Menara Perkebunan, 2005 , 73(2), 63-73.

Biokonversi minyak sawit kasar menggunakan desaturase amobil sistem curah pada skala semipilot

Bioconversion of crude palm oil using immobilized desaturase in batch system at semi pilot scale

TRI-PANJI [1)], SUHARYANTO [1)], GUNAWAN [2)] & Khaswar SYAMSU [2)]

[1)] Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor, 16151, Indonesia
[2)] Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

Summary

Increasing unsaturation level of crude oil palm (CPO) could be carried out by using desaturase enzyme of Absidia corymbifera*. This biocatalyst could also produce polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as gamma linolenic acid that beneficial for healthy oil. The objective of this research was to determine the optimum contact time and ratio of immobilized desaturase enzyme-substrate in batch system at semi pilot scale (5,000-15,000 mL). Desaturase was extracted from* A. corymbifera *biomass and immobilized on activated zeolite (3-6 mm). Immobilized enzymes were then used for bioconversion process in batch system by mixing the enzyme with CPO in a bottle placed horizontally then rotated using a rotator machine at room temperature (25-30°C). The result showed that optimum contact time with ratio immobilized enzyme-substrate 1:1; 1:2; and 1:3 were 30, 40, and 50 min resulted in increasing iodine number 2.84; 3.94; and 4.46 g I_2/100 g CPO, respectively. An optimum enzyme-subtrate ratio was achieved at 1:2, resulted in increasing of iodine number 9-11 g I_2/100 g CPO, product recovery of 17,000 mL (21 batches) up to 18 hours. It was detected that active desaturases during CPO bioconversion were Δ^6, Δ^9, and Δ^{12} desaturases as shown by the increase of oleic (4.5%), linoleic (0,85%) and linolenic acids (60.7%).*

[*Keywords*: Crude palm-oil, batch-system bio-conversion, immobilized desaturase, polyunsaturated fatty-acid, gamma-linolenic acid, *Absidia corymbifera*]

Ringkasan

Peningkatan ketidakjenuhan minyak sawit kasar (*crude palm oil,* CPO) dapat dilakukan dengan enzim desaturase *Absidia corymbifera*. Biokatalis ini juga mampu menghasilkan asam lemak tidak jenuh majemuk (*polyunsaturated fatty acids, PUFA*) yang bermanfaat untuk kesehatan seperti asam gamma linolenat (GLA). Tujuan penelitian adalah menetapkan waktu kontak dan nisbah enzim desaturase amobil-substrat optimum dalam sistem curah pada skala semipilot (5.000-15.000 mL). Desaturase di-ekstraksi dari biomassa *A. corymbifera* dan diamobilisasi pada zeolite (3-6 mm) yang telah diaktivasi. Enzim amobil kemudian digunakan untuk proses biokonversi dalam sistem curah dengan cara mencampurkan dengan CPO dalam botol yang diletakkan secara horizontal kemudian diputar dengan mesin rotator pada suhu ruang (25-30°C). Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu kontak optimum enzim desaturase-substrat dengan nisbah 1:1; 1:2; dan 1:3 adalah 30, 40, dan 50 menit dan menghasilkan peningkatan bilangan iod berturut-turut sebesar 2,84; 3,94;

dan 4,46 g I_2/100 g CPO. Nisbah enzim-substrat optimum dalam proses biokonversi CPO adalah 1:2 yang menghasilkan peningkatan bilangan iod 9-11 g I_2/100 g CPO dan perolehan produk 17.000 mL (21 kali curah) selama 18 jam pemakaian. Penelitian juga dapat mendeteksi bahwa desaturase yang aktif selama proses biokonversi CPO adalah Δ^6, Δ^9, dan Δ^{12} desaturase yang ditunjukkan oleh peningkatan asam oleat (4,5%), linoleat (0,85%) dan linolenat (60,7%).

Pendahuluan

Tingginya kandungan asam lemak jenuh khususnya asam palmitat, C:16, (45-52%) dalam minyak sawit kasar menyebabkan jumlah fraksi yang dapat diubah menjadi minyak goreng cair hanya sekitar 42% dari total volume CPO (Muderhwa *et al*., 1985). Kandungan asam lemak jenuh yang tinggi juga berpengaruh negatif terhadap mutu minyak goreng yang dihasilkan seperti rendahnya bilangan iod, titik keruh dan titik pelunakan. Di lain pihak, asam lemak tak jenuh tunggal maupun majemuk dinilai sebagai *healthy oil*. Untuk meningkatkan kandungan asam lemak tak jenuh dalam CPO antara lain dapat dilakukan dengan bantuan enzim desaturase.

