

## Biokonversi CPO dengan desaturase amobil sistem kontinu pada skala semipilot untuk produksi minyak mengandung GLA

*Bioconversion of CPO using immobilized desaturase in continuous system at semipilot scale to produce oil containing GLA*

SUHARYANTO<sup>1)</sup>, TRI-PANJI<sup>1)1)</sup>, M. Irfani ABDULLAH<sup>2)</sup> & Khaswar SYAMSU<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup>Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16002, Indonesia

### Summary

Gamma linolenic acid (GLA) is a polyunsaturated fatty acid having high economic value as healthy oil. Research at laboratory scale showed that *Absidia corymbifera* and *Rhizopus* sp. fungi have the ability to increase unsaturation level of crude palm oil (CPO) and GLA formation through enzymatic bioconversion. Stability of desaturase enzyme, especially  $\Delta^6$  and  $\Delta^{12}$  having significant role in this process could be enhanced by applying immobilization technique. The current research objective was to determine optimum process of CPO bioconversion using immobilized desaturase enzyme using continuous system at semipilot scale to produce CPO containing GLA. Crude desaturase enzyme of *A. corymbifera* biomass was immobilized with zeolite particles and used for optimization of CPO bioconversion in continuous system at semipilot scale (15.000 mL per day). Optimization of bioconversion conditions included flow rate of substrate, size of zeolite for immobilization, and enzyme stability during process. The result showed that desaturase immobilized in small size particles of zeolite (1-3 mm) gave higher increase unsaturation level with average desaturase activity of 784 U, compared to that immobilized in larger zeolite particles (8-10 mm), which reached average desaturase activity of 4.67 U. However, the use of small zeolite particles often caused plugging substrate flow. The activity of immobilized

desaturase in continuous system was stable for 9-18 hours. Optimum flow rate of substrate using small zeolite particles (1-3 mm) was 850 mL/min, while that of using larger zeolite particles (8-10 mm) was 875 mL/min. The bioconversion of CPO at optimum condition yielding 1.58% (w/w) GLA from initial concentration of linolenic acid 0.29%.

[Keyword: *Absidia corymbifera*, CPO bioconversion, desaturase enzyme, enzyme immobilization, gamma-linolenic acid].

### Ringkasan

Asam  $\gamma$ -linolenat (GLA) merupakan asam lemak takjenuh majemuk yang memiliki nilai ekonomi tinggi sebagai minyak kesehatan. Penelitian pada skala laboratorium menunjukkan bahwa *Absidia corymbifera* dan *Rhizopus* sp. memiliki kemampuan untuk meningkatkan ketidakjenuhan minyak sawit mentah (CPO) dan menghasilkan GLA melalui biokonversi enzimatik. Stabilitas enzim desaturase, khususnya  $\Delta^6$  dan  $\Delta^{12}$  yang berperan pada proses ini dapat ditingkatkan antara lain melalui teknik amobilisasi. Penelitian lanjutan ini bertujuan menetapkan kondisi optimum biokonversi CPO untuk menghasilkan minyak yang kaya akan asam lemak takjenuh majemuk. Khususnya GLA menggunakan enzim desaturase amobil sistem kontinu pada skala

<sup>1)</sup>Penulis korespondensi

semipilot. Ekstrak kasar enzim desaturase asal biomassa fungi *A. corymbifera* diamobilisasi dengan butiran zeolit dan selanjutnya digunakan untuk optimasi proses biokonversi secara kontinu pada skala semipilot (15.000 mL per hari). Optimasi proses kontinu meliputi laju alir substrat, ukuran butiran zeolit, dan stabilitas enzim selama proses. Hasil penelitian menunjukkan bahwa desaturase yang diamobilisasi pada zeolit berukuran kecil (1-3 mm) memberikan peningkatan ketidakterjenuhan yang lebih tinggi dengan aktivitas rata-rata 7,84 U, dibandingkan dengan yang diamobilisasi pada zeolit berukuran besar (8-10 mm) dengan aktivitas rata-rata 4,67 U. Namun, penggunaan zeolit berukuran kecil sering menimbulkan sumbatan aliran substrat. Aktivitas desaturase amobil pada proses kontinu dapat bertahan selama 9-18 jam. Laju alir optimum substrat pada penggunaan zeolit berukuran kecil (1-3 mm) adalah 850 mL/menit, sedangkan pada penggunaan zeolit besar (8-10 mm) adalah 875 mL/menit. Biokonversi CPO pada kondisi optimum menghasilkan GLA 1,58% (b/b) dari kandungan asam linolenat awal 0,29%

