

SINTESIS ESTER SORBITOL OLEAT MENGGUNAKAN LIPASE DARI GETAH PEPAYA, *Candida rugosa* dan *Rhizopus arrhizus*.

SORBITOL OLEATE ESTERS SYNTHESIS USING LIPASE FROM *Carica papaya* LATEX, *Candida rugosa* AND *Rhizopus arrhizus*

Suhardi¹, Tranggono¹, Pudji Hastuti¹, M.Muchalal²

ABSTRACT

The ability of lipase from *Carica papaya latex*, *Candida rugosa* and *Rhizopus arrhizus* to catalyze esterification of sorbitol and oleic acid to produce Sorbitol Oleat Esters (SOE) was investigated in this study. Response Surface Methodology (RSM) was employed to evaluate the effects of temperature ($x_1=40-50^\circ\text{C}$), reaction time ($x_2=24-72$ hours), concentration of enzyme ($x_3=25-75$ units), on percentage molar conversion as well as to determine the optimum condition of this reaction in term of this factors.

Based on RSM analysis using lipase from *Carica papaya latex*, the optimum synthesis conditions that giving 58.31% molar conversion, were : temperature of 45.15°C , reaction time 51.73 hours, concentration of enzyme 37 units. Using lipase from *Candida rugosa*, the optimum synthesis conditions that giving 59.49 % molar conversion, were : temperature of 45.08°C , reaction time 53.42 hours, concentration of enzyme 75 units. Using lipase from *Rhizopus arrhizus*, the optimum synthesis conditions that giving 61.89 % molar conversion, were : temperature of 45.01°C , reaction time 61.68 hours, concentration of enzyme 66 units. The characteristics of SOE products using lipase from *Carica papaya latex* and *Rhizopus arrhizus* were degree of esterification (DE) 1 and (DE) 2, hydrophilic lypophilic balance 7.5-8.0, and surface tension 34.8-35.1 dyne/cm. SOE products using lipase from *Candida rugosa* were DE 1, DE 2, and DE 3, hydrophilic lypophilic balance 3-6, and surface tension 31.18-31.83 dyne/cm. and capable to maintain emulsion of water in oil.

Key words: sorbitol oleate esters, esterification, lipase from *Carica papaya latex*, *Candida rugosa*, *Rhizopus arrhizus*

PENDAHULUAN

Ester sorbitol oleat (ESO) dalam penelitian ini merupakan salah satu emulsifier yang disintesis melalui reaksi esterifikasi antara sorbitol dan asam oleat, dikatalisis oleh lipase dari getah pepaya (*Carica papaya lipase*, CPL), *Candida rugosa lipase*(CRL) dan *Rhizopus arrhizus lipase*(RAL). Lipase tersebut dipilih karena telah diketahui ketiga jenis lipase ini mempunyai aktifitas dalam esterifikasi gula alkohol dengan asam lemak (Gandhi dan Mukherjee. 2001; Suhardi, 2003; Suhardi dkk., 2003). Penelitian ini dilakukan untuk mengatasi berbagai masalah yang berkaitan dengan

sintesis secara kimiawi seperti penggunaan pelarut yang bersifat toksik, penggunaan suhu yang tinggi dan produk berwarna coklat yang membatasi pada penggunaannya serta dihasilkan berbagai produk samping yang tidak dikehendaki (Akoh,1994).

Penggunaan lipase sebagai biokatalisator sintesis ESO berkembang pada berbagai penelitian, antara lain pengaruh solven organik (Chopineau dkk., 1988; Riva dkk., 1988), pengaruh donor asil (Therisod dkk., 1986; Pulido dkk., 1992), dan pengaruh jenis gula (Seino dkk., 1984; Adelhourst dkk., 1990; Schlotterbeck dkk., 1993). Peneliti lain

¹ Fakultas Teknologi Pertanian, UGM

² Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam, UGM

mengembangkan proses asilasi pada gula dengan asam lemak dengan sedikit pelarut organik (Cao dkk., 1996; Yan dkk., 1999), menggunakan pelarut etil-metilketon dan secara periodik air yang terbentuk selama esterifikasi diambil. Caro dkk., (2000) menggunakan lipase dari berbagai varietas untuk menkonversi lipida menjadi turunannya. Arcos dkk., (1998) telah berhasil memproduksi sorbitol ester menggunakan lipase *Candida antarctica*.

Emulsifier merupakan molekul bipolar yang terdiri dari gugus polar dan gugus nonpolar. Bila emulsifier dilarutkan dalam campuran minyak dan air, maka molekul ini akan terkonsentrasi pada lapisan antar muka. Bagian polar dari emulsifier tersebut berinteraksi dengan fase air, sedangkan bagian nonpolar berinteraksi dengan fase minyak. Pada keadaan ini, energi bebas termodinamika dalam sistem berada pada level yang minimum. Manifestasi dari penurunan energi bebas ini adalah penurunan tegangan permukaan antara fase minyak dan air sehingga kedua cairan tersebut dapat bercampur. ESO berfungsi sebagai emulsifier karena memiliki gugus kepala polar berupa sorbitol dan gugus ekor nonpolar yaitu asam oleat. Sintesis ESO dilakukan melalui reaksi esterifikasi antara sorbitol dan asam oleat dengan reaksi sebagai berikut :