Desaturase adalah enzim yang berfungsi mengkatalisis pembentukan ikatan rangkap rantai karbon asam lemak dan berperan dalam pembentukan asam-asam lemak tak jenuh tunggal maupun majemuk (Cahoon *et al*., 1998). Aplikasi enzim desaturase dapat dilakukan melalui rekayasa genetika dengan kloning dan transformasi gen desaturase dalam tanaman (Cahoon *et al*., 1998; Knutzon *et al*., 1998), serta optimasi produksi menggunakan fungi penghasil desaturase khususnya dari ordo Mucorales, kelas Zygomycetes (Immelman *et al*., 1997) seperti *Mucor* sp., *Absidia* sp., *Rhizopus* sp. dan *Syncephalastrum* sp. Teknik biokonversi ini tidak memerlukan tahapan panjang untuk produksi PUFA seperti halnya cara kloning gen pada tanaman, karena memanfaatkan enzim desaturase yang dihasilkan oleh fungi yang relatif cepat pertumbuhannya.

Pada penelitian sebelumnya Tri-Panji (1997) membuktikan bahwa cairan fermentasi *A. corymbifera* mampu meningkatkan bilangan iod CPO. Cairan fermentasi ini juga mengubah asam oleat menjadi linoleat (LA) dan LA menjadi asam gamma linolenat (C18:3, ω-6, atau GLA). Peningkatan bilangan iod oleh aktivitas desaturase diduga tidak hanya berasal dari perubahan asam oleat menjadi LA dan LA menjadi GLA, tetapi juga oleh perubahan asam lemak lainnya yang mengalami peningkatan ketidakjenuhan. Hal tersebut berarti cairan fermentasi fungi mengandung enzim desaturase, termasuk Δ^6 dan Δ^{12} desaturase. Aktivitas enzim Δ^6 desaturase pada mikroba penghasil GLA pernah dilaporkan oleh Suzuki (1991). GLA memiliki arti penting bagi dunia medis dan farmasi, antara lain untuk menurunkan kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) bagi penderita hiperkolesterolemia (Ishikawa *et al*., 1989; James & Carter, 1988). GLA murni dijual di dalam kemasan ampul 100 mg dengan harga US $ 125 sedangkan GLA dalam bentuk *crude* berkadar 10% dalam campuran dengan asam palmitat, stearat, oleat dan linoleat dijual dengan harga US$ 130 per 100 g (Sigma, 2004).

Enzim desaturase pada penelitian sebelumnya dapat diamobilisasi dengan butiran tulang sapi dan zeolit untuk meningkatkan kestabilannya dalam proses biokonversi enzimatis tersebut pada skala laboratorium (Tri-Panji *et al*., 2002).

Tahapan percobaan skala semipilot dan pilot perlu dilakukan sebelum biokonversi enzimatis tersebut dapat diaplikasikan pada skala industri. Penelitian bertujuan menetapkan waktu kontak dan nisbah antara jumlah desaturase amobil dengan substrat yang optimum pada biokonversi CPO dengan sistem curah pada skala semipilot untuk meningkatkan tingkat ketidakjenuhan CPO. Penelitian ini memiliki arti penting untuk menghasilkan asam lemak yang bermanfaat dalam dunia medis dan farmasi, serta memiliki nilai ekonomi tinggi.

Bahan dan Metode

Kultur fungi dan persiapan inokulum

Absidia corymbifera untuk produksi desaturase berasal dari koleksi kultur Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) dan dipelihara dalam medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring. Inokulum ditumbuhkan dalam labu Erlenmeyer 500 mL berisi 200 mL medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) yang diinokulasikan dengan dua *loop* spora dan miselium *A. corymbifera* dari kultur PDA miring umur 72 jam. Kultur diinkubasi pada suhu ruang (25-30^{0}C) dengan inkubator bergoyang pada kecepatan 100 rpm selama tiga hari dan selanjutnya dipanen untuk sumber inokulum kultur medium fermentasi.

Fermentasi A. corymbifera

Medium fermentasi menggunakan medium sintetik Serrano-Careon *et al.* (1993) dengan molases 3% (v/v) sebagai sumber karbon dan keasamannya diatur pada pH 5,0 dengan HCl 0,1 N. Fermentasi dilakukan dengan kultur permukaan metode Tri-Panji (1997).

