seperti pada prosedur transesterifikasi enzimatis pada berbagai suhu reaksi. Untuk mengetahui tingkat keasaman substrat dilakukan pengukuran pH dengan pH meter

Preparasi FAME (Park dan Goins, 1994) dan analisis dengan gas chromatography untuk menentukan inkorporasi asam laurat

Sebanyak 200 µl lipid terstruktur dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 50µl (konsentrasi 0,1 g/ml) internal standar asam heptadekanoat, 100µl metilen klorida dan 1ml NaOH 0,5 N dalam metanol. Ke dalam tabung diberi gas nitrogen sebelum dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit. Setelah dingin ditambah 1ml BF₃ 14% dalam metanol, kemudian dipanaskan lagi selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 1ml aquades dan 200-500 µl heksana dan divorteks untuk mengekstrak metil ester asam lemak. Fraksi heksana merupakan FAME dan siap untuk dianalisis dengan GC.

Kromatografi gas (GC) yang digunakan dilengkapi dengan kolom HP 5 (5% Phenyl Methyl Siloxone) panjang 30m. Temperatur kolom mula-mula 180°C ditahan selama 2 menit kemudian dinaikkan 10°C/menit sampai suhu mencapai 280°C. Temperatur injektor 280°C dan detektor yang digunakan adalah FID dengan suhu 300°C. Gas Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan aliran 10 mL/menit.

Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai suhu reaksi

Waktu reaksi yang optimal kemudian digunakan untuk mengkaji pengaruh suhu reaksi dengan variasi suhu 30, 40, 50, 60,70 dan 80°C. Sebanyak 1,43 gram minyak ikan dicampur dengan 4 gram asam laurat (rasio molar minyak ikan : asam laurat 1:10) dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan lipase 0,543 gram *rhizopus oryzae* (10% dari substrat) dan 8,1 mL heksana (1,5 kali berat substrat). Erlenmeyer ditutup rapat lalu

diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu bervariasi dengan kecepatan 120 rpm selama 12 jam. Setelah direaksikan selama 12 jam, campuran hasil reaksi selanjutnya diperlakukan seperti pada prosedur transesterifikasi enzimatis pada berbagai waktu reaksi

Pada percobaan ini, dijalankan dengan ratio minyak kelapa sawit dan minyak ikan tuna sebesar 30 – 60 % w/w. Transesterifikasi enzimatis ini, dilakukan dalam bioreaktor enzimatis pada berbagai variabel proses yang telah ditentukan.

Prosedur percobaan dilakukan dengan cara mengamati kandungan asam lemak setiap 30 menit. Pengamatan ini akan dilakukan selama beberapa hari sampai kemampuan enzim lipase menurun untuk transesterifikasi trigliserida. Pada percobaan ini juga dibandingkan pengaruh pH, suhu dan waktu reaksi

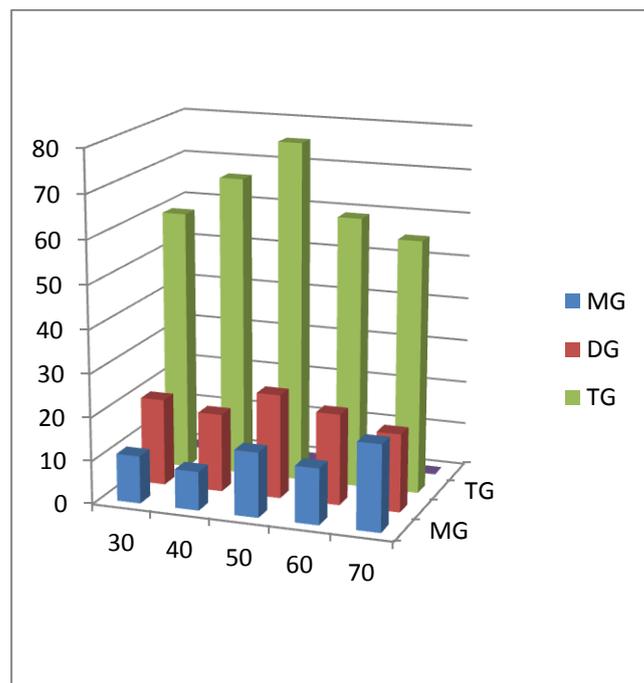
HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi minyak ikan tuna dilakukan untuk mengetahui komposisi dan kondisi minyak ikan tuna yang digunakan untuk sintesa Lipid Terstruktur. Hasilnya terlihat pada Tabel 1. Kadar air minyak ikan tuna sangat rendah (0,05%). Hal ini sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh FAO/WHO/CAC/RS 19-1981 rev (1989) yaitu sebesar 0,2%. Kadar air yang tinggi akan menyebabkan penurunan kualitas minyak ikan tuna yang disebabkan oleh hidrolisis asam lemak bebas dari kerangka gliserida selama penyimpanan. Biasanya kadar air tidak berubah selama penyimpanan