## Pendahuluan

Asam gamma linolenat (C18:3,  $\omega$ -6, atau GLA) memiliki arti penting bagi dunia medis dan farmasi, antara lain untuk menurunkan kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) bagi penderita hiperkolesterolernia (Ishikawa *et al.*, 1989), mengobati sindroma prahaid (Horrobin, 1983), eksema atopik (Biagi *et al.*, 1988) dan sebagai anti trombotik (Suzuki, 1991), serta untuk kelancaran metabolisme tubuh (James & Carter, 1988). Di Jepang, GLA juga dipasarkan sebagai bahan baku kosmetika untuk menjaga kelembapan kulit (Suzuki, 1991). Asam lemak ini dapat terbentuk dari biokonversi asam linoleat (LA) oleh enzim  $\Delta^6$  desaturase yang dihasilkan oleh fungi dari ordo *Mucorales*, kelas *Zygomycetes*.

GLA memiliki nilai ekonomi yang sangat tinggi. GLA murni dijual di dalam kemasan ampul 100 mg dengan harga US \$

69,7. Dalam bentuk kasar, yaitu dengan kadar 10% dalam campuran dengan asam palmitat, stearat, oleat dan linoleat, asam lemak ini dijual dengan harga US\$ 160 per 100 g (Sigma, 2004).

Berbagai penelitian telah dilakukan sebagai upaya untuk memproduksi asam lemak jenis ini dan asam lemak takjenuh majemuk (PUFA) lainnya, mulai dari kloning gen desaturase asal tanaman (Cahoon *et al.*, 1998; Knutzon *et al.*, 1998) hingga optimasi produksi menggunakan mikroba, khususnya fungi (Immelman *et al.*, 1997). Pada penelitian sebelumnya (Tri-Panji, 1997) cairan fermentasi *Absidia corymbifera* terbukti mampu meningkatkan angka iodin CPO. Cairan fermentasi ini juga mengubah asam oleat menjadi linoleat (LA) dan LA menjadi GLA. Hal ini berarti cairan fermentasi fungi tersebut mengandung enzim desaturase, termasuk  $\Delta^6$  dan  $\Delta^{12}$  desaturase. Adanya enzim  $\Delta^6$  desaturase pada mikroba penghasil GLA pernah dilaporkan oleh Suzuki (1991). Peningkatan angka iodin diduga tidak hanya berasal dari perubahan LA menjadi GLA tetapi juga oleh perubahan asam lemak lainnya yang mengalami peningkatan ketidakterjenuhan, terutama asam oleat menjadi linoleat. Hasil yang belum dipublikasikan menunjukkan bahwa cairan fermentasi *Rhizopus oryzae* juga memiliki kemampuan serupa. Enzim desaturase dapat diamobilisasi dengan butiran tulang sapi dan zeolit untuk meningkatkan kestabilannya dalam proses biokonversi (Tri-Panji *et al.*, 2002).

Sistem biokonversi yang banyak diterapkan di industri adalah sistem kontinu. Sistem kontinu adalah biokonversi yang memungkinkan komponen umpan dialirkan dan diproses hingga diperoleh produk secara terus menerus. Sistem tersebut memiliki keuntungan dibanding dengan sistem batch (curah) dalam hal kemudahannya untuk otomatisasi proses, penghematan ruangan produksi dan kecepatan proses. Laju alir substrat dan stabilitas desaturase dalam

sistem kontinu selama proses perlu diketahui sehingga biokonversi dapat berlangsung secara optimal. Tahapan penelitian skala semipilot dan pilot perlu dilakukan sebelum teknologi biokonversi tersebut dapat diterapkan pada skala industri. Tujuan penelitian adalah menetapkan kondisi optimum ukuran butiran zeolit yang digunakan dalam amobilisasi desaturase, laju alir substrat, dan stabilitas enzim desaturase amobil selama proses biokonversi CPO dalam sistem kontinu pada skala semipilot.

## Bahan dan Metode

### *Penyiapan kultur A. corymbifera*

Fungi *A. corymbifera* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioproses, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI), Bogor dan dipelihara dalam medium potato dextrose agar (PDA) miring. Inokulum ditumbuhkan dalam labu Erlenmeyer 500 mL berisi medium potato dextrose broth (PDB) yang diinokulasi dengan dua loop spora dan miselium *A. corymbifera* dari kultur PDA miring umur 72 jam. Kultur diinkubasi pada suhu ruang (25-30°C) di atas rak bergoyang pada kecepatan 110 rpm selama 72 jam dan selanjutnya miselium dipanen untuk sumber inokulum.