Medium fermentasi (500 mL) diletakkan pada bak plastik 40x30x4 cm^3 yang telah disterilisasi permukaan dengan larutan NaClO 5,25% selama 20 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan akuades steril. Medium fermentasi diinokulasi dengan 10% suspensi kultur *A. corymbifera.* Inkubasi dilakukan selama 3-5 hari di dalam fermentor kultur permukaan yang terbuat dari kaca berukuran 85 x 65 x 105 cm^3 dan diaerasi dengan udara steril dari pompa aerator. Lapisan biomassa miselium fungi yang tumbuh di permukaan medium dipanen menggunakan penjepit, kemudian dicuci dengan akuades sampai bersih dan selanjutnya digunakan untuk isolasi enzim desaturase.

Isolasi dan amobilisasi enzim desaturase

Ekstrak kasar enzim desaturase diisolasi dengan pemecahan sel fungi menggunakan blender dan penambahan salin bufer fosfat (PBS) pH 7,2 dengan nisbah biomassa : PBS = 1 : 2 (b/v). Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Ekstrak enzim kasar dipisahkan dari pecahan sel dengan penyaringan menggunakan kertas saring pada corong Buchner dan dibantu dengan pompa vakum. Supernatan yang berisi ekstrak kasar desaturase diamobilisasi untuk pengujian lebih lanjut.

Amobilisasi desaturase dilakukan dengan zeolit mengikuti metode Negishi *et al*. (1989) dengan beberapa modifikasi. Butiran zeolit berdiameter 3-6 mm dicuci bersih dengan air, kemudian direndam dalam larutan NaCl 1 M untuk menghilangkan ion Ca^{2+}. Zeolit kemudian dipanaskan di dalam oven pada suhu 220^{o}C selama empat jam dan didinginkan pada suhu ruang. Zeolit yang telah diaktivasi ini kemudian dimasukkan ke dalam botol berwarna cokelat kapasitas 2,5 L dan diisi dengan larutan enzim dengan nisbah 100 g zeolit : 200 mL larutan enzim. Campuran dikocok selama satu jam pada kecepatan 180 rpm dan suhu 25^{o}C.

Banyaknya enzim yang teramobilisasi ditentukan berdasarkan perbedaan konsentrasi protein larutan enzim sebelum dan setelah penambahan zeolit dengan metode Lowry (1951), serta perbedaan aktivitas desaturase yang ditentukan berdasarkan analisis bilangan iod (AOAC, 1995).

Optimasi waktu kontak enzim amobil-substrat

Waktu kontak nisbah enzim amobil-substrat CPO 1:1; 1:2; dan 1:3 ditentukan untuk memperoleh proses biokonversi CPO yang optimum dengan sistem curah pada skala semipilot. Enzim amobil-substrat dalam ketiga macam nisbah tersebut dimasukkan dalam botol volume 2,5 L. Campuran tersebut dikocok dengan menggunakan rotator pada suhu ruang selama dua jam. Sampel diambil setiap 10 menit dan ditentukan bilangan iodnya. Waktu kontak optimum dipilih berdasarkan waktu kontak yang menghasilkan pening-katan bilangan iod terbesar.

Optimasi biokonversi CPO dengan desaturase amobil sistem curah

Tahapan ini dilakukan untuk mengetahui daya tahan enzim amobil jika digunakan pada proses curah secara berulang, dengan cara mengganti substrat (CPO) setiap waktu kontak optimum tercapai. Enzim amobil dan CPO dicampurkan dengan nisbah 1:1; 1:2; dan 1:3. Masing-masing campuran dimasukkan ke dalam botol silindris bervolume 2,5 L, kemudian diputar dengan rotator sampai waktu optimum tercapai. CPO dari masing-masing botol dikeluarkan, diganti dengan CPO yang baru, kemudian diputar kembali dengan rotator sampai waktu optimum tercapai. Percobaan penggantian CPO hasil biokonversi dengan CPO segar dilakukan berulang-ulang sampai enzim desaturase amobil diperkirakan tidak lagi menyebabkan peningkatan bilangan iod yang nyata yaitu sampai 24 jam. Penetapan bilangan iod dilakukan terhadap hasil biokonversi pada jam ke-0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, dan 24.

Nisbah enzim amobil-substrat optimum ditetapkan atas dasar peningkatan bilangan iod terbesar dengan jumlah enzim amobil minimum. Dalam penelitian ini, blanko digunakan untuk melihat kenaikan bilangan iod atau ketidakjenuhan dibandingkan dengan CPO tanpa perlakuan, sedangkan kontrol digunakan untuk melihat perubahan bilangan iod atau ketidakjenuhan karena faktor non enzim. Percobaan optimasi waktu kontak dan nisbah enzim amobil-substrat dilakukan dengan dua ulangan.