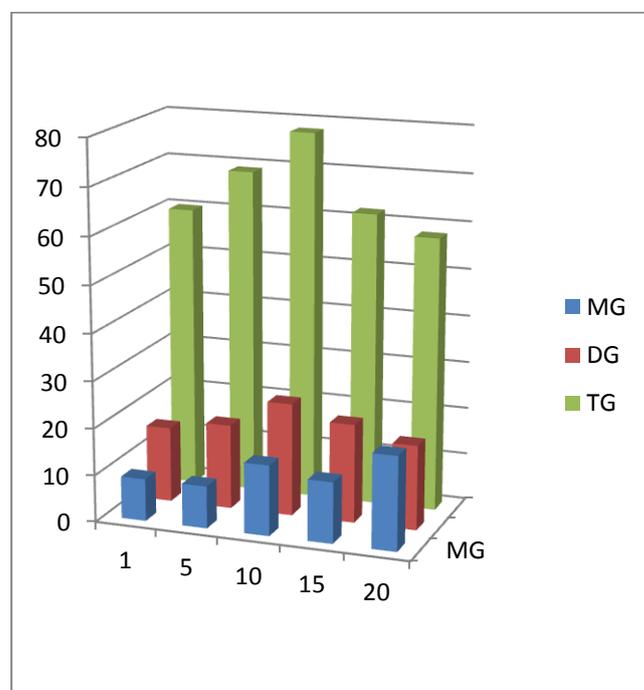
Angka asam dan asam lemak bebas dari minyak ikan tuna berdasarkan EPA sebagai penyusun asam lemak yang dominan adalah masing-masing 1,06 dan 0,55%. Berdasarkan FAO/WHO/CAC/RS (9-198) rev.1.(1989), angka asam minyak ikan lebih tinggi dibandingkan dengan standar yang ditentukan untuk minyak ikan (0,6). Untuk angka saponifikasi ditentukan berdasarkan jumlah mg KOH yang dibutuhkan untuk saponifikasi 1 g minyak atau lemak. Angka saponifikasi dapat mengindikasikan rata-rata BM lemak atau minyak (Akoh, 2002).

Gliserida minyak ikan yang digunakan ternyata tidak semuanya berupa trigliserida (hanya 70,40%), sedangkan sisanya berupa monogliserida dan digliserida. Hal ini sebenarnya tidak dikehendaki untuk keperluan reaksi transesterifikasi karena kerangka gliserol minyak ikan terkandung beberapa gugus OH dan gugus ini dapat mengalami reaksi

transesterifikasi dengan asam laurat bebas yang menghasilkan air.



Gambar 1. Profil gliserida lipid terstruktur akibat pengaruh suhu reaksi, grafik garis dan blok



Gambar 2. Profil gliserida lipid terstruktur karena pengaruh pH lipase, grafik blok

Gambar 1 secara umum menunjukkan bahwa pada suhu diatas 50°C komponen trigliserida menurun dengan naiknya suhu reaksi. Penurunan tersebut menandakan terjadinya esterifikasi partial komponen trigliserida menghasilkan produk antara digliserida dan monogliserida

Hal tersebut mungkin disebabkan oleh terjadinya migrasi gugus asil yang menyebabkan reaksi asidolisis tidak sempurna (Pandey, 2009).

Migrasi asil merupakan berpindahnya asil dari trigliserida dari posisi Sn 2 ke posisi sn-1 atau sn-3. Berpindahnya asil tersebut dapat menyebabkan posisi sn-2 kosong sehingga terbentuk digliserida ataupun monogliserida.

Migrasi asil dapat dipicu oleh tingginya suhu reaksi, kadar air, dan ratio substrat.

Selanjutnya juga diketahui bahwa suhu reaksi dan waktu reaksi memicu terbentuknya 1,3-diasilgliserol lebuah besar dari pada 1,2 diasilgliserol (Pandey, 2009).

