

SINTESIS LIPIDA TERSTRUKTUR DARI ASAM LAURAT DAN GLISEROL DALAM PELARUT ISOOKTANA DENGAN BIOKATALIS LIPASE *Candida rugosa*

Sriyono Poerwanto¹⁾, Chusnul Hidayat^{2*)} dan Supriyadi²⁾

¹⁾Sekolah Menengah Teknologi Industri Yogyakarta, Jl. Kusumanegara 1 Yogyakarta

²⁾Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada

Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta. Telp/Fax : 0274-549650

^{*)}Penulis korespondensi: chusnul@gadjahmada.edu

Abstrak

Lipida terstruktur (LS) yang mengandung asam lemak rantai medium mempunyai keuntungan untuk kesehatan dan banyak dipelajari kegunaannya untuk keperluan medis, fungsional nutrisi, dan makanan. Dalam penelitian ini dikaji sintesis enzimatis LS rantai medium dari asam laurat dan gliserol menggunakan lipase *Candida rugosa*. Berbagai pengaruh parameter reaksi seperti konsentrasi enzim, lama reaksi, suhu, penambahan molecular sieve, dan perbandingan molar substrat (mmol asam laurat/mmol gliserol telah dikaji). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kondisi terbaik untuk sintesis gliserida rantai medium dicapai pada suhu reaksi 37°C selama 24 jam dengan jumlah lipase sebanyak 80 mg, penambahan molecular sieve 0,1 mg, dan perbandingan molar substrat asam laurat/gliserol 3:1. Analisa produk reaksi menggunakan kromatografi gas menunjukkan bahwa lipase *Candida rugosa* dapat menghasilkan gliserida dengan komposisi persentase molar 15,55% monolaurin, 10,29% dilaurin, dan 1,41% trilaurin.

Kata kunci: asam laurat, esterifikasi, gliserol, lipase *Candida rugosa*

Abstract

A structured lipid (SL) containing medium chain fatty acid has health benefit and it has been studied for functional food especially as nutraceutical food. In this research, enzymatic synthesis of medium chain SL from lauric acid and glycerol was studied using *Candida rugosa* lipase. Factors such as enzyme loading, reaction time, temperature, molecular sieve, and molar ratio of substrate (mmole lauric acid/mmmole glycerol) were evaluated. The results showed that the best conditions for the synthesis of the medium chain SL were the reaction at temperature of 37°C for 24 h. The lipase loading, molecular sieve adding, and molar ratio of substrate were 80 mg, 0.1 mg, and ratio of 3:1, respectively. The results also showed that *Candida rugosa* lipase can be used for glycerides synthesis in which the molar percentage of monolaurin, dilaurin, and trilaurin were 15.55%, 10.29%, and 1.41%, respectively.

Keywords: lauric acid, etherification, glycerol, *Candida rugosa* lipase

PENDAHULUAN

Lipid terstruktur (LS) adalah triasilgliserol yang telah dimodifikasi melalui inkorporasi asam lemak yang baru, restrukturisasi untuk mengubah posisi asam lemak, atau profil asam lemak dari kondisi alaminya, ataupun mensintesa triasilgliserol yang baru (Akoh and Huang, 1995; Akoh, 2002). LS dapat berupa minyak atau lemak termodifikasi yang mengandung asam lemak rantai panjang (terutama asam lemak esensial) dan asam lemak rantai pendek (C1-C4) atau medium (C6-C12). Selama ini LS disintesis dari asam kaprilat (Senanayake dan Shahidi, 2002), *conjugated linoleic acid* (Lee *et al*, 2004, Kim *et al*, 2001), dan trigliserida

yang mengandung asam laurat hasil rekayasa genetika (Hamam and Shahidi, 2005).

Medium-chain triacylglycerols (MCT) adalah triasilgliserol yang mengandung asam lemak rantai medium. MCT mempunyai keuntungan untuk kesehatan dan banyak dipelajari kegunaannya untuk keperluan medis, fungsional nutrisi, dan makanan (Weaver and Holub, 1988; Grimsgaard *et al*, 1997; Holub, 2001). LS yang mengandung asam lemak rantai medium (MCFA) dan asam lemak rantai panjang (LCFA) pada kerangka gliserida lebih mudah diabsorpsi dan dikonversikan ke dalam bentuk energi oleh tubuh dibandingkan dengan triacylglycerol yang

mengandung asam lemak rantai panjang (LCT) (Akoh, 1998). Selain itu, LS yang mengandung MCFA dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Rao and Lokesh, 2003a, 2003b). Residu MCFA dengan mudah terhidrolisis di dalam saluran pencernaan menghasilkan asam lemak yang diabsorpsi dengan cepat dan digunakan sebagai sumber energi yang tinggi di dalam tubuh. MCFA dalam tubuh mudah dipecah melalui β -oksidasi sebagai sumber energi, mengurangi berat tubuh, dan kadar kolesterol (Marten *et al*, 2006).