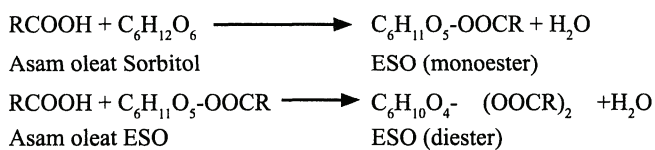


Figure. 1. Synthesis of sorbitol oleate esters

Lipase mengkatalisis reaksi substrat yang tidak larut dalam air atau bersifat nonpolar, padahal diketahui bahwa enzim bersifat larut dalam air (polar), dan reaksi enzimatik umumnya terjadi pada media berair. Karena lipase mengkatalisis substrat yang bersifat tidak larut dalam air, maka reaksi oleh lipase sangat terbatas dan terjadi pada suatu lapisan antar muka. Pada lapisan antar muka, akan terbentuk kompleks antara enzim-substrat (ES) yang dikatalisis oleh enzim dan kemudian terpecah menjadi produk. Produk yang terbentuk (ESO) bersifat larut dalam minyak sehingga akan cenderung terakumulasi pada fase lipid.

Penelitian ini bertujuan menentukan kondisi optimum pembuatan ester sorbitol oleat secara enzimatik dengan lipase getah pepaya, *Candida rugosa*, dan *Rhizopus arrhizus* dengan menggunakan metode respon permukaan (*Response Surface Methodology*). Variabel proses yang dipelajari meliputi suhu, lama inkubasi dan kadar lipase. RSM merupakan sekumpulan teknik matematika dan statistik yang digunakan untuk menentukan model dan menganalisa suatu masalah,

dimana beberapa variabel bebas mempengaruhi variabel terikatnya (respon), dengan tujuan menghitung besaran respon yang optimal (Montgomery, 1997). Konsep dasarnya dikembangkan oleh Box dan Wilson (1951), untuk mempelajari hubungan antara suatu respon dengan beberapa faktor terkait. Metodologi respon permukaan telah berhasil untuk menghitung kondisi proses yang optimal dalam pengolahan yang berhubungan dengan pangan (Mouquet dkk., 1992, Shieh dkk.,1995; Chung dkk., 1996; Yan dkk., 2001).

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan penelitian adalah asam oleat, sorbitol , lipase *Candida rugosa*, lipase *Rhizopus arrhizus*, buffer fosfat pH 7, sorbitan monooleat, sorbitan trioleat, TLC silica G 60, piridin, asam oleat, kupri sulfat, metanol, KOH, asam asetat anhidrat, isooktan, heksana, petroleum, dietileter, dimetilformamida, semua bahan kimia produksi SIGMA kualitas pro analisis. Lipase getah pepaya disadap dari buah pepaya muda jenis lokal di perkebunan daerah Boyolali dan dikeringkan dengan freeze drier. Lipase *Candida rugosa* yang dipakai berbentuk bubuk putih, mengandung laktosa sebagai *extender* serta bebas dari -amilase dan protease. Tiap miligram bubuk enzim mengandung 819 unit lipase. Satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis 1 mol asam lemak bebas dari minyak zaitun dalam satu menit pada pH 7,7 dengan suhu 37°C. Lipase *Rhizopus arrhizus* murni tiap ampul mengandung 4.000.000 unit lipase. Lipase dari bubuk getah pepaya tiap gramnya mengandung 290 unit lipase.

Peralatan

Peralatan yang dipakai dalam pembuatan ESO berupa tabung reaksi bengkok bertutup ulir, alat inkubasi berupa penangas air bergoyang. Alat analisis GC- Shimadzu, TLC scanner Camag, pengukur tegangan permukaan, spectrophotometer Shimadzu UV-1650PS, freeze drier Biotron, centrifuge Hettich Ebba 3S, waterbath-shaker Kotterman, magnetig stirrer Ikamag, analytic balance Shimadzu.

Sintesis ESO. Ester sorbitol oleat (ESO) disintesis dengan mencampurkan enzim dalam buffer fosfat dengan substrat (sorbitol dan asam oleat dengan perbandingan molar 1:3 dalam pelarut isooktan) ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasikan pada suhu 40-50°C yang disertai dengan penggojogan 100 stroke/menit dalam penangas air. Enzim yang digunakan adalah lipase bubuk getah pepaya, lipase non spesifik dari *Candida rugosa* dan lipase spesifik 1,3 *Rhizopus arrhizus*. Sebelum dan sesudah inkubasi reaktan dia-

nalisis asamnya dengan metode spektrofotometri (Marseno dkk., 1998). Setelah reaksi, reaktan dikeringkan menggunakan *freeze-drier* dan disimpan sebelum dilakukan analisis selanjutnya. Produk ESO dilakukan karakterisasi dengan TLC, GC, angka hidrosil, nilai HLB, tegangan permukaan, dan kemampuan ESO mempertahankan emulsi.

Untuk mengetahui kondisi optimum sintesis ESO, penelitian dirancang sesuai dengan metode respon permukaan program Box-Behnken dengan 3 variabel masing-masing 3 level, seperti terlihat pada Tabel 1.