Dengan terbentuknya 3-diasilgliserol maka lipase spesifik 1,3 dari *Rhizopus oryzae* tentu tidak dapat atau sulit untuk mengkatalis asidolisis pada posisi sn-2. Dengan demikian ,hal tersebut dapat menurunkan komponen trigliserida dan justru meningkatkan digliserida ataupun monogliserida

Gambar 2 menunjukkan Pengaruh pH lipase terhadap profil gliserida lipid terstruktur ditunjukkan pada Gambar 2.

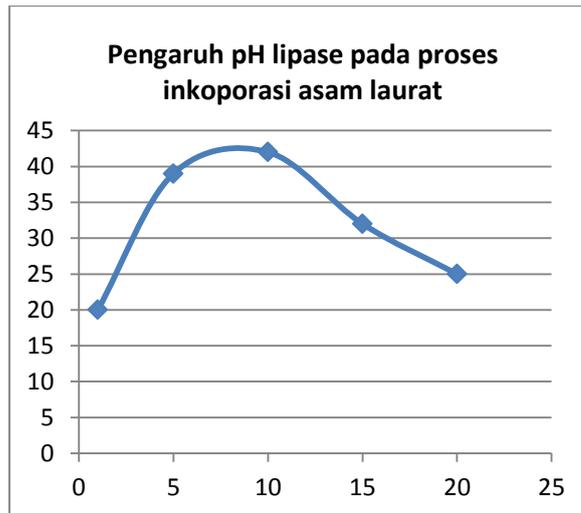
Komponen TG (trigliserida) meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi lipase (hingga mencapai pH 8). Hal ini disebabkan karena lipas *rhizopus oryzae terimmobil* sangat spesifik untuk asam laurat (Jeyarani, 2010) dan memiliki aktivitas relative rendah terhadap PUFA terutama DHA (Greyt, 2004).

Ketika pH lipase rendah maka kecenderungan reaksi berjalan kekanan cukup lemah dan kemampuan lipase untuk mengkatalis untuk proses asidolisis juga relative kecil.

Komponen TG (trigliserida) justru menurun jika pH lipase dinaikkan, Hal ini mungkin berkaitan dengan aktivitas lipase yang menurun dengan semakin banyaknya asam lemak bebas.

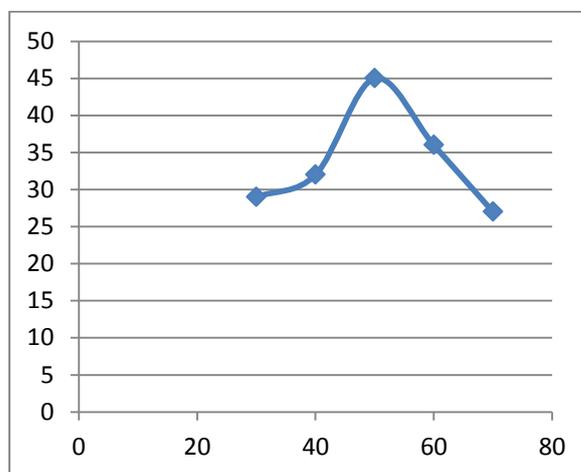
Asam lemak bebas menyebabkan desorbsi air dari interface kemudian mengambil bagian interface air disekitar enzim dan meningkatkan kelarutannya dalam air sehingga akan membatasi masuknya substrat pada interface.

Akibat penurunan aktivitas lipase tersebut menyebabkan terbentuknya produk intermediate dan menyebabkan reaksi Transesterifikasi tidak sempurna.



Gambar 3. Pengaruh pH lipase terhadap inkorporasi asam laurat

Gambar 3 menunjukkan bahwa inkorporasi asam laurat pada lipid terstruktur (42%) meningkat sampai pH lipase 8 jika konsentrasi dinaikkan lagi mengakibatkan penurunan tingkat inkooporasinya (32 % untuk lipase 15%). Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain: (1) kompetisi asam laurat dan asam lemak bebas lain,(2) penurunan pH larutan dengan penambahan asam laurat, (3) Substrat inhibitor dan (4) desorbsi air pada interface



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap inkorporasi asam laurat pada waktu inkubasi 12 jam

Reaksi kimia membutuhkan panas dalam jumlah tertentu sebesar energy aktivasi untuk mencapai tahap transisi kemudian membentuk produk. Keterlibatan enzim lipase sebagai biokatalis menurunkan level energy aktivasi (Idris, 2005), Hal ini berakibat menurunnya kebutuhan panas

dan mempercepat reaksi dibandingkan dengan reaksi tanpa katalis.