Asam laurat termasuk golongan MCFA dan merupakan komponen utama dalam minyak kelapa maupun minyak inti sawit yang banyak diproduksi di Indonesia. Sampai saat ini sintesis trigliserida yang mengandung asam laurat belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, untuk meningkatkan nilai tambah asam laurat yang banyak terdapat di Indonesia maka perlu dibuat lipid terstruktur yang mengandung asam laurat. Sintesis lipid terstruktur yang mengandung asam lemak esensial dan asam laurat murni dapat diawali dengan esterifikasi gliserol dengan asam lemak. Esterifikasi gliserol dengan asam laurat dapat dilakukan secara konvensional yaitu dengan katalis kimia, namun memerlukan suhu tinggi dan dapat merusak produk. Selain itu esterifikasi dengan katalis kimia dapat menghasilkan hasil samping yang tidak diinginkan, karena asam lemak yang diinginkan terikat gliserol pada posisi random (Yesiloglu and Kilic, 2004, Akoh, 2002).

Enzim sebagai biokatalis dapat dipakai sebagai alternatif pengganti katalis kimia karena reaksi dapat berjalan baik pada suhu sedang (Wong *et al.*, 2000). Bezbradica *et al.* (2006) melaporkan bahwa suhu optimum reaksi esterifikasi enzim bebas dari lipase *Candida rugosa* dicapai pada kisaran suhu yang sempit yaitu sekitar 45°C. Demikian juga Wong *et al* (2000) melaporkan bahwa suhu terbaik sintesis gliserida rantai medium dengan lipase *Candida rugosa* pada 37°C. Karakteristik penting lipase yaitu kemampuannya mensintesis ikatan ester dalam medium non air (Abbas *et al*, 2002). Reaksi esterifikasi dilaksanakan dalam pelarut organik non polar, yaitu isooktana agar asam laurat dapat terlarut sehingga reaksi dapat berjalan dengan baik (Wong *et al*, 2000). Yesiloglu dan Kilic (2004) juga melaporkan bahwa sintesis ester dengan lipase *C. rugosa* dalam pelarut isooktana menunjukkan hasil esterifikasi lebih tinggi dari pada pelarut organik lainnya.

Pada penelitian ini dipelajari sintesis lipida terstruktur yang mengandung MCFA (asam laurat) menggunakan biokatalis lipase. Faktor yang dipelajari antara lain jumlah enzim, waktu reaksi, suhu reaksi, penambahan *molecular sieve*, dan perbandingan mol asam laurat/gliserol terhadap konversi substrat pada esterifikasi asam laurat dengan gliserol memakai lipase *Candida rugosa* dalam pelarut isooktana. Selain itu juga ditentukan komposisi gliserida pada kondisi hasil yang terbaik untuk masing-masing parameter yang dipelajari.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan adalah asam laurat, standar asam miristat, standar *rac*-1-monolaurin, standar trilaurin yang diperoleh dari Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Lipase *Candida rugosa* diperoleh dari Novozyme (Bagsvaerd, Denmark). *Molecular sieve* 4Å, gliserol, isooktana, piridin, dan Cu asetat monohidrat diperoleh dari Merck KGaA (Darmstadt, German). Sedang aquades diperoleh dari supplier lokal.

Reaksi Esterifikasi

Campuran reaksi terdiri dari gliserol (0,3-1,25 mmol), asam laurat 1,5 mmol, dan 1,5 mL isooktana dalam tabung reaksi yang berulir. Reaksi diawali dengan penambahan lipase *Candida rugosa* (40-100 mg) dan *molecular sieve* (0-0,5 g) ke dalam tabung reaksi. Reaksi dilakukan dalam *waterbatch shaker* pada kecepatan *waterbatch shaker* 2 stroke/detik dengan variasi suhu 34-55°C dan lama reaksi 20 menit-48 jam. Reaksi dihentikan dengan memisahkan fase isooktana dari fase gliserol. Bagian fase isooktana disimpan untuk analisa kandungan asam laurat sisa secara spektrofotometri menggunakan metode Marseno *et al* (1998).

Pengaruh Jumlah Enzim terhadap Konversi Substrat

Penentuan pengaruh jumlah enzim terhadap konversi substrat dilakukan pada campuran reaksi yang mengandung gliserol dan asam laurat dengan perbandingan 0,5:1,5 (mmol) dan 1,5 mL isooktana digunakan pada percobaan ini. Ke dalam campuran reaksi ditambahkan enzim dengan variasi 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 mg dan *molecular sieve* sebanyak 0,1 g. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sisa asam laurat ditentukan secara spektrofotometri.