Pemurnian produk ester sorbitol oleat. Produk diekstraksi dengan kloroform dengan corong pisah. Ekstraksi dengan kloroform bertujuan untuk melarutkan ESO dan sisa asam lemak. Ekstraksi dengan kloroform akan menyebabkan terbentuknya dua lapisan dimana lapisan bawah yang tidak larut dalam kloroform terdiri dari sisa sorbitol dan lapisan atas bagian yang larut dalam kloroform berupa ESO dan residu asam oleat. Selanjutnya lapisan atas tersebut dicuci lagi dengan tetrahidrofuran (THF). Penambahan THF menyebabkan terbentuknya dua lapisan, lapisan bawah merupakan fraksi yang larut tetrahidrofuran yang berupa sisa asam oleat dan lapisan atas berupa fase yang tidak larut THF berupa produk ESO.

Analisis angka asam (Marseno, dkk., 1998). Hasil reaktan diambil 200 μ l, ditambah 1800 μ l isooktan dan 400 μ l larutan kupri asetat 5%, digojog selama 90 detik, dan disentrifus 2000 rpm selama 2 menit, selanjutnya ditera dengan spektrofotometer pada 715 nm, dan sebagai standar digunakan asam oleat.

Konfirmasi ESO dengan TLC. *Thin Layer Chromatography* (TLC) yang digunakan berukuran 20 x 20 x 0,25 cm, dengan silika gel GF 60. Fase mobil campuran petroleum eter : dietil eter : asam asetat glasial = 65: 35: 1 (v/v/v). Sampel 0,5 ml ESO dalam 1 ml heksana dispotkan sebanyak 0,5 – 15 l pada TLC. Waktu untuk pengembangan adalah 30 – 60 menit. Visualisasi dilakukan meletakkan plate kedalam Chamber yang jenuh uap iodin. Spot akan berwarna ungu kecoklatan dan selanjutnya Rf dapat dihitung menggunakan TLC Scanner Camag.

Analisis komposisi asam lemak dengan GC (AOAC 963.22). Diambil 6 ml sampel 5% dalam heksana, dimasukkan kedalam tabung reaksi bertutup ulir kapasitas 12 ml. Ditambahkan 150 μ l KOH-metanol 2N, divortex selama 5 menit. Kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Sebanyak 1 l supernatan di injeksikan ke dalam kolom supelcoport isian DEGS, detektor FID (*Flame Ionizing Detector*). Gas pembawa menggunakan N₂ dengan tekanan 200 kPa. Suhu injektor 160°C dan suhu detektor 250°C.

Analisis angka hidrosil (AOAC 965.32). Sebanyak 0,5 gram ESO (W) dimasukkan kedalam erlenmeyer (A) kapasitas 100ml untuk diasetilasi. Kedalam erlenmeyer (B) ditimbang 1 gram sampel untuk penentuan angka asam. Setengan mililiter reagen C (campuran 3 volume piridin dan 1 volume asetat anhidrat) dimasukkan kedalam erlenmeyer (A), dan untuk blanko ditambahkan 0,5 ml piridin. Erlenmeyer diletakkan diatas penangas uap dengan kondensor reflux berpita dan dipanaskan selama 1 jam. Satu mililiter aquadest ditambahkan melalui kondesor dan dipanaskan lagi selama 10 menit. Ditambahkan 1,25 ml butanol dan erlenmeyer dibiarkan dingin dengan kondensor tetap terpasang. Setelah dingin kondensor dilepaskan, erlenmeyer diambil dan ditambahkan 1,2 ml butanol lagi dan 0,1 ml pp, selanjutnya dititrasi dengan 0,5N KOH alkoholik sampai titik akhir merah jambu. Butanol yang digunakan sebelumnya dinetralkan dengan 0,5 N KOH alkoholik sampai warna merah jambu (S ml). Pada sampel untuk penentuan angka asam (B) ditambahkan 1 ml piridin digoyang sampai campur, kemudian ditambah 0,1 ml pp, dan dititrasi dengan 0,5 N KOH alkoholik sampai titik akhir merah jambu (V ml).

Angka hidrosil = $[B + (W \times V / C) - S] \times N \times 56,1 / W$

Analisis nilai HLB (*Hidrophilic-Lipophilic Balance*) (Gupta, 1983). Sebanyak 1 g sampel dilarutkan dalam 25 ml campuran dimetilformamida (DMF) : benzena = 100:5, kemudian dititrasi dengan aquades sampai keruh permanen (kekeruhan tidak hilang dengan penggojogan selama 1 menit). Setiap penambahan aquades perlu diikuti dengan pendinginan sampai suhu 20±1°C karena penambahan aquades akan meningkatkan suhu campuran. Volume air yang diperlukan untuk titrasi dibandingkan dengan kurva standar jumlah air vs HLB. Standar HLB diperoleh dengan standar Sorbitan monooleat (HLB 4,3), sorbitan trioleat (HLB 1,8).

Penentuan tegangan permukaan. Tegangan permukaan diukur dengan Digital Tensiometer K 10 T dengan metode *Du Nuoy Ring*. Penentuan dilakukan dengan mencelupkan cincin ke dalam cairan sampel dalam wadah sampai cincin tercelup seluruhnya. Ketika wadah tersebut diturunkan perlahan-lahan, pada suatu saat, cairan tersebut seakan-akan melekat pada cincin karena tegangan permukaannya. Berat cairan yang 'melekat' pada cincin dicatat pada alat pengukur gaya (*force measuring device*) yang merupakan gaya yang diakibatkan oleh tegangan permukaannya.

