AMOBILISASI DESATURASE ASAL *ABSIDIA CORYMBIFERA* MENGGUNAKAN BUTIRAN TULANG SAPI DAN ZEOLIT

Tri-Panji[1], Khaswar Syamsu[2,3], Suharyanto[1] dan Imam Fathurachman[3]

[1]Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor.
[2]Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor
[3]Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Desaturases catalyse the bioconversion of saturated fatty acids into monounsaturated fatty acids (MUFA), or MUFA into polyunsaturated fatty acids (PUFA). Desaturases are intracellular enzymes, which are not stable for a long period in homogenate. The objective of this study was to find the immobilization method for desaturases from Absidia corymbifera *in order to obtain maximum activity and best enzyme stability. The desaturases were extracted from* A. corymbifera *biomass, and the liquid crude enzymes obtained were then immobilized by adsorption on granulated bone and zeolite as supporting media. Immobilization using bone showed a better result than using zeolite. Desaturases immobilized on zeolite and bone gave good results in continuous system. For the reuse of immobilized desaturases in batch system, the enzymes immobilized on zeolite showed a better stability than that was on bone. Immobilization was successful to increase the activity and stability of desaturases. Based on gas chromatographic analysis, one kind of desaturase enzymes that has been immobilized on supporting media is Δ^{12} desaturase as shown by the increasing concentration of linoleic acid (C18:2) in CPO incubated at 25-27 °C with the immobilized enzymes.*

Key words: desaturase enzyme, immobilized enzyme, *Absidia corymbifera*, crude-palm oil

PENDAHULUAN

Minyak sawit kasar atau CPO (*Crude Palm Oil*) merupakan salah satu produk unggulan Indonesia yang diekspor ke mancanegara. CPO yang selama ini beredar memiliki kelemahan, yaitu berbentuk padat pada suhu ruang (25 - 27°C) yang disebabkan oleh tingginya kandungan asam lemak jenuh berupa asam palmitat (45 - 52%) dan asam stearat (4 - 5%). Tingginya kandungan asam lemak jenuh menyebabkan rendahnya fraksi yang dapat diubah menjadi minyak goreng (Muderhwa *et al.*, 1985) dan juga menyebabkan rendahnya mutu minyak goreng dikaji dari rendahnya bilangan iod, dan tingginya titik keruh (*cloud point*). Bentuk padat juga sering menjadi masalah dalam proses pengapalan, terutama dalam pemindahan bahan.

Tingginya kandungan asam lemak jenuh di dalam CPO dikhawatirkan oleh konsumen Amerika Serikat dapat menimbulkan masalah bagi tubuh manusia seperti naiknya kolesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) darah yang akan mengakibatkan resiko penyakit jantung koroner (Bakrie, 1998) serta resiko *atherogenesis* oleh asam lemak jenuh rantai [12]panjang (Djojosoebagio, 1997). Berkembangnya isu-isu tentang LDL tersebut dijadikan alasan bagi hambatan ekspor (*non tariff trade barrier*) CPO Indonesia ke Amerika Serikat.

CPO juga mengandung asam lemak tidak jenuh, terutama asam oleat dan linoleat. Asam linoleat atau LA (*Linoleic Acid*) dan asam alfa linolenat atau ALA (α *-Linolenic Acid*) merupakan asam lemak tak jenuh majemuk yang esensial. Asam gamma linolenat atau GLA (γ*-Linolenic Acid*) merupakan asam lemak tak jenuh yang dapat diperoleh melalui biokonversi asam linoleat oleh enzim Δ^6 desaturase (Lapinskas, 1993). GLA memiliki arti penting bagi dunia medis dan farmasi karena dapat menurunkan kolesterol LDL bagi penderita *hiperkolesterolemia* (Ishikawa *et al.*,1989), mengobati *sindroma prahaid* (Horrobin, 1983), *eksema atopik* (Biagi *et al.*, 1988), sebagai anti trombotik (Suzuki, 1991), menjaga kelancaran metabolisme tubuh (James dan Carter, 1988) dan kelembaban kulit (Suzuki, 1991).

Pada penelitian sebelumnya (Tri-Panji, 1997), cairan fermentasi *A. corymbifera* terbukti mampu meningkatkan bilangan iod CPO. Peningkatan bilangan iod berasal dari terdesaturasinya asam lemak jenuh menjadi asam lemak tidak jenuh atau asam lemak tidak jenuh tunggal menjadi asam lemak tidak jenuh majemuk. Aktivitas serupa terjadi pada cairan fermentasi *Rhizopus oryzae*.

Desaturase merupakan enzim yang tidak stabil. Menurut Ozols (1997), enzim tersebut mengalami degradasi oleh protease yang secara spesifik menurunkan aktivitas protein-protein yang berada pada mikrosom. Oshino dan Sato (1972) menemukan bahwa desaturase mengalami penurunan aktivitas sampai pada tingkat yang tidak terdeteksi dalam beberapa jam. Hal yang sama juga ditemukan oleh Suzuki (1991) bahwa enzim diatas sangat tidak stabil ketika berada di luar sel (*in vitro*).