Pengaruh Waktu Reaksi terhadap Konversi Substrat

Penentuan pengaruh lama reaksi terhadap konversi substrat dilakukan pada campuran reaksi yang mengandung gliserol dan asam laurat dengan perbandingan 0,5:1,5 (mmol) dan 1,5 mL isooktana. Ke dalam campuran reaksi ditambahkan enzim sebanyak 80 mg dan *molecular sieve* sebanyak 0,1 g, selanjutnya campuran diinkubasi dengan variasi waktu 20 menit, 40 menit, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, dan 48 jam pada suhu 37°C. Sisa asam laurat ditentukan secara spektrofotometri.

Pengaruh Suhu Reaksi terhadap Konversi Substrat

Penentuan pengaruh suhu terhadap konversi substrat dilakukan pada campuran reaksi yang mengandung gliserol dan asam laurat dengan perbandingan 0,5:1,5 (mmol) dan 1,5 mL isooktana. Ke dalam campuran reaksi ditambahkan enzim sebanyak 80 mg dan *molecular sieve* sebanyak 0,1 g,

selanjutnya campuran diinkubasi selama 24 jam dengan variasi suhu 34, 37, 40, 43, 46, 50, dan 55°C. Sisa asam laurat ditentukan secara spektrofotometri.

Pengaruh Penambahan *Molecular Sieve* terhadap Konversi Substrat

Penentuan pengaruh *molecular sieve* terhadap konversi substrat dilakukan pada campuran reaksi yang mengandung gliserol dan asam laurat dengan perbandingan 0,5:1,5 (mmol) dan 1,5 mL isooktana. Ke dalam campuran reaksi ditambahkan enzim sebanyak 80 mg dan *molecular sieve* dengan variasi 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 g, selanjutnya campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sisa asam laurat ditentukan secara spektrofotometri.

Pengaruh Perbandingan Molar Substrat terhadap Konversi Substrat

Penentuan pengaruh perbandingan molar substrat terhadap konversi substrat dilakukan pada campuran reaksi yang mengandung asam laurat sejumlah 1,5 mmol dan gliserol sehingga didapatkan variasi perbandingan mmol asam laurat/gliserol 1:1; 1,2:1; 1,5:1; 2:1; 3:1, dan 5:1, dan 1,5 mL isooktana. Ke dalam campuran reaksi ditambahkan enzim sebanyak 80 mg dan *molecular sieve* sebanyak 0,1 g. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sisa asam laurat ditentukan secara spektrofotometri.

Penentuan Komposisi Gliserida

Penentuan komposisi gliserida yang dihasilkan dilakukan pada campuran reaksi yang mengandung gliserol dan asam laurat dengan perbandingan 0,5:1,5 (mmol) dan 1,5 mL isooktana. Ke dalam campuran reaksi ditambahkan enzim sebanyak 80 mg dan *molecular sieve* sebanyak 0,1 g. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil reaksi esterifikasi dianalisa dengan GC, yaitu sebanyak 0,5 ml fase isooktane ditambah dengan 0,5 ml larutan standar internal (20 mg/ml asam miristat dalam isooktana). Campuran diinjeksikan ke dalam GC (Shimadzu 14B) yang dilengkapi dengan kolom RTx-1 0,25 mm x 30 m. Suhu kolom awal diatur pada 150°C dan ditahan selama 5 menit, kemudian dinaikkan sampai 200°C dengan kecepatan 10°C/menit, dan ditahan selama 5 menit. Kemudian suhu kolom dinaikkan lagi sampai 280°C dengan kecepatan 5°C/menit, dan ditahan selama 10 menit. Nitrogen digunakan sebagai gas pembawa dengan kecepatan 60 mL/menit. Suhu injektor dan detektor yang digunakan masing-masing adalah 300°C.

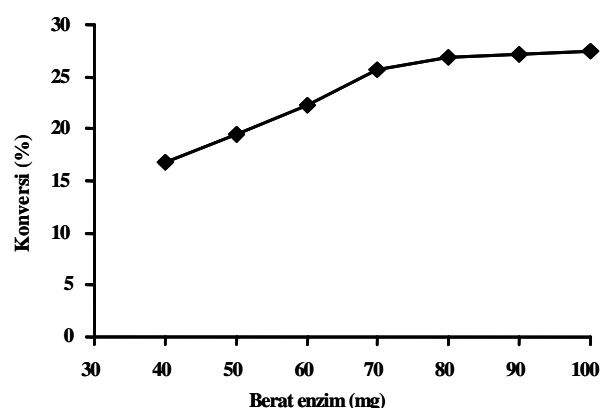
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Jumlah Enzim terhadap Konversi Substrat

Konversi asam laurat menjadi bentuk ester gliserol tampak meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah enzim yang digunakan (Gambar 1). Campuran reaksi terdiri dari 0,5 mmol gliserol, 1,5 mmol asam

laurat, 1,5 ml isooktana, dan 0,1 g *molecular sieve*. Reaksi dilaksanakan pada suhu 37°C selama 24 jam. Persentase konversi ditentukan sebagai banyaknya mol asam laurat yang digunakan untuk reaksi dibagi mol asam laurat mula-mula.