Inokulum dihaluskan dengan blender selama lima menit, kemudian sebanyak 10% (v/v) ditambahkan ke dalam medium fermentasi Serrano-Carreón *et al.* (1993) dengan komposisi (g/L) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,94; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,507; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,5; CaCl<sub>2</sub> 0,0041; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,0001, dengan molase sebagai sumber karbon, serta ditambahkan larutan HCl 1:1 sampai pH 5,0. Kultur diinkubasi selama 120 jam pada suhu ruang (25-30°C) di dalam fermentor film permukaan volume 60 L dengan ketebalan

kultur 1 cm. Lapisan biomassa miselium dipanen untuk sumber enzim desaturase.

### *Isolasi enzim desaturase*

Isolasi enzim desaturase ( $\Delta^6$  dan  $\Delta^{12}$ ) dilakukan dengan cara menghancurkan biomassa *A. corymbifera* segar yang telah dibersihkan dari sisa medium dan dicampur dengan PBS (*phosphate buffer saline*) pH 6,8 dengan nisbah 1:2 (b/v) dengan blender selama dua kali 15 menit. Pecahan biomassa miselium dipisahkan dari cairan enzim menggunakan sentrifus 4.000 rpm selama 15 menit. Ekstrak enzim kasar dipisahkan dari pecahan sel menggunakan kertas saring pada corong Buchner dan dibantu dengan pompa vakum. Supernatan yang berisi ekstrak kasar desaturase ini digunakan untuk percobaan amobilisasi enzim dengan butiran zeolit sebagai padatan pendukung atau pengamobil.

### *Amobilisasi desaturase dan penentuan aktivitasnya*

Butiran zeolit berukuran 1-3 mm (ukuran kecil) dan 8-10 mm (ukuran besar) yang diperoleh dari pasaran sebelum digunakan sebagai padatan pendukung masing-masing dicuci dengan air mengalir, kemudian direndam dalam larutan NaCl 1M selama 12 jam dengan dua kali penggantian larutan perendam. Butiran zeolit ini kemudian diaktivasi dengan memanaskan di dalam oven pada suhu 200°C selama 15 menit.

Amobilisasi desaturase dilakukan dengan cara merendam masing-masing 100 g zeolit teraktivasi tersebut ke dalam 200 mL ekstrak enzim dan dikocok dengan mesin pengocok pada kecepatan 180 rpm selama satu jam pada suhu ruang (25-28°C), kemudian cairan dipisahkan. Jumlah enzim teramobilisasi ditentukan berdasarkan pengurangan kadar protein cairan enzim sebelum

dan setelah amobilisasi menggunakan metode Lowry (1951) dengan standar protein BSA (*bovine serum albumin*). Butiran zeolit yang telah mengamobilisasi enzim digunakan untuk biokonversi CPO.

Untuk mengetahui aktivitas desaturase amobil selama proses biokonversi, padatan zeolit yang mengandung enzim amobil (2 g) dicampurkan dengan substrat CPO (2 mL) di dalam tabung reaksi. Campuran tersebut selanjutnya divortex selama 2-3 menit kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (25-28°C). CPO dipisahkan dari padatan zeolit untuk kemudian dianalisis bilangan iodinnya menggunakan metode AOAC (1995). Aktivitas desaturase (unit) didefinisikan sebagai besarnya peningkatan ketidakhajenuhan CPO yang diakibatkan reaksi enzimatik oleh 1 mg enzim dalam padatan zeolit selama satu menit (g I<sub>2</sub>/100 g CPO per mg enzim per menit). Butiran zeolit yang telah mengamobilisasi enzim digunakan untuk biokonversi CPO.

#### *Optimasi proses desaturase sistem kontinu*

Ekstrak kasar desaturase yang telah diamobilisasi dalam medium amobilisasi zeolit (1.000 g), dengan dua ukuran butiran masing-masing 1-3 mm dan 8-10 mm dimasukkan ke dalam kolom reaktor model unggun (*packed bed*) yang terbuat dari kaca berdiameter 5 cm dan tinggi 50 cm (volume 982 mL). Secara sinambung fraksi CPO dalam tangki timbun dialirkan masuk dari bagian bawah kolom ke bagian atas (*upward flow*) melewati rongga antarbutiran zeolit dengan bantuan kompresor pada laju alir konstan sedemikian sehingga menghasilkan waktu kontak enzim-substrat selama 30 dan 40 menit. Waktu kontak tersebut didasarkan atas waktu optimum biokonversi secara *batch* yang diperoleh dari percobaan sebelumnya (Tri-Panji et al., 2003). Zeolit berukuran 1-3 mm (*kecil*) memiliki rongga antar butiran