Uji Sifat ESO sebagai stabilisator emulsi. Kedalam campuran 5% air dalam minyak dilarutkan produk ESO dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%, 3%, dan 5% v/v. campuran tersebut kemudian dihomogenkan dengan homogenizer selama 5 menit dan diamati waktu yang diperlukan sebelum campuran tersebut kembali memisah. Hasilnya kemudian

dibandingkan dengan SMO (sorbitan monooleat) dan STO (sorbitan trioleat) pada konsentrasi yang sama .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pengaruh suhu x_1 : (40, 45, 50° C), waktu x_2 : (24, 48, 72 jam) dan kadar enzim x_3 : (25, 50 dan

75 unit) pada sintesis sorbitol oleat (ESO) dicantumkan pada Tabel 1. Data konversi ini merupakan rerata dua kali ulangan perlakuan yang dihitung berdasarkan perubahan angka asam produk reaksi. Data eksperimen dianalisis dengan metode respon permukaan.

Table 1. Sorbitol oleate esters (SOE) products esterification of sorbitol and oleic acid using *Carica papaya* latex lipase (CPL), non spesific *Candida rugosa* lipase (CRL) and specific 1,3 *Rhizopus arrhizus* lipase (RAL)

No	Temperature °C (coded)	Time, hours (coded)	Lipases, unit (coded)	Conversion (%)		
				CPL	CRL	RAL
1	40(-1)	24(-1)	50(0)	29.73	25.97	24.4
2	50(+1)	24(-1)	50(0)	24.27	25.70	20.0
3	40(-1)	72(+1)	50(0)	31.36	36.47	35.88
4	50(+1)	72(+1)	50(0)	27.91	34.31	38.0
5	40(-1)	48(0)	25(-1)	17.91	31.76	19.3
6	50(+1)	48(0)	25(-1)	18.48	33.70	11.11
7	40(-1)	48(0)	72(+1)	26.44	35.85	35.0
8	50(+1)	48(0)	72(+1)	32.38	39.01	32.0
9	45(0)	24(-1)	25(-1)	12.27	23.98	15.0
10	45(0)	72(+1)	25(-1)	17.27	41.01	20.0
11	45(0)	24(-1)	72(+1)	22.27	51.70	47.62
12	45(0)	72(+1)	72(+1)	27.17	60.31	63.33
13	45(0)	48(0)	50(0)	37.75	55.36	55.56
14	45(0)	48(0)	50(0)	36.57	55.36	55.56
15	45(0)	48(0)	50(0)	35.19	55.36	55.56

Table 2. Coeffisien regression synthesis of sorbitol oleate esters using lipases from *Carica papaya* latex, *Candida rugosa*, *Rhizopus arrhizus*

Lipase	Ao	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9
CPL	36.503	-0.300	1.8963	5.2913	-2,064	-6.1217	-10.1217	0.5025	1.3425	-0.0250
CRL	55.36	0.3338	5.5938	7.0525	-16.95	-7.7888	-3.3213	-0.4725	0.305	-2.105
RAL	55.56	-1.684	6.274	14.068	-19.06	-6.928	-12.145	1.630	1.297	2.677

CPL=lipase of *Carica papaya* latex ; CRL=lipase of *Candida rugosa*; RAL=lipase of *Rhizopus arrhizus*; Nilai R: CPL= 0.88; CRL=0.75; RAL=0.85

Dari data diatas terlihat bahwa persamaan konversi secara signifikan dapat diterima sebagai model persamaan dengan nilai R antara 0,75 sampai 0,87. Data koefisien regresi selanjutnya dianalisis dengan program Matlab akan diperoleh kondisi optimum dan bentuk persamaan kanonis

yang menggambarkan hubungan antara konversi molar (%) dengan tiga faktor variabel proses suhu (W_1), waktu (W_2) dan Enzim (W_3) pada sintesis ESO melalui jalur esterifikasi dengan berbagai sumber lipase sebagai Tabel 3.

Table 3. Canonical equation synthesis of sorbitol oleate esters using lipases from *Carica papaya* latex, *Candida rugosa*, and *Rhizopus arrhizus*

Lipases	Canonical equation
<i>Carica papaya</i> latex,	$Y = 37.3066 - 10.6892W_1^2 - 6.1366W_2^2 - 1.9969W_3^2$
<i>Candida rugosa</i> ,	$Y = 59.488 - 16.9544W_1^2 - 8.0302W_2^2 - 3.0844W_3^2$
<i>Rhizopus arrhizus</i>	$Y = 61.8913 - 19.1628W_1^2 - 12.4399W_2^2 - 6.5332W_3^2$