Pada penambahan lipase sebanyak 40 mg sampai 70 mg menunjukkan terjadi kenaikan konversi asam laurat berlangsung secara linear. Pada konsentrasi tersebut jumlah enzim masih di bawah tingkat jenuh, sehingga efektifitas enzim menurunkan energi aktivasi untuk terjadinya reaksi semakin baik. Dengan demikian konversi asam laurat menjadi ester berlangsung secara cepat. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh beberapa peneliti yang menunjukkan bahwa di bawah tingkat jenuh, kenaikan jumlah enzim meningkatkan konversi substrat dalam reaksi transesterifikasi (Yadav *et al*, 2003; Ghamgui *et al*, 2004, Garcia *et al*, 1999).



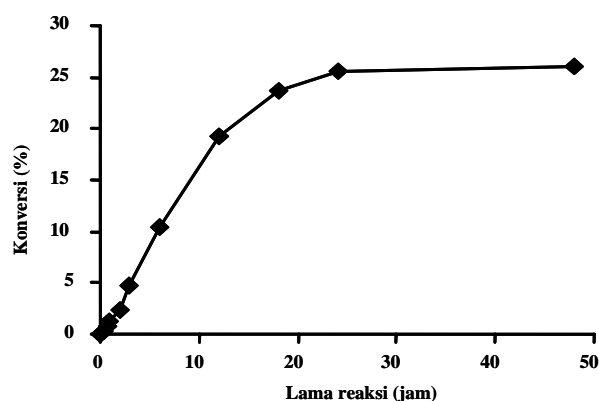
Gambar 1. Pengaruh jumlah lipase terhadap konversi substrat

Penggunaan enzim di atas 70 mg menyebabkan kenaikan tingkat konversi substrat semakin kecil dan bahkan konversi cenderung tidak meningkat pada peningkatan jumlah enzim menjadi 100 mg. Beberapa peneliti juga melaporkan bahwa di atas tingkat jenuh, penambahan jumlah enzim tidak memberikan peningkatan konversi yang berarti (Wong *et al*, 2000; Yadav *et al*, 2003; Ghamgui *et al*, 2004). Hal ini disebabkan apabila jumlah enzim sudah mencapai tingkat jenuh maka semua substrat akan terikat enzim dan membentuk kompleks enzim-substrat. Penambahan jumlah enzim di atas tingkat jenuh maka tidak akan meningkatkan kompleks enzim-substrat. Selain itu, kenaikan jumlah enzim juga meningkatkan viskositas sistem reaksi yang menyebabkan kecepatan gerak substrat terganggu. Dengan demikian penambahan enzim di atas tingkat jenuh menimbulkan resistansi transfer massa sehingga menghambat kecepatan reaksi.

Pengaruh Waktu terhadap Konversi Substrat

Pengaruh waktu reaksi terhadap konversi substrat dapat dilihat pada Gambar 2 yang

menunjukkan bahwa persentase konversi substrat meningkat dengan meningkatnya waktu reaksi sampai keadaan setimbang tercapai. Campuran reaksi terdiri dari 0,5 mmol gliserol, 1,5 mmol asam laurat, 1,5 ml isooktana, 80 mg lipase, dan 0,1 g *molecular sieve*. Reaksi dilaksanakan pada suhu 37°C. Persentase konversi ditentukan sebagai banyaknya mol asam laurat yang digunakan untuk reaksi dibagi mol asam laurat mula-mula.



Gambar 2. Pengaruh waktu reaksi terhadap konversi substrat

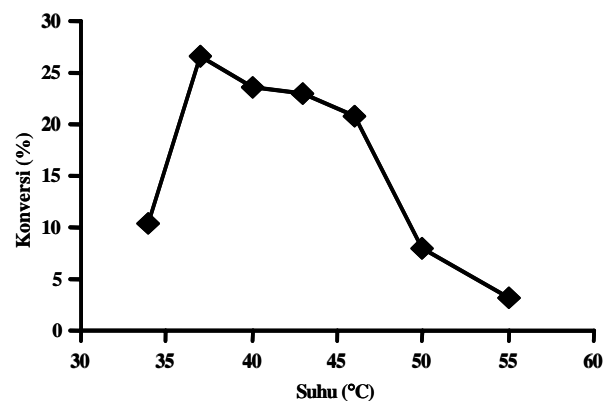
Kecepatan awal esterifikasi sangat tinggi pada kisaran 10 jam, selanjutnya turun dan relatif tetap setelah 24 jam. Setelah 24 jam, konversi mengarah ke kondisi setimbang. Hal ini diduga karena air yang terbentuk selama proses esterifikasi bertindak sebagai substrat pada proses hidrolisis intermediet enzim hasil. Wong *et al* (2000) melaporkan juga bahwa sintesis gliserida rantai medium setelah 24 jam menunjukkan kondisi setimbang telah dicapai.