Analisis produk biokonversi

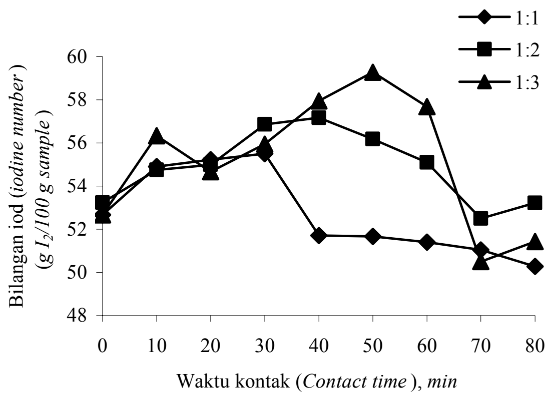
Produk biokonversi diukur berdasarkan peningkatan bilangan iod. Sebanyak 1 mL fraksi enzim atau ekstrak protein ditambahkan 2 g CPO dalam tabung reaksi. Campuran enzim dan CPO tersebut diinkubasikan pada suhu 25^{o}C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan uji bilangan iod pada sampel yang telah mengalami reaksi enzimatis dengan metode AOAC (1995). Blanko yang digunakan adalah CPO tanpa perlakukan, sedangkan sebagai kontrol digunakan CPO yang diperlakukan seperti sampel tetapi tanpa enzim desaturase. Produk biokonversi dengan peningkatan bilangan iod tertinggi selanjutnya ditentukan nilai bilangan peroksida, bilangan penyabunan, bilangan asam, serta komposisi asam lemaknya. Penentuan komposisi asam lemak dilakukan dengan metode kromatografi gas (Tri-Panji, 1997). Sampel CPO dalam bentuk metil ester asam lemak (0,5 µL) diinjeksikan pada alat kromatogafi gas (Perkin Elmer) dengan dimensi kolom kapiler FFAP (25 m x 0,25mm i.d) yang dijalankan dengan pengaturan kondisi suhu injektor 225^{o}C dan suhu kolom isoterm 200^{o}C. Detektor *Flame Ionization Detector* (FID) dioperasikan pada suhu 300^{o}C. Gas pembawa yang digunakan adalah gas nitrogen (N_2) dengan kecepatan alir melewati kolom 1 mL/menit.

Hasil dan Pembahasan

Optimasi waktu kontak enzim amobil-substrat

Hasil percobaan optimasi biokonversi CPO skala semipilot (5.000-15.000 mL) menunjukkan bahwa waktu kontak optimum untuk nisbah enzim amobil-substrat 1:1; 1: 2; dan 1:3 berturut-turut adalah 30, 40, dan 50 menit (Gambar 1). Waktu kontak yang lebih lama menyebabkan bilangan iod cenderung menurun yang mungkin disebabkan oleh inaktivasi enzim akibat penghambatan umpan balik atau mungkin oleh oksidasi ikatan rangkap C=C yang telah terbentuk. Hasil tersebut sama dengan yang diperoleh pada penelitian sebelumnya dalam skala laboratorium (250 mL) (Tri-Panji *et al*., 2002). Waktu kontak enzim amobil-substrat optimum dipengaruhi oleh nisbah enzim amobil-substrat. Peningkatan kadar substrat sampai tingkat maksimum (Km) akan meningkatkan laju reaksi enzimatis hingga dicapai laju reaksi ½ Vmaks (Dixon & Webb, 1979). Perubahan bilangan iod yang cukup tinggi diperoleh pada nisbah enzim amobil-substrat 1:2 dan 1:3 yaitu masing-masing sebesar 3,9 dan 4,5 g I_2/ 100 g CPO. Tingginya perubahan bilangan iod tersebut menunjukkan bahwa enzim desaturase teramobilisasi dalam zeolit dengan baik. Hal tersebut ditunjukkan oleh hasil analisis kadar protein dan aktivitas desaturase dari larutan enzim tertinggal sesudah diserap dengan zeolit yang menurun masing-masing sebesar 31% dan 46,15%. Amobilisasi desaturase dengan zeolit juga lebih mudah dilakukan dan memiliki konsistensi hasil yang lebih baik dibandingkan dengan amobilisasi menggunakan serbuk tulang seperti yang dilakukan untuk lipase oleh Negishi *et al*., (1989).