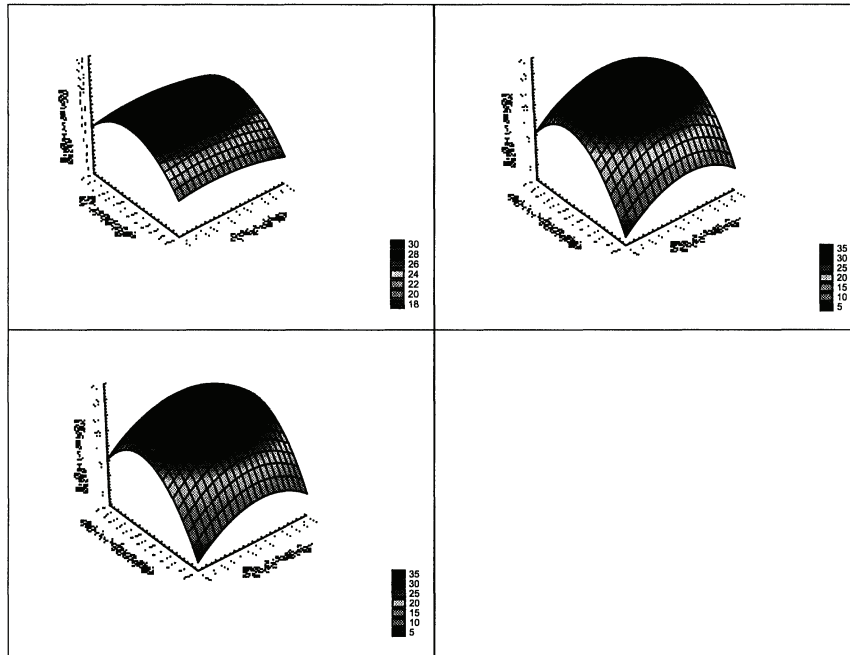
Table 4. Optimisation synthesis of sorbitol oleic ester using lipases from *Carica papaya* latex, *Candida rugosa*, *Rhizopus arrhizus*

Variable proses optimum	Lipases		
	<i>Carica papaya</i> latex (CPL)	<i>Candida rugosa</i> (CRL)	<i>Rhizopus arrhizus</i> (RAL)
W ₁ : Temperature (°C)	45.14	45.08	45.01
W ₂ : Time (hours)	51.73	53.42	61.86
W ₃ : Enzyme (units)	56	75	66
Conversion molar(%)	37.308	59.488	61.891
Sorbitol (molar)	0.001	0.001	0.001
Oleic acid (molar)	0.003	0.003	0.003

Koefisien pada persamaan kanonis diperoleh dengan menghitung nilai eigen dari matriks menggunakan program Matlab. Tanda koefisien di dalam persamaan dapat digunakan untuk menentukan sifat dari daerah stasioner, apakah merupakan daerah maksimum, sadel atau minimum. Jika tanda dari koefisien faktor proses (W) bertanda negatif semua, maka daerah tersebut maksimum. Jika koefisien W bertanda positif semua, maka daerah stasionernya minimum. Tetapi, jika tanda di dalam persamaan tersebut campuran positif dan negatif, maka daerah stasionernya bersifat sadel. Di dalam persamaan kanonis, hasil analisis penelitian ini menunjukkan persamaan kanonis dengan tanda negatif pada konstanta koefisiennya, yang berarti daerah stasioner bersifat maksimum. Dari persamaan kanonis dan analisis Matlab diatas dapat dihitung kondisi optimum sintesis ESO melalui jalur esterifikasi seperti disajikan pada Tabel 4

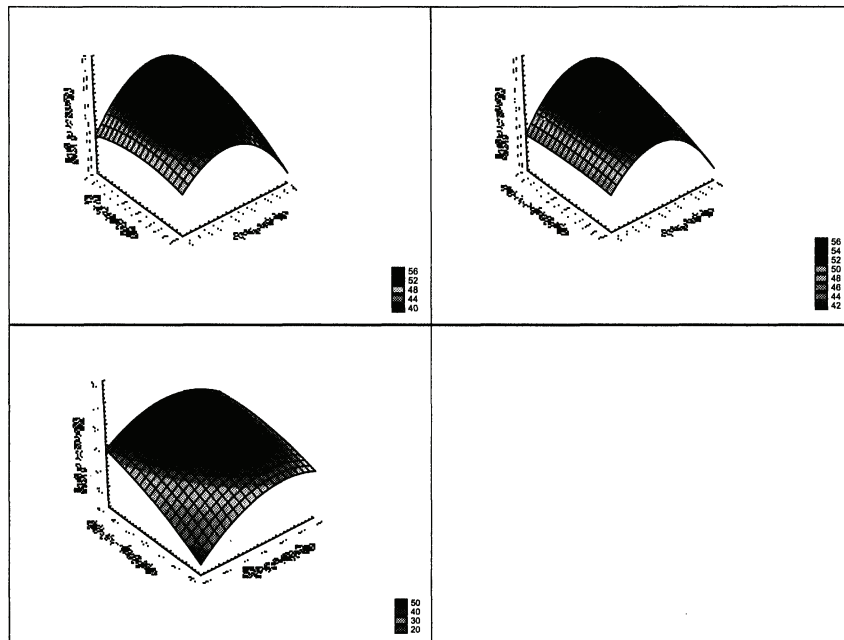
Berdasar data Tabel 4 diketahui bahwa suhu optimum sintesis ESO untuk ketiga sumber lipase relatif sama yaitu suhu berkisar antara 45,01 sampai 45,14°C. Konversi sub-