Pengaruh Suhu terhadap Konversi Substrat

Hasil penelitian yang menyatakan hubungan antara suhu dan konversi substrat ditunjukkan dalam Gambar 3. Campuran reaksi terdiri dari 0,5 mmol gliserol, 1,5 mmol asam laurat, 1,5 ml isooktana, 80 mg lipase, dan 0,1 g *molecular sieve*. Reaksi berlangsung selama 24 jam. Persentase konversi ditentukan sebagai banyaknya mol asam laurat yang digunakan untuk reaksi dibagi mol asam laurat mula-mula.

Gambar 3 menunjukkan bahwa reaksi semakin meningkat dengan meningkatnya suhu, terutama pada kisaran suhu 34 sampai 37°C. Pada suhu reaksi esterifikasi di bawah 37°C, molekul substrat belum memiliki cukup energi kinetik untuk terjadinya suatu reaksi berjalan dengan baik, sehingga reaksi berjalan sangat lambat. Pada suhu 37°C enzim pada kondisi paling aktif. Hal ini disebabkan peningkatan suhu reaksi akan meningkatkan energi kinetik molekul sehingga gerak molekul dalam sistem meningkat. Akibatnya adalah frekuensi terjadinya tumbukan antar molekul meningkat. Selain itu viskositas sistem dan tegangan antar muka semakin berkurang sehingga

mempercepat transfer massa substrat dan produk pada permukaan ataupun sisi dalam partikel enzim. Tingkat kelarutan enzim juga mengalami kenaikan. Hal ini mengakibatkan reaksi berjalan lebih baik. Secara umum, lipase mempunyai suhu optimum berkisar antara 35 sampai 40°C (Babali *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2001).



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap konversi substrat

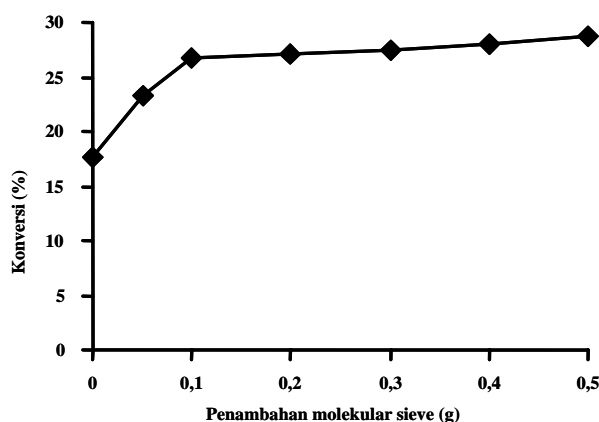
Kenaikan suhu di atas 37°C menyebabkan konversi substrat turun. Ini menunjukkan bahwa kenaikan suhu tersebut menyebabkan enzim mengalami kehilangan aktivitas pada kisaran suhu tertentu, dimana perubahan tersebut dapat bersifat reversible atau irreversible. Hal ini disebabkan sejumlah ikatan dalam molekul protein melemah dan putus. Selanjutnya struktur protein menjadi lebih fleksibel dan gugus-gugusnya terbuka karena adanya solven. Apabila pemanasan berhenti pada tahap ini, protein mampu kembali ke struktur awalnya. Namun demikian pada suhu terlalu tinggi akan terjadi vibrasi dan gerakan molekul yang dapat mempengaruhi ikatan-ikatan hidrogen dan ikatan lain dalam struktur enzim (Radzi *et al*, 2005). Ini menyebabkan enzim mengalami deformasi struktur tersier dan kuartier, sehingga tingkat kelarutan enzim menurun tajam. Perubahan struktur enzim mengakibatkan denaturasi, namun kebanyakan protein tidak akan kembali ke bentuk aslinya sehingga enzim tidak dapat berfungsi dengan baik.

Pengaruh *Molecular Sieve* terhadap Konversi Substrat

Lipase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis maupun esterifikasi. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi kebalikan esterifikasi sehingga tingkat hidrasi sistem reaksi antara asam laurat dan gliserol sangat mempengaruhi konversi esterifikasi. Dalam penelitian ini, *molecular sieve* digunakan untuk mengadsorpsi air yang kemungkinan terkandung dalam substrat maupun yang terbentuk selama reaksi berlangsung. Kandungan air yang berlebihan dalam campuran reaksi dapat menyebabkan reaksi hidrolisis. Hasil penelitian yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4. Campuran reaksi terdiri dari 0,5 mmol gliserol, 1,5 mmol asam

laurat, 1,5 ml isooktana, dan 80 mg lipase. Reaksi berlangsung selama 24 jam pada suhu 37°C. Persentase konversi ditentukan sebagai banyaknya mol asam laurat yang digunakan untuk reaksi dibagi mol asam laurat mula-mula.