Waktu kontak enzim amobil-substrat optimum digunakan untuk memberikan batasan waktu penggantian CPO selama proses biokonversi sistem curah berlangsung. Waktu kontak 30 menit menghasilkan nilai maksimum peningkatan bilangan iod dari sekitar 53 menjadi 55-57 pada ketiga macam nisbah enzim amobil-substrat (1:1, 1:2 dan 1:3). Dengan waktu kontak yang pendek tersebut juga berarti bahwa selama periode tertentu, yaitu selama enzim desaturase masih aktif akan banyak jumlah substrat yang dapat dibiokonversi. Waktu kontak 30 menit dipilih untuk optimasi biokonversi pada percobaan selanjutnya.



Gambar 1. Waktu kontak optimum pada proses desaturasi CPO dengan sistem curah skala semipilot dengan beberapa nisbah enzim desaturase amobil-substrat. Proses desaturasi diukur berdasarkan peningkatan bilangan iod CPO hasil biokonversi. Nisbah enzim amobil-substrat: -♦- 1:1; -■- 1:2 dan -▲- 1:3.

Figure 1. Optimum contact time for CPO desaturation process in batch system at semipilot scale with several ratio of immobilized desaturase enzyme- substrate. Desaturation process was measured based on increasing of iodine number of CPO resulted from bioconversion. Ratio of immobilized immobilized enzyme-substrate: -♦- 1:1; -■- 1:2 and -▲- 1:3.

Optimasi proses biokonversi sistem curah pemakaian berulang

Pengujian aktivitas desaturase amobil pada pemakaian berulang sistem curah dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan enzim tersebut meningkatkan ketidak-jenuhan asam lemak pada CPO dan jumlah produk biokonversi yang diperoleh. Enzim desaturase amobil dapat digunakan secara berulang karena enzim sebagai katalis telah terikat dalam matriks padatan (zeolit) sehingga tidak ikut bersama substrat. Hasil biokonversi CPO oleh enzim desaturase amobil dengan nisbah enzim amobil-substrat 1:1 (Gambar 2a) menghasilkan peningkatan bilangan iod maksimum sebesar 7,51g I_2/100 g CPO yang dicapai setelah enam jam atau pemakaian sembilan kali curah (penggantian CPO baru). Bilangan iod relatif stabil hingga jam ke-18 (27 kali pemakaian) dan menurun tajam setelah 24 jam atau 30 kali pemakaian.

Peningkatan bilangan iod tertinggi diperoleh pada nisbah enzim amobil-substrat 1:2 (Gambar 2b). Perubahan bilangan iod maksimum adalah 10,31 g I_2/100 g CPO yang dicapai pada jam keempat (empat kali pemakaian). Bilangan iod relatif stabil hingga jam ke-18 (21 kali pemakaian) dan mulai menurun setelah 24 jam atau 24 kali pemakaian.

Penggunaan enzim amobil-substrat dengan nisbah 1:3 menghasilkan peningkatan bilangan iod yang stabil sampai jam ke-18. Peningkatan bilangan iod CPO tertinggi yaitu 7,02 g I_2/100 g CPO diperoleh setelah tiga jam. Namun, perubahan bilangan iod pada jam pertama dan kedua memperlihatkan penurunan (Gambar 2c). Penyebab penurunan ini tidak diketahui dengan pasti, tetapi kemungkinan disebabkan oleh kadar air yang tinggi dari desaturase yang teramobilisasi pada zeolit sehingga menghalangi kerja enzim tersebut. Enzim yang terlarut dalam air dan bersifat polar mengakibatkan sebagian sisi aktif enzim terhalang untuk melakukan kontak dengan substrat. Menurut Gunstone *et al*. (1986) asam lemak tak jenuh bersifat lebih polar dari pada asam lemak jenuh sehingga sebagian asam lemak tak jenuh dalam CPO larut dalam air. Dengan demikian akan terjadi penurunan jumlah asam lemak tak jenuh dalam substrat yang mengakibatkan penurunan bilangan iod substrat. Hal tersebut terlihat pada bilangan iod CPO kontrol yang mengalami penurunan cukup besar. Air tersebut berangsur-angsur akan hilang karena penguapan dan terlihat perubahan bilangan iod menjadi positif.