strat menjadi produk oleh lipase getah pepaya lebih rendah dibandingkan lipase *Candida rugosa* dan *Rhizopus arrhizus*. Hal ini dikarenakan dalam getah pepaya mengandung papain yang dapat menghidrolisis protein enzim lipase didalamnya sehingga aktivitas lipase menjadi rendah. Untuk mengurangi pengaruh papain maka ditambahkan inhibitor papain misalnya menggunakan *phenylmethanesulfonylfluorida* (PMSF) (Brockhoff dan Jensen, 1974). Selain itu dapat dilakukan pemurnian lipase getah pepaya dengan cara isolasi dan fraksinasi menggunakan sephadex G 100, sehingga aktivitasnya dapat meningkat dari 290 unit menjadi 2994 unit (Suhardi dkk., 2004). Data yang diperoleh selanjutnya dapat divisualisasikan dalam bentuk kurva dengan menggunakan program *statistica-6*. Berdasarkan kondisi optimum diatas selanjutnya dapat digambarkan tiga dimensi respon permukaan dan konturnya hubungan antara konversi molar (%) dengan faktor suhu, waktu, jumlah lipase pada sintesis ESO seperti disajikan pada Gambar 2 s/d 4.



Plot tiga dimensinya menggambarkan bahwa kondisi prosesnya memberikan respon konversi yang maksimum(daerah puncak)

Figure 2 . Plot of 3D-response surface synthesis of sorbitol oleate esters using lipase from *Carica papaya* latex.



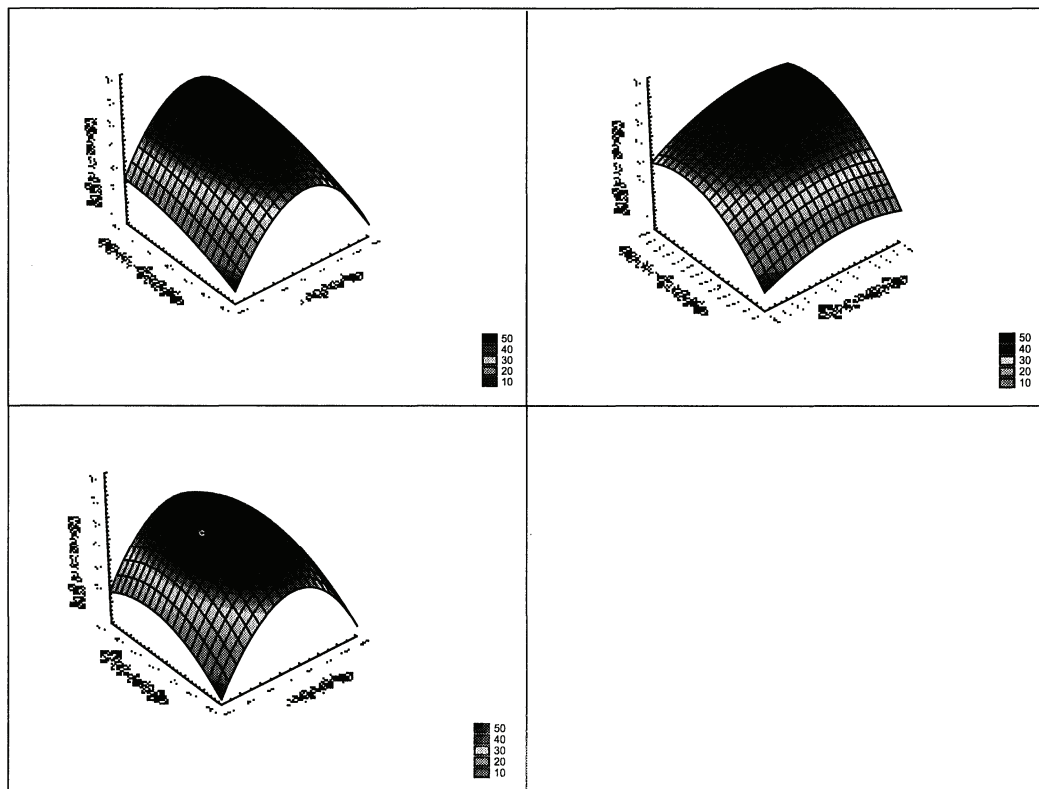
Plot tiga dimensi *response surface* menggambarkan bahwa kondisi prosesnya memberikan respon konversi yang maksimum meskipun areanya mempunyai puncak yang landai.

Figure 3. Plot of 3D-response surface synthesis of sorbitol oleate esters using non specific lipase from *Candida rugosa*.

Karakterisasi Produk Ester Sorbitol Oleat

Konfirmasi Produk Dengan TLC. Analisa dengan TLC (*Thin Layer Chromatography*) merupakan analisa yang berdasarkan prinsip *like dissolves like*. Hal ini berarti untuk memisahkan sampel yang bersifat nonpolar digunakan sistem pelarut yang bersifat nonpolar juga (Adnan, 1997). Untuk mengetahui apakah hasil reaksi mempunyai sifat sesuai dengan produk yang diinginkan, digunakan TLC dengan

fase stasioner silika gel G. F 60 (20x 20x 0,25 cm) yang bersifat polar, dan sebagai fase mobil digunakan petroleum eter : dietil eter : asam asetat glasial = 65: 35: 1 (v/v/v). Sampel yang bersifat lebih polar akan berada di bawah (nilai Rf lebih kecil) dan sebaliknya yang non polar Rf lebih besar. Nilai Rf standar dan produk ESO dari TLC dapat dilihat pada Tabel 5, sedangkan kromatogram dari TLC dapat dilihat pada Gambar 5.