Amobilisasi merupakan suatu cara untuk mengikat enzim sehingga dapat digunakan berulang kali tanpa harus diadakan pemisahan kembali antara enzim dari produk yang dihasilkan. Proses amobilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu *entraping*, *carrier binding* dan *cross linking* (Chibata, 1978). Proses amobilisasi pada desaturase diharapkan dapat meningkatkan stabilitas enzim tersebut hingga waktu yang lama.

Serbuk tulang sapi dan zeolit terbukti dapat digunakan untuk amobilisasi enzim lipase (Negishi *et al.*, 1989) dan juga dapat digunakan untuk enzim desaturase sebagaimana dilaporkan oleh Tri Panji *et al.*, (2001). Pengikatan enzim desaturase oleh serbuk tulang sapi dan zeolit diharapkan mampu mengikat enzim secara baik sehingga dapat meningkatkan kestabilan dalam jangka waktu yang lama. Tujuan penelitian ini adalah menetapkan metode amobilisasi yang tepat dengan aktivitas dan stabilitas desaturase yang optimal.

BAHAN DAN METODE

Kultur *A. corymbifera*

Fungi *A. corymbifera* diperoleh dari Laboratorium Mikroba dan Bioproses, Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor. Fungi tersebut ditumbuhkan terlebih dahulu dalam media inokulum kaldu dekstrosa kentang (PDB) selama tiga hari, pada suhu kamar di atas *shaker* pada kecepatan guncangan 110 rpm.

Inokulum kemudian dihomogenkan dengan *blender* selama lima menit, kemudian sebanyak 10% (v/v) ditambahkan ke dalam media sintetik Serrano-Carreon *et al.* (1993) dengan komposisi (g/l) $(NH_4)_2SO_4$ 0.94; KH_2PO_4 7; $Na_2HPO_4.2H_2O$ 2.507; $MgSO_4.7H_2O$ 1.5; $CaCl_2$ 0.0041; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.0001, dengan molases sebagai sumber karbon, serta ditambahkan larutan HCl 1 : 1 sampai pH 5,0. Kultur diinkubasi selama 5 hari pada suhu 25°C di dalam fermentor film permukaan dengan ketebalan kultur satu cm.

Isolasi Enzim Desaturase

Isolasi enzim desaturase dilakukan dengan cara mencampur biomasa *A. corymbifera* yang telah dibersihkan dengan PBS (phosphate buffer saline) dengan perbandingan 1 : 2 (v/v), kemudian campuran diblender selama 2x15 menit. Pecahan biomassa miselium dipisahkan dari cairan enzim menggunakan sentrifuse 4000 rpm selama 15 menit. Biomassa sel dipisahkan dan cairan fermentasi digunakan untuk percobaan amobilisasi enzim, sedangkan biomassanya digunakan untuk percobaan isolasi desaturase intrasel.

Amobilisasi Desaturase

Tulang paha atau kaki sapi yang diperoleh dari limbah rumah makan dikeringkan menggunakan oven, dihancurkan hingga berdiameter 0,3 – 1,0 cm. Butiran tulang dicuci dengan heksana hingga terbebas dari lemak, dicuci dengan detergen (surfaktan) dan dikeringkan kembali dengan oven pada suhu 105 °C sampai beratnya tetap. Butiran zeolit berukuran 0,2 - 0,8 cm yang diperoleh dari pasaran dicuci dengan air mengalir, dicuci kembali dengan larutan NaCl 1M selama 12 jam dengan dua kali penggantian larutan NaCl 1M. Butiran zeolit ini kemudian dikeringkan di dalam oven dengan cara yang sama dengan di atas dan diaktivasi pada suhu 200°C selama 15 menit.

Amobilisasi desaturase dilakukan dengan cara menambahkan masing-masing 100 g butiran tulang dan zeolit teraktivasi tersebut ke dalam 300 ml cairan fermentasi, digoyang menggunakan *shaker* pada 180 rpm selama satu jam, kemudian cairan dipisahkan. Penentuan jumlah enzim teramobilisasi dilakukan berdasarkan pengurangan kadar protein cairan enzim sebelum dan setelah amobilisasi menggunakan metode Lowry (1951) dengan standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*), serta pengurangan aktivitas desaturasenya.

Uji Aktivitas Desaturase pada Sistem Batch

Pada sistem *batch*, aktivitas desaturase amobil diuji selama penggunaan yang berulang. Sebanyak dua gram CPO dan dua gram enzim amobil dalam padatan kemudian divortek selama 2-3 menit dan diinkubasikan selama 30 menit pada 25°C. CPO hasil biokonversi diambil dan diuji sebagai ulangan pertama. Ulangan berikutnya dilakukan dengan padatan desaturase amobil yang sama dan CPO baru. Sampel kemudian diuji bilangan iodnya (AOAC, 1995).