Archenius menyatakan bahwa laju reaksi meningkat dengan meningkatnya suhu reaksi (Bajpai, 2003). Naiknya suhu reaksi berakibat menurunkan viskositas campuran reaksi, sehingga membantu mobilisasi molekul substrat untuk bereaksi (Akoh, 2002).

Namun demikian karena enzim adalah protein yang terdenaturasi secara irreversible pada suhu tinggi maka kenaikan suhu reaksi teratas pada temperatur rendah (Akoh, 2002).

Menurut Probondari, 2007, suhu optimum lipase imobile adalah 30-62°C.

Dari reaksi asidolisis minyak ikan tuna dengan asam laurat dengan biokatalis lipase Rhizopus *Oryzae imobile*, diperoleh pada suhu optimum 50°C, waktu 12 jam.

KESIMPULAN

Lipase rhizopus *Oryzae imobile*, dapat digunakan dengan baik untuk sintesa Lipid terstruktur dari minyak ikan tuna dengan asam laurat.

Kondisi optimum reaksi adalah pada suhu 50°C, pH lipase 8 perbandingan ratio substrat (Minyak ikan tuna : asam laurat) 1:10 selama 12 jam. Profil gliserida dari hasil asidolisis enzimatis adalah :

- 78,1 % trigliserida,
- 32,2 % Digliserida
- 11,9% Monogliserida.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan Terma kasih dan penghargaan ditujukan pada:

Dekan Fakultas Teknik Undip yang telah memberikan dana untuk penelitian ini, Ketua Program Studi Diploma III Teknik Kimia yang sudah memberikan fasilitas Laboratorium

DAFTAR PUSTAKA

Akoh,C C. 2002. *Structured lipids. In: Food Lipids, Chemistry, nutrition, and Biotechnology.* West Virginia University, morgantowa. West Virginia. Marcel Dekker Inc. Newyork

AOCS. 1989. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemistry Society.*4thed. Broadmaker Drive, Champaign. Illinois

Bajpai, I. C., P. T. Quinlan, dan G. PMcNeill. 2003. *Lipase-Catalyzed Synthesis of Chiral Triglycerides.* J. Am. Oil. Chem. Soc. 75: 1513 – 518

FAO/WHO/CAC/RS 2001 rev.1, 2009. In: *Guidelines for Characterizing Food-Grade Fish Oil.* Inform, Vol. 9. no. 5. 473-481

Gandi, J. R., D. H. Pence, S. Scheinsach, P. R. D'Amelia, L. P. Klemann, N. H. Wilson, and J. W. Finkey. 2007. *Review of Triacilglycerols Digestion, Absorption, and Metabolism With Respect to Salatrim Triacylglycerols.* J. Agri. Food. Chem. 42,473-483

Greyt, R. ,M.Yasui,Y.Iwasaki, N. Shimidzu, and T. Yamane. 2004. *Enzymatic Synthesis of 1,3-Dicapryloyl-2-Eicosapentaenoylglycerol.* J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (7) :743 – 748

Idris, R., K. Furihata, K. Hata, Y. Iwasaki, and T. Yamane. 2005. *Utilization Of Reaction Medium - Dependent Regiospecifity Of Candida Antartica Lipase (Novozyme 435) For The Synthesis Of 1,3-Dicapryloyl-2-Docosahexaenoyl (Or Eicosapentaenoyl) Glycerol.* J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (3) :285 – 289

Irimescu, R., K. Furihata, K. Hata, Y. wasaki, and T. Yamane. 2000. *Two - Step Enzymatic Synthesis of Docosahexaenoic Acid - Rich Symmetrically Structured Triacilglycerols Via 2-Monoacylglycerols.* J. Am. Oil. Chem. Soc. 78 (7) :743 – 748

Jeyarani, S., Y. Iwasaki, and C. T. Hou. 2010. *Study of Ethanolysis to 2-MAG Immobilized Candida Antartica Lipase and Synthesis of Symmetrically Structured TAG.* J. Am. Oil. Chem. Soc. 79 (9) 879 – 883

Pandey, P. W. and R. E. Goins.2009. *In Situ Preparation of Fatty Acids Metil Ester for Analysis of Fatty Acids Composition in Food.* J. of Food Science. 59 (6): 1262 – 1266

Probondari, R., B. Manohar, K. Sambiah, and B. R. Lokesh. 2007. *Enzymatic Acidolysis in to Produce n-3 or n-6*

*FA-Enriched Structured Lipids from
Coconut Oil: Optimization of
Reactions by Response Surface*

Methodology. J. Am. Oil. Chem. Soc.
70 (9) : 885 – 890