Plot tiga dimensi *response surface* menggambarkan bahwa kondisi prosesnya memberikan respon konversi yang maksimum dengan permukaan puncak yang relatif landai.

Figure 4. Plot of 3D-response surface synthesis of sorbitol oleate esters using specific 1,2 lipase from *Rhizopus arrhizus*.

Kromatogram TLC menunjukkan bahwa ESO hasil sintesis menggunakan lipase *Candida rugosa* mempunyai 3 komponen yaitu komponen satu dengan waktu retensi mirip dengan sorbitol monooleat (Derajat esterifikasi = DE 1), komponen dua dengan Rf antara SMO dan STO dan komponen ketiga mirip sorbitol trioleat (DE 3). Hal ini berarti bahwa produk ESO yang diperoleh tersusun dari campuran ester dengan DE 1, 2 dan 3. Hal ini sesuai dengan sifat lipase dari *Candida rugosa* yang non spesifik dapat mengkatalisis alkohol primer maupun alkohol sekunder. Selain mengesterifikasi pada alkohol primer yang berada di ujung atom C₁

dan atom C₆ juga yang ada pada rantai atom C yang lainnya (Macrae, 1983). Ester sorbitol oleat (ESO) yang dihasilkan menggunakan lipase bubuk getah pepaya maupun lipase dari *Rhizopus arrhizus* mempunyai nilai Rf mirip dengan sorbitan monooleat (DE 1), dan dibawah sorbitan trioleat, sehingga dapat diduga merupakan ester sorbitol dioleat (DE 2). Data ini sesuai dengan sifat kedua lipase bubuk getah pepaya maupun *Rhizopus arrhizus* yaitu spesifik 1,3 pada trigliserida atau hanya mengkatalisis esterifikasi pada alkohol primer (Gandhi dan Mukherjee, 2001).

Table 5. Rf value of sorbitan esters and sorbitol oleate esters (SOE) products

Sampel	Nilai Rf
Oleic acid	0.74
Sorbitan monooleat (SMO)	0.43
Sorbitan trioleat (STO)	0.94
SOE-CPL: products using lipase from <i>Carica papaya</i> latex	0.43 and 0.57
SOE-CRL: products using lipase from <i>Candida rugosa</i>	0.43; 0.57 and 0.95
SOE-RAL: products using lipase from <i>Rhizopus arrhizus</i>	0.43 and 0.57

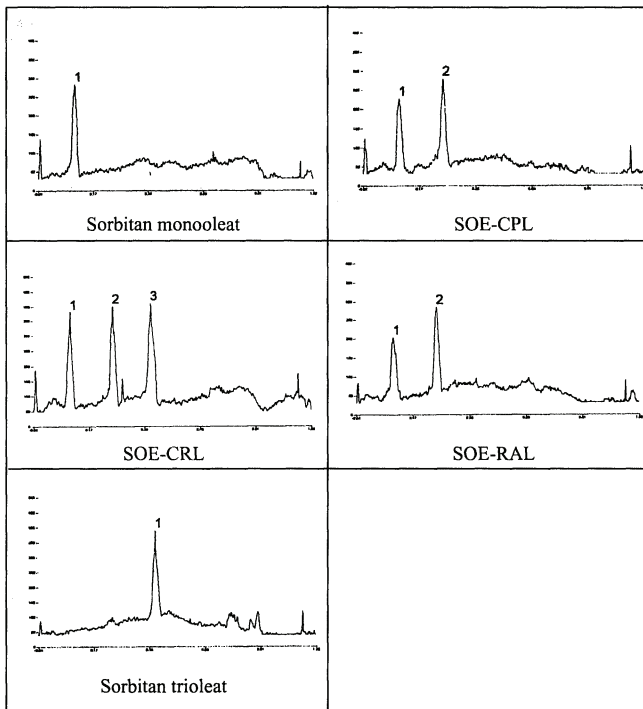


Figure 5. Chromatogram of sorbitol monooleat , sorbitol trioleat and SOE products from CPL,CRL, RAL.

Menurut Gunstone dan Padley (1997), untuk dapat menyediakan *steric hindrance* yang diperlukan untuk menghambat pencernaan, struktur ester sorbitol oleat harus mempunyai lebih dari empat ester asam lemak ($DE > 4$). Poliester yang mempunyai derajat esterifikasi kurang dari empat tidak dapat berfungsi sebagai *fat replacer*, tetapi hanya sebagai emulsifier. Oleh karena itu, ESO yang dihasilkan pada penelitian ini berfungsi sebagai emulsifier karena ester yang dihasilkan mempunyai derajat esterifikasi antara satu dan tiga.