Uji Aktivitas pada Sistem Sinambung

Sebanyak 40-50 g enzim amobil dimasukkan ke dalam kolom. Secara sinambung CPO dialirkan dari bagian bawah kolom menggunakan pompa peristaltik pada laju alir satu ml/menit, dengan waktu kontak 30 menit dan sampel diuji setiap jam dari mulai jam ke-0 hingga jam ke-5. Sampel kemudian diuji bilangan iodnya (AOAC, 1995).

Uji Stabilitas Enzim

Sebanyak dua gram enzim amobil dicampurkan dengan dua gram CPO pada tabung reaksi, dikocok dengan *shaker* selama 2 - 3 menit, diinkubasikan suhu 25°Cselama 30 menit (Paulus, 2001). Sampel diambil dari enzim amobil yang disimpan pada suhu ruang untuk jam penyimpanan ke- 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 dan 120. Sampel kemudian dianalisa bilangan iodnya dibanding kontrol (AOAC, 1995).

Analisis Komposisi Asam Lemak

Komposisi asam lemak CPO sebelum dan setelah biokonversi dianalisis menggunakan metode kromatografi gas melalui esterifikasi menjadi metil ester asam lemak menurut metode Tri-Panji (1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enzim desaturase diduga merupakan enzim intraselular. Pemanenan biomassa *A. corymbifera* dilakukan pada jam ke-120, saat enzim desaturase diproduksi secara maksimal. Isolasi desaturase yang paling baik adalah menggunakan metode pencucian garam pada fraksi mikrosom (Tri-Panji *et al.*, 2001), namun metode ini hanya dapat menghasilkan ekstrak enzim dalam jumlah kecil. Isolasi desaturase secara kasar menghasilkan ekstrak enzim yang banyak, namun memiliki tingkat kestabilan yang rendah. Amobilisasi enzim pada padatan pendukung memerlukan jumlah enzim yang banyak, sehingga metode yang digunakan adalah isolasi enzim kasar. Suhu penyimpanan dan perlakuan saat isolasi adalah 25°C (suhu ruang).

Amobilisasi enzim desaturase dilakukan dengan menggunakan padatan pendukung tulang sapi dan zeolit. Tulang sapi dan zeolit memiliki rongga-rongga yang memungkinkan untuk mengadsorpsi enzim maupun protein lain. Amobilisasi dilakukan berdasarkan metode Negishi *et al.*, (1989) dengan sedikit perbedaan dalam perlakuan suhu. Suhu yang digunakan adalah 25 - 27°C (suhu ruang), karena pada suhu tersebut aktivitas desaturase murni dapat bertahan cukup lama (Tri-Panji *et al.*, 2001).

Hasil yang diperoleh pada Tabel 1 menunjukkan adanya penurunan aktivitas desaturase pada cairan enzim setelah amobilisasi dibandingkan dengan sebelum amobilisasi. Penurunan aktivitas desaturase tersebut disebabkan karena terikatnya enzim dalam padatan. Ini berarti bahwa proses amobilisasi desaturase dapat dilakukan pada kedua padatan. Penurunan aktivitas desaturase paling banyak terjadi pada cairan sisa amobilisasi menggunakan zeolit, yaitu sebesar 49.22 %, sedangkan pada cairan sisa amobilisasi menggunakan tulang hanya terjadi penurunan sebesar 17.41%. Rendahnya desaturase yang dapat diikat oleh tulang menunjukkan bahwa tulang kurang baik dalam menyerap enzim desaturase.

Tabel 1. Aktivitas cairan enzim sebelum dan setelah amobilisasi

Jenis Padatan	Aktivitas Enzim (g I_2/100g CPO.ml enzim.menit))						Pengurangan *) %
	Sebelum Amobilisasi			Setelah Amobilisasi			
	Enzim	Blanko	Enzim - Blanko	Enzim	Blanko	Enzim - Blanko	
Tulang	-0.15 ±0.02	-0.24 ±0.00	0.10	-0.18 ±0.02	-0.25 ±0.01	0.08	17.41
Zeolit	-0.15 ±0.02	-0.24 ±0.00	0.10	-0.25 ±0.02	-0.30 ±0.01	0.05	49.22

*) % Pengurangan = (Enzim-Blanko Sebelum - Enzim-Blanko Setelah)/ Enzim-Blanko Sebelum Amobilisasi x 100%

Perbedaan cukup tinggi antara tulang dan zeolit dalam penyerapan desaturase mungkin disebabkan oleh adanya ion Ca^{2+} yang terlepas dari zeolit setelah proses amobilisasi. Menurut Barrer (1978) zeolit alam mengandung atom Ca yang dapat lepas sebagai ion Ca^{2+}. Ca^{2+} diduga mengganggu aktivitas desaturase, sedangkan prosentase pengikatan enzim tersebut didasarkan pada selisih pengurangan aktivitas desaturase sebelum dan setelah amobilisasi.