sebanyak 47% total volume, sedangkan zeolit berukuran besar memiliki volume rongga sebesar 49,5%. Pada penggunaan enzim yang diamobilisasi pada zeolit ukuran kecil, laju alir substrat yang digunakan adalah 830 mL/jam yang diperoleh dari waktu kontak enzim-substrat 30 menit dan 623 mL/jam yang diperoleh dari waktu kontak 40 menit. Pada penggunaan medium pengamobil zeolit berukuran besar, laju alir substrat yang digunakan adalah 875 mL/jam (waktu kontak 30 menit) dan 656 mL/jam (waktu kontak 40 menit). Sampel CPO yang telah mengalami biokonversi diambil dari botol penampung biokonversi mulai dari jam ke-0, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 18, dan 24, dan ditentukan peningkatan bilangan iodin dan aktivitas desaturase. Komposisi asam lemak dianalisis dengan GC (Tri-Panji et al., 1997), dan kualitas minyak (bilangan iodin, bilangan peroksida, bilangan asam, bilangan penyabunan) sebelum dan sesudah biokonversi pada kondisi optimum diperiksa dengan metode AOAC (1995). Stabilitas enzim diuji untuk menentukan sampai berapa lama enzim amobil dapat digunakan untuk proses kontinu.

## Hasil dan Pembahasan

### *Pemilihan ukuran butiran zeolit*

Zeolit berukuran kecil memiliki luas permukaan per satuan bobot bahan yang jauh lebih besar dibandingkan zeolit berukuran besar. Dengan demikian, butiran zeolit yang lebih kecil akan mampu menyerap dan mengamobilisasi desaturase lebih banyak dibandingkan dengan yang berukuran lebih besar. Jumlah desaturase yang lebih banyak akan mampu meningkatkan bilangan iodin yang lebih banyak juga. Bilangan iodin CPO blanko, yaitu 47,95 g I<sub>2</sub>/100 g CPO dapat ditingkatkan menjadi 4-12 satuan dengan desaturase teramobilisasi pada zeolit ukuran 1-3 mm, sedangkan desaturase yang

diamobilisasi pada zeolit berukuran 8-10 mm hanya meningkatkan bilangan iodin sebesar 2-4 satuan. Namun, ukuran butiran yang lebih kecil memiliki ukuran rongga yang lebih kecil pula, yang berpotensi menyebabkan terjadinya sumbatan terhadap aliran substrat. Kendala teknis ini dapat diatasi dengan cara menyaring substrat atau memisahkan fraksi padat CPO.

#### Optimasi laju alir substrat

Laju alir 830 mL/jam (waktu kontak 30 menit) untuk zeolit ukuran 1-3 mm menghasilkan aktivitas desaturase tertinggi yaitu 13,35 U pada jam ke-9 (Gambar 1 A). Aktivitas desaturase pada laju alir tersebut masih terdeteksi sampai jam ke-18 dan tidak terdeteksi lagi setelah 24 jam. Laju alir 623 mL/jam dan waktu kontak 40 menit menghasilkan aktivitas desaturase sebesar 2,95 U (Gambar 1 B). Laju alir substrat yang lebih lambat atau waktu kontak yang lebih lama ternyata tidak menghasilkan peningkatan bilangan iodin yang lebih tinggi untuk zeolit berukuran 1-3 mm. Hal tersebut