Gambar 4 menunjukkan bahwa penambahan *molecular sieve* sebanyak 0,05 sampai 0,1 g memberikan peningkatan konversi reaksi cukup efektif, yaitu sekitar 15%. Penambahan *molecular sieve* sampai 0,1 g memberikan konversi 26,72% karena air yang terbentuk selama reaksi mampu diabsorpsi dengan baik, sehingga reaksi mengarah ke pembentukan ester. Penelitian yang dilakukan Torres dan Otero (1999) juga menunjukkan bahwa penambahan *molecular sieve* dalam sistem reaksi meningkatkan konversi reaksi estertifikasi.



Gambar 4. Pengaruh penambahan *molecular sieve* terhadap konversi substrat

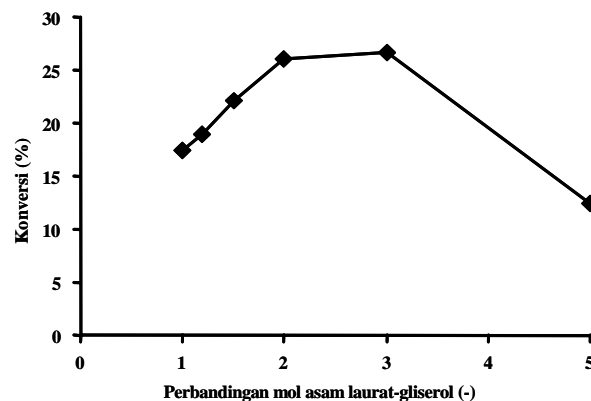
Selanjutnya dengan penambahan *molecular sieve* di atas 0,1 g menunjukkan peningkatan konversi rendah, yaitu hanya sekitar 4%. Hal ini kemungkinan disebabkan penambahan jumlah *molecular sieve* akan menimbulkan resistansi transfer massa lebih besar sehingga aktivitas enzim kurang optimum. Kemungkinan lain *molecular sieve* juga mengadsorpsi asam laurat, sehingga menurunkan konsentrasi asam laurat dalam sistem reaksi, atau menurunkan kandungan air sampai di bawah tingkat kebutuhan reaksi (Torres and Otero, 1999).

Pengaruh Perbandingan Molar Asam Laurat/Glisserol terhadap Konversi Substrat

Pengaruh perbandingan molar substrat dalam campuran reaksi pada sintesis gliserida menggunakan lipase dapat dilihat pada Gambar 5. Campuran reaksi terdiri dari 1,5 mmol asam laurat, gliserol n mmol, 1,5 ml isooktana, 80 mg lipase, dan 0,1 g *molecular sieve*. Reaksi berlangsung selama 24 jam pada suhu 37°C. Persentase konversi ditentukan sebagai banyaknya mol asam laurat yang digunakan untuk reaksi dibagi mol asam laurat mula-mula.

Reaksi tidak dapat berjalan optimal pada perbandingan molar asam laurat/glisserol kurang dari 2. Jumlah gliserol yang berlebihan justru akan

menghambat aktifitas enzim. Konsentrasi gliserol terlalu tinggi akan meningkatkan viskositas campuran reaksi di sekitar molekul lipase sehingga proses pencampuran substrat kurang efektif yang akhirnya menurunkan kecepatan reaksi (Radzi *et al*, 2005). Jumlah gliserol yang melebihi jumlah ekimolar juga menyebabkan akumulasi gliserol dalam lingkungan mikro lipase dan menimbulkan penghalang yang akhirnya membatasi difusi substrat ke sisi aktif enzim. Dengan terbatasnya sisi bebas akan mengakibatkan kompleks substrat enzim tidak efektif.



Gambar 5. Pengaruh perbandingan molar asam laurat/glisserol terhadap konversi substrat

Gliserol yang berlebih kemungkinan juga dapat mengganggu struktur enzim atau dapat merubah konformasi sisi aktif katalis maupun lingkungan katalis sehingga pada kondisi polar aktifitas enzim berkurang. Lapisan mikro air di sekitar enzim yang diperlukan untuk menjaga konformasi aktifnya dapat berdifusi kedalam lapisan gliserol karena gliserol bersifat hidrofil. Hal ini menyebabkan gliserol yang tinggi dapat menghambat reaksi esterifikasi. Hasil penelitian Wong *et al* (2000) menunjukkan pula bahwa pada kondisi gliserol berlebihan menyebabkan aktivitas enzim menurun.