Nilai negatif pada aktivitas cairan enzim mungkin disebabkan oleh pengaruh lain yang mengakibatkan turunnya bilangan iod. Reaksi tersebut diduga disebabkan oleh adanya air dan oksigen bebas. Air akan mempercepat terjadinya reaksi hidrolisis pada CPO, sedangkan oksigen bebas cenderung mengakibatkan reaksi oksidasi. Reaksi hidrolisa dan oksidasi tersebut akan merusak CPO (Ketaren, 1986). Aktivitas desaturase dihitung berdasarkan kenaikan bilangan iod sampel dibandingkan CPO awal. Mungkin aktivitas desaturase tidak mampu mengimbangi reaksi tersebut sehingga bilangan iod yang dihasilkan lebih rendah dibanding bilangan iod CPO awal. Kesimpulan bahwa enzim masih memiliki aktivitas ditunjukkan oleh bilangan iod blanko yaitu bilangan iod CPO yang diperlakukan dengan cairan blanko (tanpa enzim) yang bernilai negatif lebih besar dibandingkan sampel, atau penurunan aktivitas cukup banyak pada blanko dibandingkan pada cairan enzim.

Enzim diyakini masih memiliki aktivitas pada jam ke-48, meskipun tidak dapat dideteksi karena adanya reaksi lain yang bersifat sebaliknya dari kinerja desaturase.

Perbedaan kepolaran antara CPO dengan cairan enzim diduga kuat menyebabkan rendahnya aktivitas desaturase. Enzim dapat larut dalam air sedangkan CPO tidak. Perbedaan kelarutan tersebut dapat menyebabkan sedikitnya sisi aktif enzim yang berinteraksi dengan CPO.

Hasil pengujian untuk kadar protein (Tabel 2) yang dapat diserap oleh tulang menunjukkan nilai sebesar 0,28 mg/ml. lebih besar dibandingkan zeolit yang hanya sebesar 0,20 mg/ml. Berbeda dengan hasil uji aktivitas sebelum dan setelah amobilisasi, uji kadar protein menunjukkan keunggulan tulang dalam menyerap protein/enzim. Hasil analisis kadar protein tidak sejalan dengan uji aktivitas desaturase. Hal ini disebabkan pada analisis protein didapatkan besarnya kadar protein total yang meliputi protein enzim dan protein non enzim, sedangkan uji aktivitas hanya spesifik untuk desaturase. Terjadinya perbedaan dalam penyerapan tersebut dimungkinkan karena struktur tulang lebih mudah menyerap dan mengikat protein, sebagaimana terikatnya kolagen sebagai protein alami dalam tulang.

Tabel 2. Kadar protein cairan enzim sebelum dan setelah amobilisasi

Jenis Padatan	Kadar Protein (mg/ml)			% Teramo-bilisasi *)
	Sebelum	Setelah	Selisih	
Tulang	0.91 ± 0.05	0.63 ± 0.13	0.28	30.90
Zeolit	0.91 ± 0.05	0.71 ± 0.00	0.20	22.18

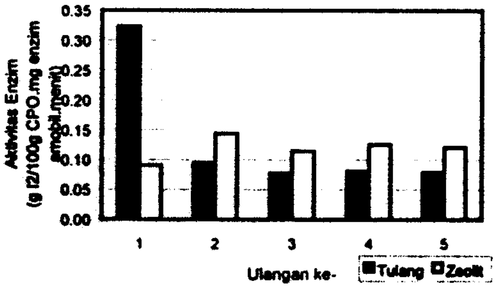
*) % Teramobilisasi = Selisih/Sebelum x 100%

Rendahnya penyerapan protein dalam padatan yang hanya 20 - 30% dimungkinkan karena sistem amobilisasi yang digunakan adalah adsorpsi, bukan pengikatan. Adsorpsi hanya menyerap secara fisik pada rongga yang ada, sehingga protein yang terikat rendah sekali. Proses pengadukan untuk amobilisasi yang hanya satu jam mungkin menyebabkan hanya sebagian enzim yang terikat pada tulang dan zeolit.

Pengujian terhadap aktivitas desaturase amobil untuk penggunaan berulang memungkinkan untuk mengetahui seberapa besar keefektifan proses pengikatan enzim dalam padatan agar dapat dipakai secara berulang-ulang. Pemakaian berulang-ulang memungkinkan dilakukan untuk enzim amobil mengingat enzim sebagai katalis tidak ikut bersama dengan substrat, melainkan terikat pada padatan.