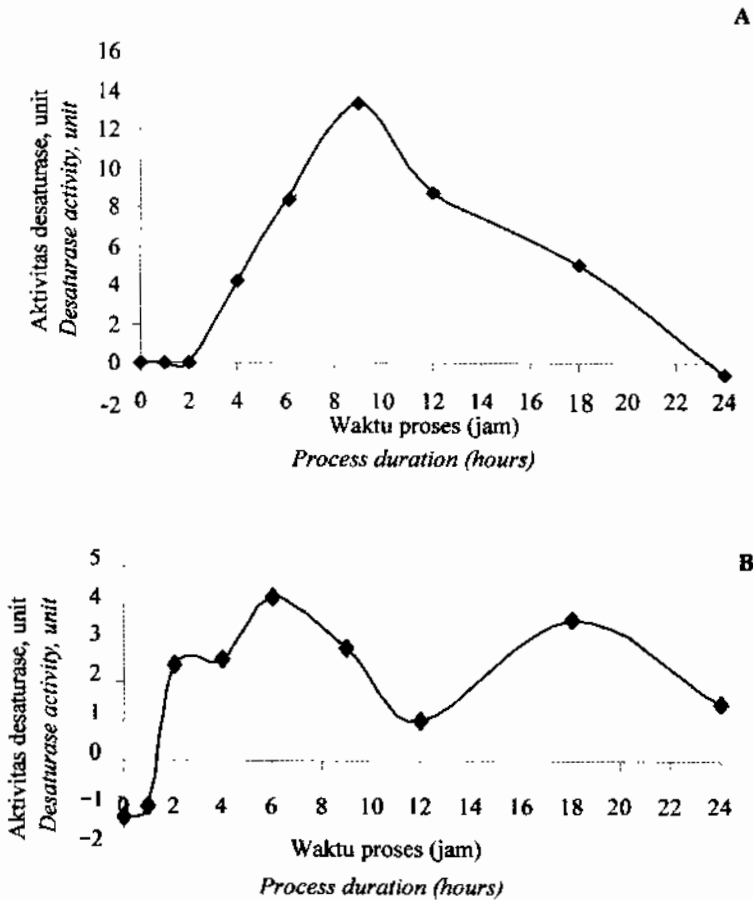
kemungkinan disebabkan waktu kontak yang melebihi optimum tidak menghasilkan tambahan pembentukan ikatan C=C, tetapi justru ikatan C=C yang telah terbentuk sebagian rusak oleh oksidasi. Dugaan ini muncul berdasarkan pengamatan peningkatan bilangan peroksida selama proses biokonversi enzimatik dengan desaturase (Tabel 1).

Laju alir substrat 874 mL/jam dan 656 mL/jam untuk zeolit berukuran 8-10 mm pada kolom kaca (50 cm x 5 cm i.d.) berisi desaturase amobil diatur untuk waktu kontak yang sama yaitu masing-masing 30 dan 40 menit. Laju alir substrat 874 mL/jam untuk penggunaan zeolit berukuran 8-10 mm menghasilkan aktivitas desaturase tertinggi yaitu 4,21 U yang dapat dicapai setelah proses berjalan enam jam. Aktivitas desaturase dalam CPO masih terdeteksi sampai jam ke-9 dan aktivitas desaturase hilang sama sekali pada jam ke-12 (Gambar 2 A). Laju alir substrat 656 mL/jam untuk zeolit berukuran 8-10 mm menghasilkan aktivitas desaturase tertinggi 7,06 U yang dicapai pada proses setelah sembilan jam (Gambar 2 B)

Tabel 1. Mutu CPO sebelum dan setelah biokonversi dengan desaturase amobil sistem kontinu.

Table 1. Quality of CPO before and after bioconversion using immobilized desaturase in continuous systems

Parameter mutu Quality parameter	Sebelum biokonversi Before bioconversion	Sesudah biokonversi After bioconversion
Bilangan iodin ( <i>Iodine number</i> ), g I <sub>2</sub> /100 g CPO	47,95	57,65
Bilangan asam ( <i>Acid number</i> ), mg KOH/g CPO	9,0	11,3
Bilangan peroksida ( <i>Peroxide number</i> ), mg/kg CPO	12,1	15,7
Bilangan penyabunan ( <i>Soap number</i> ), mg KOH/g CPO	127,4	120,7