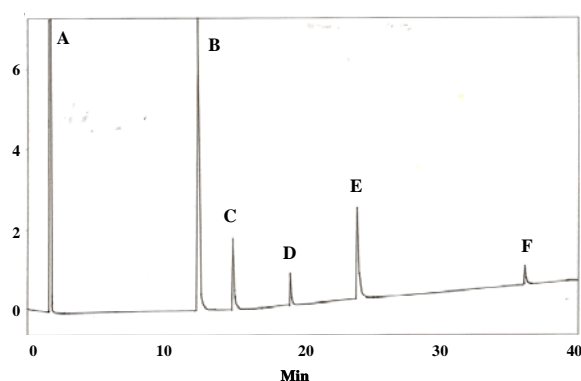
Pada perbandingan mol asam laurat/glisserol di atas 3, jumlah gliserol lebih kecil dari kebutuhan ekimolar reaksi esterifikasi. Dengan kandungan asam laurat bebas terlalu tinggi menyebabkan gugus asam karboksilat bebas atau terionisasi tinggi. Hal ini menyebabkan lapisan air mikro di sekitar enzim bersifat asam sehingga struktur tersier dan kuartir protein bersifat tidak stabil dan cenderung berubah pada kondisi di bawah normal. Kondisi ini menyebabkan pecahnya ikatan ionik dan ikatan hidrogen, sehingga lipase mengalami denaturasi. Kemungkinan lain adalah adanya desorpsi air dari interface, yang akhirnya enzim mengalami penurunan aktifitas.

Analisis Komposisi Hasil Esterifikasi

Hasil kromatogram campuran produk ditunjukkan dalam Gambar 6. Reaksi dilakukan pada kondisi masing-masing parameter yang menghasilkan

konversi optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase molar asam laurat bebas yang tersisa sebesar 72,75%, dan 27,25% dikonversikan menjadi gliserida rantai menengah yaitu 15,55% monolaurin, 10,29% dilaurin, dan 1,41% trilaurin.

Penelitian ini menunjukkan bahwa lipase *Candida rugosa* dapat digunakan untuk produksi gliserida dengan komposisi utama monolaurin dan dilaurin. Pada esterifikasi gliserol dan asam oleat menggunakan lipase *Candida rugosa* dengan pelarut heksan (Yesiloglu dan Kilic, 2004), maupun esterifikasi gliserol dan asam kaprat (Wong *et al.*, 2000) juga menunjukkan hasil utama berupa mono gliserida dan digliserida.



Gambar 6. Kromatogram hasil esterifikasi asam laurat dan gliserol dengan perbandingan 1,5 mmol:0,5 mmol dalam pelarut 1,5 ml isooktana, *molecular sieve* 0,1 g, pada suhu 37°C selama 24 jam (A : isooktana, B : asam laurat, C : asam miristat sebagai standar internal, D : monolaurin, E : dilaurin, dan F : trilaurin)

Edmundo *et al* (2001) melaporkan bahwa reaksi pembentukan trigliserida dan digliserida lebih sulit karena kelarutannya dalam sistem reaksi lebih rendah dari pada monogliserida. Namun dalam penelitian ini menunjukkan bahwa konversi substrat secara keseluruhan masih rendah apabila dibandingkan dengan lipase *Candida rugosa* dalam bentuk teramobilisasi, misalnya penelitian yang dilakukan oleh Hiol *et al* (2000) dalam esterifikasi heksanol dengan sardine menggunakan lipase *Candida rugosa* teramobilisasi menunjukkan konversi substrat lebih besar yaitu 50%.

KESIMPULAN

Sintesa lipida terstruktur yang mengandung asam lemak rantai medium (asam laurat) dapat dilakukan menggunakan asam laurat dan gliserol sebagai substratnya dan Lipase *Candida rugosa* sebagai biokatalis. Kondisi terbaik untuk sintesis gliserida dari asam laurat dan gliserol dicapai pada jumlah lipase 80 mg, waktu reaksi 24 jam, suhu 37°C, penambahan *molecular sieve* 0,1 mg, dan perbandingan molar substrat asam laurat/gliserol 3:1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini mendapat dukungan dari Hibah Penelitian Tim Pasca Sarjana – HPTP maupun sumbangan pemikiran dari alm. Prof. Dr. H. Tranggono.

DAFTAR PUSTAKA

Akoh, C.C. and Huang, K.H., (1995), Enzymatic Synthesis of Structured Lipids: Transesterification of Triolein and Caprylic Acid, *J. Food Lipid*, 2: 219

Akoh, C.C., (1998), *Structured Lipids*, In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, edited by C.C. Akoh and D.B. Min, Marcel Dekker, New York pp. 699-727.

Akoh, C.C., (2002), *Structured lipids*. In: *Food Lipids, Chemistry, nutrition, and Biotechnology*, West Virginia University, Morgantowa, West Virginia. Marcel Dekker Inc., New York

Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., and Comeau, L., (2002), Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase from *Mucor sp* Strain Isolated from Palm Fruit, *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 968-975.

Babali, B., Aksoy, H.A, Tuter, M., and Ustun, G., (2001), Enzymatic Esterification of (–)-Menthol with Fatty Acids in Solvent by a Commercial Lipase from *Candida rugosa*, *JAOCs*, 78: 173-175.