Hasil pengujian pada aktivitas desaturase untuk pemakaian berulang menunjukkan adanya kestabilan dari ulangan pertama hingga kelima sebagaimana terlihat pada Gambar 1. Terjadinya perbedaan cukup berarti terjadi pada aktivitas enzim amobil dalam tulang pada ulangan ke-1 dengan aktivitas 0.32 g I_2/100 g CPO.mg enzim amobil.menit. Perbedaan yang cukup berarti pada amobilisasi dengan tulang tersebut mungkin disebabkan sebagian enzim yang teradsorbsi terlepas kembali. Pada ulangan ke-1 sebagian enzim yang tidak terikat sempurna lepas terbawa oleh CPO, sehingga aktivitasnya menurun.

Kemungkinan lain adalah tertutupnya sisi aktif enzim oleh substrat CPO pada ulangan ke-1 memungkinkan terjadinya penurunan aktivitas enzim pada tulang untuk ulangan ke-2 hingga ke-5. Enzim amobil juga dimungkinkan mengalami kejenuhan jika digunakan berulang-ulang.

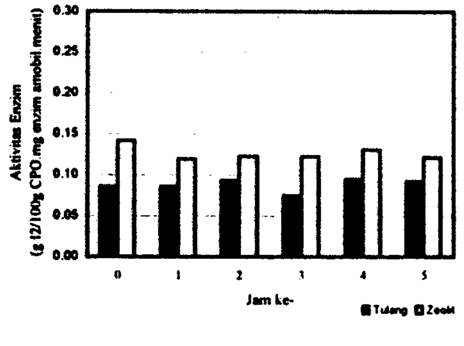


Gambar 1. Aktivitas enzim amobil untuk pemakaian berulang (setiap ulangan dilakukan

Salah satu kelebihan dari enzim amobil adalah dari kemudahan dalam menggunakan enzim sebagai biokatalisator secara berulang-ulang sehingga dapat menghemat biaya dan waktu jika dibandingkan dengan penggunaan enzim secara langsung. Kemampuan enzim untuk dipakai secara berulang-ulang ini juga dipengaruhi oleh banyaknya protein enzim teradsorpsi pada padatan tulang dan zeolit.

Pengujian aktivitas enzim secara sinambung dimaksudkan untuk mengetahui berapa lama enzim amobil dapat digunakan untuk proses terus menerus dengan umpan dan produk masuk dan keluar melalui suatu kolom. Sistem tersebut memungkinkan untuk digunakan dalam proses biokonversi secara otomatis.

Berdasarkan Gambar 2, pengujian yang dilakukan mulai jam ke-0 hingga jam ke-5 menunjukkan aktivitas yang cukup stabil. Aktivitas desaturase untuk sistem sinambung ini cenderung stabil untuk waktu selama lima jam karena kondisi proses berada dalam keadaan *steady*.

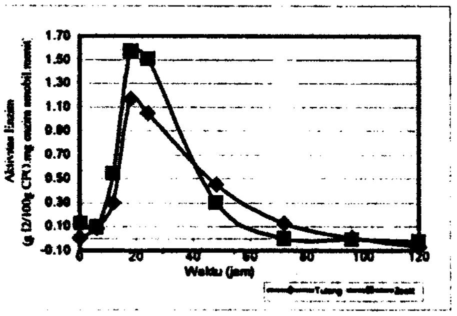


Gambar 2. Aktivitas desaturase pada padatan pendukung untuk sistem sinambung

Pada sistem sinambung, enzim amobil pada padatan tulang cenderung lebih kecil aktivitasnya dibandingkan pada zeolit. Hal yang sama juga terjadi pada data aktivitas desaturase untuk penggunaan berulang. Kecenderungan tersebut menunjukkan zeolit lebih baik dalam meningkatkan aktivitas enzim untuk sistem sinambung dan berulang.

Aktivitas desaturase sistem sinambung ini sangat berbeda jika dibandingkan dengan aktivitas desaturase untuk pemakaian berulang. Pada pemakaian berulang, ikatan enzim pada padatan tidak dapat dipertahankan kestabilannya dalam tulang, namun pada ulangan selanjutnya menunjukkan adanya kestabilan karena sistem telah mencapai kesetimbangan. Perbedaan teknis antara kedua sistem adalah adanya proses pengadukan dengan *vortex* pada pemakaian berulang, sedangkan pada sistem sinambung proses reaksi mengandalkan kontak CPO dengan padatan yang mengandung enzim. Sistem sinambung semenjak awal memperlihatkan adanya kesetimbangan karena proses konversi dirancang dalam keadaan setimbang antara kecepatan umpan yang masuk dengan kecepatan produk yang keluar, serta penahanan padatan dalam kolom tanpa proses pengadukan.