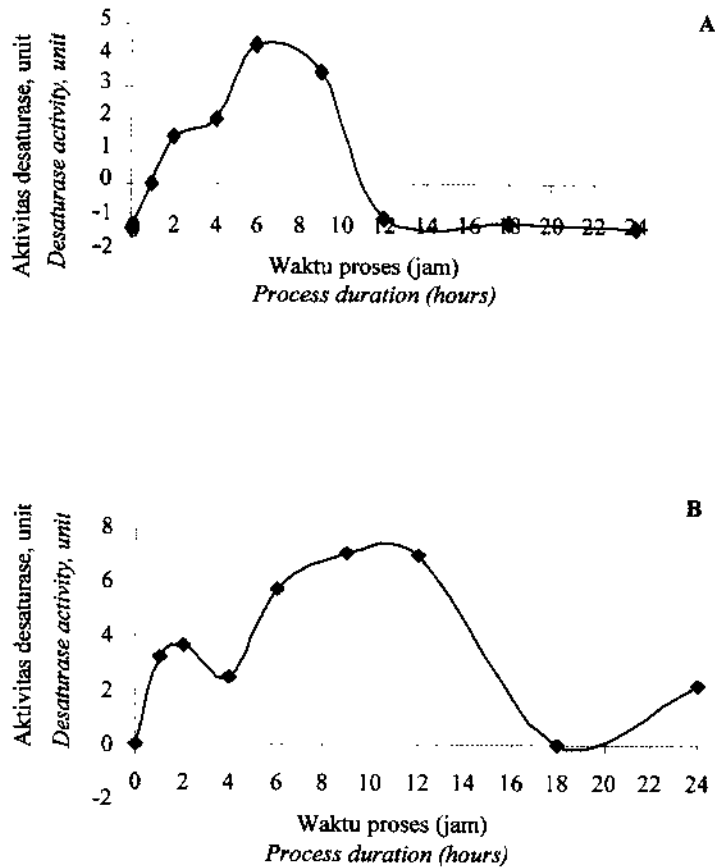


Gambar 1. Peningkatan bilangan iodine CPO dalam biokonversi dengan desaturase amobil menggunakan zeolit kecil (1-3 mm) sistem kontinu skala semipilot pada laju alir 830 mL/jam, waktu kontak 30 menit (A) dan pada laju alir 623 mL/jam, waktu 40 menit (B).

Figure 1. Increasing of iodine number in CPO bioconverted by immobilized desaturase using small zeolite (1-3mm) in continuous system at semipilot scale with flow rate of 830 mL/hour, contact time 30 min (A) and with flow rate of 623 mL/hour, contact time 40 min.

Aktivitas desaturase masih terdeteksi pada jam ke-12 (6,98 U), dan perubahan bilangan iodine telah bernilai negatif pada jam ke-18. Berbeda dengan penggunaan zeolit ukuran kecil (1-3 mm), penambahan waktu kontak dari 30 menjadi 40 menit untuk zeolit berukuran besar (8-10 mm) justru menyebabkan kenaikan bilangan iodine. Hal tersebut

berarti bahwa dengan penambahan waktu kontak laju desaturasi meningkat lebih besar daripada laju reaksi oksidasi. Ukuran rongga antar butiran zeolit yang lebih besar menyebabkan gesekan aliran substrat dengan permukaan zeolit lebih kecil sehingga oksidasi juga relatif lebih rendah.



Gambar 2. Peningkatan bilangan iodin CPO dalam biokonversi dengan desaturase amobil menggunakan zeolit besar (8-10 mm) dalam sistem kontinu skala semipilot pada laju alir 874 mL/jam, waktu kontak 30 menit (A) dan pada laju alir 656 mL/jam, waktu 40 menit (B).

Figure 2. Increasing of iodine number in CPO bioconverted by immobilized desaturase using large zeolite (8-10 mm) in continuous system at semipilot scale with flow rate of 874 mL/hour, contact time 30 min (A) and with flow rate of 656 mL/hour, contact time 40 min.

#### Stabilitas enzim selama proses biokonversi

Secara umum, pola peningkatan aktivitas desaturase pada awal proses relatif kecil bahkan sebagian menghasilkan nilai negatif dan setelah waktu tertentu meningkat cukup tajam dan pada suatu saat kembali menurun (Gambar 1 dan 2). Stabilitas desaturase di-

tetapkan berdasarkan periode waktu yang memberikan aktivitas yang cukup bermakna (> 1,5 U). Aktivitas desaturase rata-rata selama proses ditetapkan berdasarkan nilai rata-rata aktivitas pada rentang waktu proses pada saat desaturase dalam keadaan stabil (Tabel 2). Pada proses kontinu, aktivitas desaturase amobil dapat dipertahankan se-

lama kurang lebih 9-18 jam (Gambar 1 dan 2). Hal ini berarti proses amobilisasi dapat memperpanjang aktivitas desaturase. Desaturase di dalam homogenat (tanpa amobilisasi) hanya bertahan selama 3-4 jam (Tri-Panji *et al.*, 2002; Suzuki, 1991), yang mungkin disebabkan antara lain oleh protease (Ozols, 1997). Perpanjangan aktivitas desaturase melalui amobilisasi ini mungkin disebabkan oleh pengikatan enzim desaturase dan protease pada sisi yang berbeda pada permukaan zeolit sehingga frekuensi kontak antara protease dan desaturase dapat dikurangi. Dengan memilih laju alir optimum 830 mL/jam, jumlah CPO yang dapat di biokonversi menggunakan desaturase yang diamobilisasi pada zeolit ukuran 1-3 mm selama satu siklus (9-18 jam) mencapai 7.650-15.300 mL. Minyak hasil biokonversi dapat ditingkatkan bilangan iodinnya hingga lima satuan ( $\text{g I}_2/100 \text{ g minyak}$ ).

Proses desaturasi sistem kontinu menggunakan zeolit kecil (1-3 mm) dengan waktu kontak 30 menit memberikan aktivitas desaturase rata-rata terbaik sebesar 7,84 U CPO dengan stabilitas 14 jam. Dengan laju alir 830 mL/jam akan diperoleh output produk sebanyak 11.620 mL/hari, dengan waktu optimasi selama 14 jam.