Bezbradica, D., Karalazic, I., Ognjanovic, N., Mijin, D., Marinkovic, S.S., and Knezevic, Z., (2006), Studies on The Specificity of *Candida rugosa* Lipase Catalized Estrification Reactions in Organic Media, *J. Serb. Chem. Soc.*, 71: 31-41.

Edmundo, C., Valerie, D., Didier, C., and Alain, M., (1998), Efficient Lipase-Catalyzed Production of Tailor Made Emulsifier Using engineering Coupling to Extractive Processing, *JAOCs*, 7: 309-313.

Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M., and Aracil, J., (1999), Enzymatics Synthesis of Fatty Esters Part I. Kinetic Approach, *Enzyme and Microbial, Technology*, 25: 584-590.

Ghamgui, H., Chaabouni, M.K., and Gargouri, Y., (2004), 1-Butyl Oleat Synthesis by Immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a Comparative Study Between *n*-Hexane and Solvent-free Enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 355-363.

Grimsgaard, S., Bonna, K.H. Hansen J.B., and Nordoy, A., (1997), Highly Purified Eicosapentaenoic Acid and Docosa hexaensic Acid in Human Have Similar Triacyl glycerol-lowering Effect but Divergent Effects on Serum Fatty Acid, *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 649-659.

- Hammam, F. and Shahidi, F., (2005), Structured Lipids from High-Laurate Canola Oil and Long-Chain Omega-3 Fatty Acids, *JAOCS*, 82: 731-736 .
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., and Comeau, L.C., (2000), Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from a Thermophilic *Rhizopus oryzae* Strain Isolated from Palm Fruit, *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 421-430.
- Holub, B.J., (2001), Docosahexaenoic Acid in Human Health. In: Omega-3 Fatty Acids: Chemistry, Nutrition and Health Effects, edited by F. Shahidi and J.W. Finley, American Chemical Society Symposium Series 788, American Chemical Society, Washington DC p. 54-65.
- Jeung-Hee Lee, J. H, Shin, J.A, Lee, J.H, and Lee, K.T., (2004), Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts, *Food Research International*, 37: 967-974.
- Kim, I.H., Yoon, C.S., Cho, S.H., Lee, K.W., Chung, S.H., and Tae, B.S., (2001), Lipase-Catalyzed Incorporation of Conjugated Linoleic Acid into Tricaprylin, *JAOCS*, 78: 547-551.
- Marseno, J.W., Indrati, R., and Ohta, Y., (1998), A Simplified Methods for Determination of Free Fatty Acid for Soluble and Immobilized Lipase Assay, *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 5: 79-83.
- Marten, B., Pfeuffer, M., and Schrezenmeir, J., (2006), Medium-chain triglycerides, *International Dairy Journal*, 16: 1374-1382
- Radzi, S.M., Basri, M., Salleh, A.B., Ariff, A., Mohammad, R., Rahman, M.B.A., and Rahman, R.N.Z.R.A., (2005), High Performance Synthesis of Oleyl oleate Using Immobilized Lipase from *Candida antarctica*, *Electronic J. Biotechnol.*, 8: 291-298.
- Rao, R. and Lokesh, B.R., (2003a), Nutritional evaluation of structured lipid containing omega 6 fatty acid synthesized from coconut oil in rats, *Molecular and Cellular Biochemistry* 248: 25-33
- Rao, R. and Lokesh, B.R., (2003b), TG Containing Stearic Acid, Synthesized from Coconut Oil, Exhibit Lipidemic Effects in Rats Similar to Those of Cocoa Butter, *Lipids*, 38: 913-918
- Senanayake, S.P.J.N. and Shahidi, F., (2002), Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (*Phoca groenlandica*) blubber oil with capric acid, *Food Research International*, 35: 745-752.
- Torres, C. and Otero, C., (1999), Part I. Enzymatic Synthesis of Lactate and Glycolate Esters of Fatty Alcohols, *Enzyme Micr. Tech.*, 25: 745-752.
- Weaver, B.J. and B.J. Holub, (1988), Health Effects and Metabolism of Dietary Eicosapentenoic Acid, *Prog. Food Nutr. Sci.*, 12: 111-150.
- Wong, W.C., Basri, M., Razak, C.A.N., and Salleh, A.B., (2000), Synthesis of Medium-Chain Glycerides Using Lipase from *Candida rugosa*, *JAOCS*, 77: 85-89.
- Yadav, G.D. and Trivedi A.H., (2003), Kinetic Modeling of Immobilized Lipase Catalyzed Transesterification of n-Octanol with Vinyl Acetate in Non-aqueous Media, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 783-789.
- Yesiloglu, Y. and Kilic, I., (2004), Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol and Oleic Acid, *JAOCS*, 81: 281-284.
- Zhang, H., Yang, L., and Zhu, Z., (2001), Production of Margarine Fats by Enzymatic Interetherification with Silica-Granulated *Thermomyces lanuginose* Lipase in a Large-Scale Study, *JAOCS*, 78: 57-64.