Hasil penelitian (Gambar 3) menunjukkan bahwa proses amobilisasi desaturase mampu mempertahankan kestabilan hingga 96 jam. Aktivitas desaturase amobil masih terdeteksi pada padatan tulang pada jam ke-72 sebesar 0.13 g I_2/100 g CPO.mg enzim amobil.menit, sedangkan pada padatan zeolit pada jam ke-48 sebesar 0.30 g I_2/ 100 g CPO.mg enzim amobil.menit. Pada pengujian berikutnya tidak memperlihatkan adanya aktivitas desaturase. Perbedaan waktu kestabilan menunjukkan perbedaan karakteristik tulang dan zeolit dalam mengikat dan mempertahankan enzim desaturase di dalamnya.



Gambar 3. Stabilitas desaturase untuk padatan tulang dan zeolit

Kestabilan desaturase amobil diatas lebih tinggi dibandingkan dengan yang pernah dilaporkan oleh Tri-Panji *et al.* (2001). Pada metoda yang digunakan Tri-Panji *et al.* (2001) digunakan sistem sentrifugasi bertingkat yang akan memisahkan fase mikrosom enzim sehingga terbebas dari pengganggunya. Metoda amobilisasi memungkinkan enzim tersimpan secara baik dan dalam fase amobil di dalam padatan. Proses amobilisasi memungkinkan enzim lainnya seperti protease yang diasumsikan merusak desaturase berada dalam keadaan terikat dalam padatan. Terikatnya enzim lain dalam padatan mengakibatkan sedikitnya kontak antara enzim desaturase dengan protease. Protease dan desaturase akan mudah bertumbukan di dalam media air.

Peningkatan aktivitas desaturase terlihat cukup tinggi pada pengujian jam ke-18, yaitu sebesar 1.17 dan 1.58 g I_2 /100 g CPO.mg enzim amobil.menit untuk masing-masing pada padatan tulang dan zeolit. Tingginya aktivitas itu menunjukkan bahwa proses amobilisasi cukup efektif dalam meningkatkan aktivitas desaturase. Tingginya aktivitas ini diduga berasal dari pengaruh air yang terdapat pada padatan pendukung tulang dan zeolit. Adanya air dalam suatu reaksi enzimatis sebenarnya diperlukan tetapi dalam jumlah sedikit. Menurut Zack dan Klibanov (1988) air yang diperlukan dalam suatu reaksi yang melibatkan lipid hanya diperlukan selapis (*monolayer*) dan tidak akan mengganggu aktivitas, bahkan akan meningkatkan aktivitas karena bertemunya sisi *hidrofobik* enzim dengan sisi *hidrofobik* CPO.

Tingginya aktivitas desaturase dalam padatan zeolit menunjukkan bahwa zeolit lebih baik digunakan sebagai padatan pendukung amobilisasi dibandingkan tulang. Keunggulan zeolit dalam meningkatkan aktivitas juga telah ditunjukkan dalam proses pemakaian berulang dan sistem sinambung. Kemungkinan penyebab tingginya aktivitas desaturase dalam zeolit adalah banyaknya sisi aktif enzim yang bertemu dengan CPO.

Tulang dan zeolit hanya mampu mempertahankan aktivitas enzim hingga 96 jam. Ketidakmampuan metode amobilisasi untuk menyimpan enzim dalam jangka waktu lama dimungkinkan karena adanya air dalam padatan. Penyimpanan dalam suhu 25°C (suhu ruang) memungkinkan terjadinya penguapan. Tidak adanya air menyebabkan kerusakan enzim, karena enzim memerlukan pelarut alaminya meski hanya satu lapis. Dalam kaitan ini perlu diuji aplikasi enzim tersebut dalam pelarut organik seperti yang dilakukan oleh Stark dan Holmberg (1989) untuk lipase.

Desaturase mengkatalisa perubahan asam lemak jenuh menjadi asam lemak tidak jenuh. Terdapat berbagai macam jenis desaturase, yaitu Δ^9, Δ^6, Δ^5, Δ^4 desaturase (Cahoon *et al.*. 1997). Penelitian Tri-Panji *et al.* (2001), memperlihatkan adanya aktivitas Δ^6 dan Δ^{12} desaturase di dalam biomasa dan cairan fermentasi *A. corymbifera*. Berdasarkan hasil analisis kromatografi gas (Tabel 3) terdapat aktivitas Δ^{12} desaturase dalam enzim amobil baik dalam padatan tulang maupun zeolit. Aktivitas Δ^{12} desaturase ditunjukkan oleh peningkatan konsentrasi asam linoleat pada CPO hasil biokonversi dengan enzim amobil dibandingkan CPO awal.