#### *Perubahan mutu dan komposisi asam lemak*

Perubahan mutu dan komposisi asam lemak CPO hasil biokonversi pada kondisi optimum dapat dilihat pada Tabel 1 dan 3. Bilangan iodin dalam biokonversi ini dapat ditingkatkan secara nyata, yaitu dari 47,95  $\text{g I}_2/100 \text{ g CPO}$  menjadi 57,65  $\text{g I}_2/100 \text{ g CPO}$  yang terkait dengan meningkatnya ketidakjenuhan CPO. Selama proses desaturasi sistem kontinu diduga terjadi reaksi oksidasi ikatan rangkap membentuk gugus peroksida pada rantai asam lemak. Hal ini terlihat dari peningkatan bilangan peroksida CPO dari 12,1  $\text{mg/kg}$  menjadi 15,7  $\text{mg/kg}$  atau

peningkatan bilangan peroksida sebesar 3,6 satuan. Reaksi pembentukan gugus peroksida ini berlawanan dengan reaksi desaturasi karena bersifat menurunkan bilangan iodin CPO. Penggunaan udara bertekanan tinggi untuk pengaliran CPO dan terjadinya kontak CPO dengan oksigen terlarut dalam air pada permukaan zeolit maupun oksigen udara pada tabung penampung diduga ikut berperan pada peningkatan bilangan peroksida. Hal yang sama juga terjadi pada bilangan asam yaitu mengalami kenaikan 2,3 satuan. Kenaikan bilangan asam terkait dengan hidrolisis gliserida CPO dengan bantuan air yang sedikit terkandung dalam zeolit sebagai padatan pengamobil enzim. Proses desaturasi kontinu menghasilkan penurunan bilangan penyabunan yang relatif kecil. Bilangan penyabunan turun dari 127,4  $\text{mg KOH/g minyak}$  menjadi 120,7  $\text{mg KOH/g minyak}$ . Penurunan bilangan penyabunan ini belum diketahui penyebabnya.

Desaturasi CPO sistem kontinu menyebabkan terjadinya perubahan komposisi asam lemak dalam CPO. Asam lemak tak-jenuh yang mengalami kenaikan adalah asam palmitoleat (C16:1) sebesar 2,72% dan asam linolenat (C18:3) sebesar 1,29%. Sementara itu asam oleat (C18:1) dan asam linoleat (C18:2) mengalami penurunan. Reaksi desaturasi asam lemak merupakan reaksi yang bersifat konsekutif atau reaksi berantai. Menurut Suzuki (1991) pembentukan GLA berasal dari asam linoleat dikatalisis oleh  $\Delta^6$  desaturase. Selain  $\Delta^6$  desaturase, biokonversi tersebut diperkirakan melibatkan pula  $\Delta^{12}$  desaturase yang mengkatalisis pembentukan asam linoleat dari asam oleat. Namun, laju pembentukan asam linolenat mungkin lebih cepat daripada pembentukan asam linoleat sehingga kenaikan persentase asam linoleat tidak terdeteksi. Sebagai senyawa kimia murni (*pure chemical*) asam linoleat lebih murah dibandingkan GLA sehingga peningkatan GLA tersebut akan meningkatkan nilai tambah CPO.



Tabel 2. Aktivitas desaturase rata-rata dan stabilitasnya selama biokonversi CPO sistem kontinu pada skala semipilot.

Table 2. Average desaturase activity and its stability during CPO bioconversion in continuous system at semipilot scale.

Ukuran zeolit <i>Zeolite size</i>	Laju alir (mL/jam) <i>Flow rate</i> (mL/hour)	Waktu kontak <i>Contact time</i> (min)	Aktivitas desturase rata-rata <i>Average desaturase</i> <i>activity</i> (U)	Stabil dalam selang waktu (jam) <i>Stable at range</i> <i>time (hour)</i>
Kecil ( <i>Small</i> )	830	30	7,84	4 - 18
1-3 mm	623	40	2,63	2 - 18
Besar ( <i>Large</i> )	874	30	2,63	2 - 9
8-10 mm	656	40	4,76	1 - 12

Tabel 3. Komposisi asam lemak hasil biokonversi CPO dengan desaturase amobil sistem kontinu skala semipilot pada kondisi optimal.

Table 3. Fatty acid composition resulted from CPO bioconversion using immobilized desaturase in continuous system at semipilot scale under optimal condition.