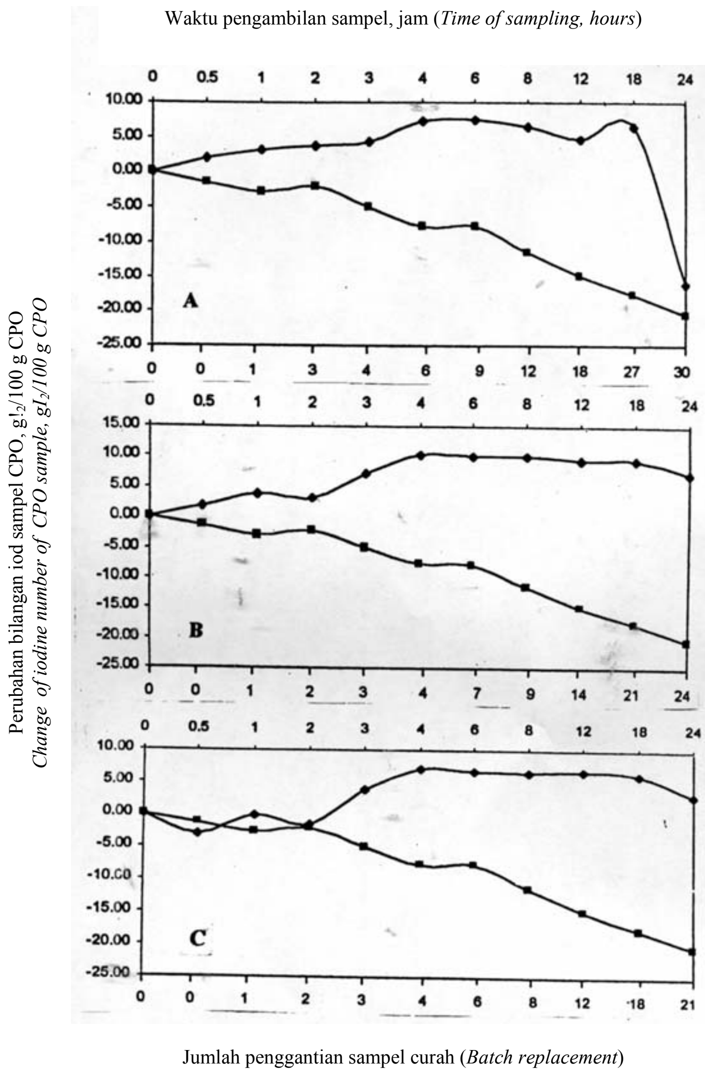
Hasil biokonversi CPO dengan ketiga macam nisbah enzim amobil-substrat (Gambar 2) adalah selisih bilangan iod sampel dengan blanko. Hasil biokonversi akan lebih tinggi bila diekspresikan sebagai selisih antara perlakuan dengan kontrol karena nilai bilangan iod pada kontrol mengalami penurunan. Artinya, terdapat selisih yang cukup besar antara bilangan iod CPO diperlakukan dengan enzim desaturase dengan CPO kontrol. Hal tersebut nyata disebabkan oleh kerja enzim desaturase. Namun, ada faktor non enzim yang berpengaruh negatif terhadap CPO yang diperlakukan.

Hasil analisis perubahan bilangan iod rata-rata pada ketiga macam nisbah enzim amobil-substrat menunjukkan bahwa nisbah enzim amobil-substrat 1:2 (b/v) merupakan kombinasi optimum karena menghasilkan perubahan bilangan iod paling tinggi (9-11) dengan nisbah enzim amobil-substrat terendah (Tabel 1). Selain itu, nisbah enzim

Tabel 1. Ringkasan data dalam penentuan nisbah enzim amobil-substrat optimum untuk biokonversi CPO dengan sistem curah pada skala semipilot.

Table 1. Data summary in determination of optimum immobilized enzyme-substrate ratio for bioconversion of CPO in batch system at semipilot scale.

Nisbah enzim amobil-substrat *Immobilized enzyme-subtrate ratio*	Waktu enzim stabil, jam *Time of stable enzyme, hours*	Perubahan bilangan iod rata-rata *Average change of iodine number*	Jumlah pemakaian, *Batch replacement*	Volume produk *Volume of product* (mL)
1:1	4-18	4-8	27	10.500
1:2	4-18	9-11	21	17.000
1:3	4-18	6-8	18	21.000



Gambar 2. Perubahan bilangan iod sampel pada proses biokonversi CPO menggunakan desaturase amobil sistem curah skala semipilot dengan nisbah enzim amobil-substrat (A) 1:1 ; (B) 1:2 ; (C) 1:3 (–♦–) ; dan kontrol (–■–).