Tabel 3. Komposisi (%) asam lemak hasil analisis kromatografi gas pada padatan zeolit dan tulang

Nama Asam Lemak	Rumus	Jenis Sampel		
		CPO	Zeolit	Tulang
Asam Miristat	C14:0	1.33	0.74	0.82
Asam Palmitat	C16:0	38.96	30.18	29.70
Asam Stearat	C18:0	2.33	37.94	33.22
Asam Oleat	C18:1	40.35	-	-
Asam Linoleat	C18:2	14.02	31.14	36.25
Asam Linolenat	C18:3	2.99	-	-

Tidak terdapatnya asam oleat (C18:1) pada CPO yang telah diinkubasikan dengan enzim amobil dalam padatan tulang dan zeolit menunjukkan adanya aktivitas enzim Δ^{12} desaturase yang mengubah asam oleat (C18:1) menjadi asam linoleat (C18:2). Enzim ini mengkatalisis pembentukan ikatan rangkap terjadi pada rantai karbon no 12.

Aktivitas Δ^{6} desaturase tidak terdeteksi pada penggunaan enzim amobil dalam tulang maupun dalam zeolit, berbeda dengan yang dilaporkan oleh Tri-Panji *et al.* (2001). Tidak terdeteksinya Δ^{6} desaturase diperlihatkan dengan tidak terdapatnya asam linolenat (C18:3) dalam CPO yang telah diinkubasikan dengan enzim amobil dalam tulang atau zeolit. Aktivitas Δ^{6} desaturase kemungkinan belum aktif karena asam linoleat sebagai substratnya masih diproduksi oleh Δ^{12} desaturase.

Asam linolenat (C18:3) mudah teroksidasi sehingga mungkin rusak selama penyimpanan atau preparasi untuk analisis kromatografi gas. Pada penelitian Tri-Panji *et al.* (2001) asam linolenat berhasil dideteksi pada hasil biokonversi asam linoleat.

Tulang dan zeolit merupakan padatan yang terbukti mampu mengamobilisasi enzim desaturase. Proses amobilisasi yang telah dilakukan merekomendasikan tulang dan zeolit untuk digunakan sebagai padatan pendukung seperti halnya arang aktif (Chibata, 1978) dan silika gel (Maeda *et al.*, 1997).

Zeolit memiliki keunggulan dalam mengikat enzim desaturase dibandingkan tulang berdasarkan data penurunan aktivitas desaturase zeolit mampu mengikat aktivitas desaturase hingga 49.22% dibandingkan tulang hanya 17.41% (Tabel 4).

Secara teknis padatan tulang dan zeolit mampu mengamobilisasi enzim desaturase karena sifat fisik kedua padatan tersebut. Secara alami, tulang dalam mahluk hidup digunakan sebagai tempat menempelnya kolagen dan protein lainnya. Tulang memiliki rongga-rongga kosong di dalamnya, sehingga adsorpsi enzim dapat berlangsung. Zeolit sering digunakan sebagai media penukar ion dalam penjernihan air. Zeolit juga memiliki rongga-rongga kosong seperti tulang sehingga memungkinkan diadakan proses adsorpsi enzim.

Tabel 4. Perbandingan setiap padatan pendukung

Jenis Padatan	Penurunan Aktivitas Desaturase [a]	Aktivitas Enzim Amobil pada jam ke-18 [b]	Cairan Enzim Teramobilisasi dalam Padatan [c]
Tulang	17.41	1.17	30.90
Zeolit	49.22	1.58	22.18

Ket. [a] : Persen (%)
[b] : g L/100 g CPO.mg enzim amobil.menit
[c] : Persen (%)

Desaturase merupakan enzim yang dapat digunakan untuk proses pangan karena erat kaitannya dengan produk minyak goreng dan farmasi. Salah satu syarat dalam proses pangan adalah keamanan bahan seperti tidak adanya racun. Tulang berasal dari mahluk hidup dan aman untuk digunakan sebagai padatan amobilisasi. Zeolit selama ini sering digunakan dalam penjernihan air sehingga juga aman digunakan untuk proses pangan.

KESIMPULAN

Amobilisasi desaturase dari ekstrak kasar biomassa sel *A. corymbifera* dengan padatan pendukung tulang dan zeolit berhasil meningkatkan aktivitas dan kestabilan enzim tersebut.

Penggunaan enzim teramobilisasi pada kedua padatan pendukung untuk penggunaan berulang memberikan hasil yang stabil kecuali untuk hasil amobilisasi dengan padatan tulang pada ulangan pertama. Pemakaian enzim amobil untuk sistem sinambung untuk kedua padatan pendukung memberikan hasil yang stabil. Teknik biokonversi menggunakan desaturase amobil ini diharapkan dapat dikembangkan untuk produksi asam γ-linolenat (GLA) yang bernilai ekonomi tinggi dari asam linoleat.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analiytical Chemist. Vol II A. AOAC Int., Washington. 4 : 17-19.