Komposisi asam lemak <i>Fatty acid composition</i> (%, w/w)	CPO blanko <i>Blank CPO</i>	CPO hasil biokonversi pada kondisi optimum <i>CPO from bioconversion</i> <i>at optimum condition</i>
Asam laurat ( <i>Lauric acid</i> ), C 12:0	0,25	0,27
Asam miristat ( <i>Myristic acid</i> ), C 14:0	1,36	1,35
Asam palmitat ( <i>Palmitic acid</i> ), C 16:0	42,59	40,13
Asam palmitoleat ( <i>Palmitoleic acid</i> ) C 16:1	-	2,72
Asam stearat ( <i>Stearic acid</i> ), C 18:0	0,13	0,31
Asam oleat ( <i>Oleic acid</i> ), C 18:1	43,24	41,89
Asam linoleat ( <i>Linoleic acid</i> ), C 18:2	12,15	11,74
Asam linolenat ( <i>Linolenic acid</i> ), C 18:3	0,29	1,58

### Kesimpulan dan Saran

Kondisi optimum untuk desaturasi CPO sistem kontinu pada skala semipilot adalah dengan mengamobilisasi enzim desaturase pada zeolit berukuran kecil (1- 3 mm) yang telah diaktifkan. Laju alir CPO optimum adalah 850 mL/menit dan waktu kontak 30 menit. Aktivitas desaturase amobil pada

kondisi tersebut dapat bertahan selama 9-18 jam dengan aktivitas rata-rata 7,84 U. Biokonversi CPO pada kondisi optimum menghasilkan GLA 1,58% (b/b). Namun, penggunaan zeolit berukuran kecil dapat menimbulkan sumbatan aliran substrat. Untuk mengatasi hal tersebut perlu digunakan fraksi cair CPO (fraksi olein).

### Ucapan Terimakasih

Tim peneliti mengucapkan terima kasih atas bantuan dana penelitian dari Kementerian Riset & Teknologi melalui Program Insentif RUSNAS Industri Hilir Minyak Kelapa Sawit TA 2003 yang memungkinkan penelitian ini dapat terlaksana.

### Daftar Pustaka

- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist Vol II A*. Washington, AOAC Int., 4, 17-19.
- Biagi, P.L., A. Bordoni, M. Masi, G. Ricci, C. Fanelli, A. Patrizi & F. Ceccolini (1988). Evening primrose oil (Efanol) in the treatment of children with atopic eczema. *J. Drug Exptl. Clin Res.*, 14, 291-297.
- Cahoon, E. B., S. Shah, S., J. Shanklin & J. Browse (1998). A determinant of substrate specificity predicted from the acylcarrier protein desaturase of developing castor seed. *J. Plant. Physiol.*, 117, 593-598.
- Horrobin, D.F. (1983). The role of essential fatty acid and prostaglandins in the premenstrual syndrome. *J. Reprod. Med.*, 28, 465-468.
- Immelman, M., J.C. Du Preez & S. Killian (1997). Effect of C:N ratio on gammalinolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *System Appl. Microbiol.*, 20, 158-164.
- Ishikawa, T., Y. Fujiyama, C. Igarashi, M. Morino, N. Fada, A. Kagami, T. 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.
- Knutzon, D.S., M.T. Jennifer, S.H. Yung, C. Sunita, G.B. Emil, M.C. George, J. K. Stephen & M. Pradip (1997). Identification of desaturase from *Mortierella alpine* 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 folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Ozols, J (1997) Degradation of hepatic stearyl CoA  $\Delta^9$ -desaturases. *J. Mol. Biol. Cell*, 8, 2281-2290.
- Serrano-Carreón, L., Y. Hathout, M. Bensoussan & J.M. Berlin (1993). Metabolism of linolenic acid or mavalonate and 6-pentyl- $\alpha$ -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 *PORIM International Palm Oil Conference Chemistry and Technology Malaysia*. Kuala Lumpur, 9-14 September 1991, 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 (3), 104-110.
- Tri-Panji, K. Syamsu & Suharyanto (2003). Produksi asam gamma linolenat melalui biokonversi CPO menggunakan desaturase amobil sistem batch dan kontinu skala semipilot. *Laporan Akhir Riset Unggulan Strategis Nasional (RUSNAS) Industri Hilir Kelapa Sawit - Kementerian Riset dan Teknologi*. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, 50p.
- Tri-Panji, K. Syamsu, Suharyanto & I. Fathurachman (2002). Amobilisasi desaturase asal *Absidia corymbifera* menggunakan butiran tulang sapi dan zeolit. *J. Tek. Indst.*, 11(3), 101-107.