Figure 2. Change of iodine number in CPO bioconversion process using immobilized desaturase in batch system at semipilot scale with ratio of immobilized enzyme-substrate (A) 1:1 ; (B) 1:2; (C) 1:3 (–♦–); and the control (–■–).

amobil-substrat 1:2 (b/v) juga dapat dipakai 21 kali dengan jumlah produk 17.000 mL selama 18 jam. Produk yang dihasilkan sedikit lebih rendah (19%) dibandingkan produk biokonversi dengan nisbah enzim amobil-substrat 1:3, yaitu 21.000 mL. Namun, selisih produk yang dihasilkan dapat diimbangi dengan selisih perubahan bilangan iod rata-rata antara nisbah enzim amobil-substrat 1:2 dan 1:3, yaitu 32%. Dari segi kuantitas, teknik biokonversi dengan desaturase amobil ini lebih baik dibandingkan teknik inkorporasi asam linoleat menjadi GLA seperti yang dilakukan oleh Kamikasa *et al.* (1990).

Analisis mutu dan komposisi asam lemak CPO hasil biokonversi

Hasil analisis mutu CPO produk bio-konevrsi dibandingkan dengan CPO blanko (Tabel 2) menunjukkan bahwa bilangan peroksida CPO hasil biokonversi dapat ditekan dari 2,87 mg/kg menjadi 2,41 mg/kg yang berarti asam lemak tidak jenuh yang terbentuk lebih banyak dari pada asam

Tabel 2. Hasil analisis mutu dan komposisi asam lemak CPO hasil biokonversi dengan nisbah enzim desaturase amobil-substrat 1:2 (b/v).

Table 2. Result of analysis of CPO quality and fatty acid composition after bioconversion with ratio of immobilized desaturase enzyme-substrate 1:2 (w/v).

Analisis mutu dan komposisi asam lemak CPO *Quality analysis and fatty acid composition of CPO*	Satuan *Unit*	Blanko CPO *Blank*	CPO hasil biokonversi pada kondisi optimum *CPO from bioconversion at optimum condition*
Mutu CPO (*CPO quality*)			
Bilangan iod (*Iodine number*)	g I_2/100 g CPO	45,91	56,22
Bilangan peroksida (*Peroxide number*)	mg/kg	2,87	2,41
Bilangan asam (*Acid number*)	mg KOH/g	0,38	0,55
Bilangan penyabunan (*Soap number*)	mg KOH/g minyak	191,66	185,14
Komposisi asam lemak CPO (*Fatty acid composition of CPO*)			
Asam laurat (*Lauric acid*) (C 12:0)	%	0,24	0,21
Asam miristat (*Myristic acid*) (C 14:0)	%	1,34	1,13
Asam palmitat (*Palmitic acid*) (C16:0)	%	43,83	41,90
Asam stearat (*Stearic acid*) (C 18:0)	%	0,08	-
Asam oleat (*Oleic acid*) (C 18:1)	%	42,45	44,36
Asam linoleat (*Linoleic acid*) (C 18:2)	%	11,76	11,86
Asam linolenat (*Linolenic acid*) (C 18:3)	%	0,28	0,45

lemak tidak jenuh yang rusak. Bilangan asam hasil biokonversi meningkat dari 0,38 menjadi 0,55 mg KOH/g minyak yang sebagian kemungkinan disebabkan oleh terhidrolisisnya gliserida CPO. Bilangan penyabunan turun dari 191,66 menjadi 185,14 mg KOH/g minyak yang mungkin disebabkan oleh terbentuknya asam lemak tidak jenuh baru yang relatif utuh pada CPO hasil biokonversi sehingga akan meningkatkan bobot molekul rata-rata asam lemak. Minyak dengan bobot molekul rendah mempunyai bilangan penyabunan yang lebih tinggi dari pada minyak dengan bobot molekul yang tinggi.