Bakrie, A. 1998. Trilyunan Rupiah per Tahun Nilai Komponen Aktif Alami dalam Minyak Sawit Terbuang Percuma. Makalah Seminar Nasional Minyak Sawit, Jakarta 24 Februari 1998.

Barrer, R.M. 1978. Zeolit and Clay Minerals as Sorbants and Moleculer Sieves. Academic Press, London. 495 pp.

Biagi, P. L., A. Bordoni M. Masi, G. Ricci, C. Fanelli, A. Patrizi dan F. Ceccolini. 1988. Evening Primose Oil (Efanol) in The Treatment of Children with Atopic Eczema. J. Drug Exptl. Clin. Res. 14: 291-297.

Cahoon, E. B., S. Shah, J. Shanklin, dan J. Browse. 1998. A Determinant of Substrate Specificity Predicted from The Acyl-carrier Protein Desaturase of Developing Cat's Claw Seed. J. Plant. Physiol. 117: 593-598.

Chibata, I. 1978. Immobilized Enzymes. Kodansha LTD. Tokyo.

Djojosoebagio, S. 1997. The Effect of Palm Oil on The Level of Serum Lipoprotein in Rabbit. Makalah Poster Sarasehan Sehari Penelitian Kelapa Sawit 7 PAU Biosains, Yogyakarta 28 November 1996.

Horrobin, D. F. 1983. The Role of Essential Fatty Acid and Prostagladins in The Premenstrual Syndrome. J. Reprod. Med. 28:465-468.

Ishikawa, T., Y. Fujiyama, C. Igarashi, M. Morino, N. Fada, A. Kagami, T. Sakamoto, N. Nagano dan H. Nakamura. 1989. Clinical Feature of Familial Hypercholesterolemia. J.Atheroclerosis 75:95

James, P. dan M. D. Carter. 1988. Gamma Linolenic Acid as A Nutrient. J.Food Technol. 42: 72-82.

Ketaren, S. 1986. Minyak dan Lemak Pangan, UI Press. Jakarta.

Lapinskas P. 1993. Oil Crops for The Pharmaceutical Industry in Seed Storage Coumpounds: Biosynthesis. Interactions and manipulation. Oxford University Press.

Lowry, O.H., N.J. Rose-Brough, A.L. Farr dan R.J. Randall. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagen. J. Biol. Chem. 193:265-275

Maeda, R., H. Tomida, M. Matumoto, dan K. Kondo. 1997. Novel Immobilization of Enzyme in Molecular Assembly of Nonionic Surfactant Adsorved on Silica Gel, J. Chem. Eng. Japan. 30: 910-916

Muderhwa, J. M., R. Ratomahenina, M. Pina, J. Graille dan P. Galzy. 1985. Purification and Properties of The Lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. J.Am. Oil. Chem.Soc. 62 : 1031-1036.

Negishi, S., S. Sato, S. Mukataka and J. Takahashi. 1989. Utilization of Powdered Pig Bone as A Support for Immobilization of Lipase. J. Ferment. Bioeng. 67: 350-355.

Oshino, N. dan R. Sato, 1972. The Dietary Control of The Microsomal Stearyl CoA Desaturation Enzyme System in Rat Liver. J. Arch. Biochem. Biophys. 149: 369-377.

Ozols, J. 1997. Degradation of Hepatic Stearyl CoA Δ^9-desaturases. J. Mol. Biol. Cell. 8: 2281-2290.

Serrano-Carreon, L., Y. M. Hathout, Bensoussan dan J.M. Berlin. 1993. Metabolism of Linolenic Acid or Mavalonate and 6-pentyl-α-pyrone Biosynthesis by *Trichoderma* Species. J. Appl. Env. Microb. 59: 2945-2950

Stark, M. dan K. Holmberg. 1989. Covalent Immobilization of Lipase in Organic Solvents. J.Bioteh. Bioeng. 34: 942-950

Suzuki, O. 1991. Recent Trends of Oleochemical by Biotechnology. PORIM International Palm Oil Conference Chemistry and Technology Malaysia: 221-230.

Tri-Panji, A.W. Paulus, K. Syamsu, A. M. Fauzi dan Suharyanto. 2001. Stabilisasi Desaturase dari *Absidia corymbifera*. Makalah untuk *Menara Perkebunan*, Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor.

Tri-Panji, Suharyanto, K. Syamsu, dan E. Herlina. 2001. Peningkatan Ketidakjenuhan Lipid Menggunakan Enzim Desaturase Asal Fungi. Prosiding Temu Ilmiah Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia, 24-25 Juli 2001: 9-17.

Tri-Panji. 1997. Growth and The Content of Polyunsaturated Fatty Acids of *Absidia corymbifera* Biomass on Media Containing Crude Palm Oil. Menara Perkebunan 65 : 104-110.

Zacks, A. dan Klibanov A.M. 1988. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. J. Biol.Chem. 263: 8017-8021