Hasil analisis komposisi asam lemak produk biokonversi CPO terlihat bahwa asam oleat, linoleat, dan linolenat meningkat, sedangkan asam stearat menurun hingga tidak terdeteksi (Tabel 2). Asam stearat yang tidak muncul setelah biokonversi kemungkinan disebabkan asam stearat telah terkonversi seluruhnya secara langsung menjadi asam oleat oleh aktivitas Δ^9 desaturase. Kenaikan konsentrasi linoleat (C 18:2) diakibatkan oleh aktivitas Δ^{12} desaturase yang mengubah asam oleat (C 18:1) menjadi asam linoleat (C18:2). Masih adanya kenaikan konsentrasi asam oleat kemungkinan disebabkan kecepatan reaksi pembentukan asam oleat lebih tinggi dibandingkan dengan kecepatan pembentukan asam linoleat. Kenaikan konsentrasi asam linolenat disebabkan oleh proses biokonversi asam linoleat menjadi GLA yang dikatalisis oleh aktivitas Δ^6 desaturase. Terbentuknya GLA dalam CPO hasil biokonversi oleh Δ^6 desaturase asal *A. corymbifera* juga dilaporkan pada penelitian skala laboratorium (Tri-Panji *et al*., 2001 & 2002).

Kesimpulan dan Saran

1. Enzim desaturase amobil dari *A. corymbifera* dapat digunakan untuk proses biokonversi CPO dalam sistem curah skala semipilot sehingga CPO dapat ditingkatkan ketidakjenuhannya dan dapat diperoleh PUFA dengan konsentrasi yang lebih tinggi.
2. Waktu kontak optimum proses biokonversi tersebut untuk nisbah enzim amobil-substrat 1:1; 1:2; dan 1:3 adalah berturut turut 30, 40 dan 50 menit.
3. Nisbah enzim amobil-subtrat optimum dalam proses biokonversi CPO adalah 1:2 yang menghasilkan peningkatan bilangan iod 9-11 g I_2/100 g CPO dan perolehan produk 17.000 mL (21 kali curah) selama 18 jam pemakaian.

Daftar Pustaka

AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists* Vol II A. Washington, AOAC Int., 4, 17-19.

Cahoon, E. B., S. Shah, J. Shanklin & 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.

Dixon, M & E.C. Webb (1979). *Enzymes,* 3rd edition*,* London, Longman Group Ltd. p 55-78.

Gunstone, F.D., J.L. Harwood & F. B. Padley (1986). *The lipid handbook*. London, Chapman and Hall.

Immelman, M, J.C.Du Preez & S. Killian (1997). Effect of C:N ratio on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *System Appl. Microbiol*., **20**,158-164.

Ishikawa, T., Y. C. Fujiyama, M. Igarashi, N. Morino, A. Fada, T. Kagami, N. Sakamoto, N. Nagano & H. Nakamura (1989). Clinical feature of familial hypercholesterolemia. *J. Atherosclerosis,* **75**, 95.

James, P. & M. D. Carter (1988). Gamma linolenic acid as a nutrient. *J. Food Technol*., **42**, 72-82.

Kamisaka,Y.,T. Yokochi, T. Nakahara & O. Suzuki (1990). Incorporation of linoleic acid and its conversion to γ-linolenic acid in fungi. *Lipid,* **25**(1), 54-60.

Knutzon D. S., M.T. Jennifer, S.H. Yung, C. Sunita, G.B. Emil, M. C. George, J.K. Stephen & M. Pradip (1998). Identification of desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' Yeast and Canola. *J. Biol. Chem.,* **273** (45), 29360-29366.

Lowry, O.H., N.J. Rose Brough, A.L. Farr & R.J. Randall (1951). Protein measurement with the follin phenol reagent. *J. Biol. Chem*., **193**, 265-275.

Murderhwa, J.M., R. Ratomahenina, M. Pina, J. Graille & P. Galzy (1985). Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra, *JAOCS,* **62** (6), 1031-1036.

Negishi, S., S. Sato, S. Mukataka & J. Takahashi (1989). Utilization of powdered pig bone as a support for immobilization of lipase. *J. Ferment. & Bioeng*., **67**, 350-355.

Serrano-Carreon, L., Y. Hathout, M. Bensoussan & 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.

Sigma Chemical Company (2004). *Biochemicals and Reagents for Life Science Research.* USA, Sigma.

Suzuki, O. (1991). Recent trends of oleochemical by biotechnology. *In Proc. PORIM International Palm Oil Conference Chemistry and Technology* Malaysia, p.221-230.

Tri-Panji (1997). Growth and the content of polyunsaturated fatty acids of *A. corymbifera* biomass on media containing crude palm oil. *Menara Perkebunan,* **65** (2), 104-110.

Tri-Panji, K. Syamsu, Suharyanto & I. Fathurachman (2002) Amobilisasi desaturase asal *Absidia corymbifera* menggunakan butiran tulang sapi dan zeolit*. J. Teknol. Indust.,* **11**(3), 101-107