Komposisi Asam Lemak dengan Gas Chromatography (GC). Komposisi asam lemak dalam produk ESO yang disintesis lipase *Candida rugosa* ditentukan dengan menggunakan kromatografi gas. ESO dalam penelitian ini disintesis dari asam oleat dan sorbitol. Oleh karena itu, komposisi asam lemak yang utama pada ESO adalah asam oleat ($C_{18:1}$) sebesar 51,63%, seperti yang terlihat pada hasil kromatogram GC. Walaupun demikian, hasil kromatogram juga menunjukkan adanya asam lemak lain berupa impurities seperti asam palmitat ($C_{16:0}$), sebesar 3%, asam linoleat ($C_{18:2}$) sebesar 32,7%. Hal ini menunjukkan bahwa asam oleat yang digunakan dalam penelitian ini tidak murni dan mengandung campuran asam lemak lain.

Derajat substitusi (DS) menggunakan angka hidrosil. Untuk mengetahui derajat esterifikasi dari ESO dilakukan analisis angka hidrosil (AOAC 1995). Angka hidrosil menunjukkan jumlah ekuivalen KOH yang berikatan dengan gugus hidrosil ($-OH$) bahan. Sorbitol memiliki angka hidrosil enam. Setelah reaksi esterifikasi, diharapkan sebagian atau seluruh gugus hidrosil pada sorbitol mampu mengikat asam lemak sehingga produk akhir memiliki angka hidrosil yang lebih kecil. Makin kecil angka hidrosil produk, makin baik proses esterifikasi, ditunjukkan derajat esterifikasi (DE) atau derajat substitusi (DS) tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa angka hidrosil sorbitol adalah 85,03 mg KOH/g (atau setara dengan 6 gugus $-OH$), sedangkan angka hidrosil ESO menggunakan lipase *Candida rugosa* adalah 44,08 mg KOH/g. Dengan demikian, persentase asam oleat yang teresterifikasi pada sorbitol adalah sebesar 48,16 % atau diperkirakan derajat substitusi yang diperoleh pada produk ESO-CRL adalah 2,89 mendekati 3 atau sebagai ESO-trioleat. Hasil konversi ini mirip dengan hasil TLC yang diperoleh, bahwa ESO disusun oleh campuran DE1, DE2 dan DE3. Angka hidrosil ESO hasil sintesis menggunakan lipase getah pepaya sebesar 57,45 mgKOH/g. Ini berarti derajat substitusi ESO-CPL sebesar 1,9, merupakan campuran ESO dengan DE 1 dan DE 2 sesuai dengan hasil pengamatan dengan TLC. Angka hidrosil ESO hasil sintesis menggunakan lipase *Rhizopus arrhizus* sebesar 55,95 mgKOH/g, menunjukkan bahwa ESO-RAL mempunyai derajat substitusi sebesar 2,05 hal ini sesuai pengamatan dengan TLC.

Keseimbangan hidrofilik-lipofilik (HLB). Nilai HLB digunakan untuk mengetahui kemampuan ESO sebagai pengemulsi. Nilai HLB emulsifier berkisar antara 0-20. Nilai HLB yang rendah (3-6) mengindikasikan bahwa emulsifier tersebut lebih larut dalam minyak daripada di dalam air dan berfungsi sebagai pengemulsi W/O. Sebaliknya nilai HLB yang tinggi (8-15) mengindikasikan bahwa emulsifier tersebut lebih larut dalam air daripada dalam minyak dan berfungsi sebagai pengemulsi O/W (Hui, 1996).

Penentuan nilai HLB dalam penelitian ini menggunakan metode jumlah air yang menunjukkan volume air yang harus ditambahkan pada larutan ESO dalam DMF: benzene 100:5 untuk membentuk emulsi stabil yang ditandai oleh kekeruhan permanen. Berdasarkan kurva kalibrasi jumlah air vs HLB (Gupta dkk., 1983), ESO yang disintesis menggunakan lipase *Candida rugosa* memiliki nilai HLB sekitar 3-6. Nilai HLB ESO yang disintesis dengan lipase bubuk getah pepaya maupun lipase *Rhizopus arrhizus* sebesar 7,5-8,0. Hal ini menunjukkan bahwa ESO dengan HLB 3-6 maupun 7,5-8,0 dikelompokkan memiliki nilai HLB yang rendah dan berfungsi sebagai pengemulsi air dalam minyak (W/O), (McClements, 1999).

Kemampuan ESO mempertahankan emulsi. Sorbitan monooleat (SMO) dan sorbitan trioleat (STO) yang digunakan sebagai standar memiliki nilai HLB masing-masing 4,3 dan 1,8 yang berfungsi untuk menstabilkan emulsi air dalam minyak (W/O) (Gunstone dan Padley,1997). Hasil penelitian menunjukkan bahwa emulsifier dilarutkan dalam campuran 5% air dalam minyak, emulsi dapat dipertahankan 45-345 menit tergantung jenis emulsifiernya, seperti terlihat pada Tabel 6. Data tersebut menunjukkan makin tinggi konsentrasi emulsifier makin lama dapat mempertahankan emulsi air dalam minyak.

Table. 6. Emulsion stability (W/O) by sorbitol oleate esters and sorbitan oleate

Emulsifier (%)	Stability emulsion (W/O) by sorbitol esters (minute)				
	ESO <i>Carica papaya</i> latex	ESO <i>Candida rugosa</i>	ESO <i>Rhizopus arrhizus</i>	Sorbitan mono-oleate	Sorbitan trioleate
1	45	45	45	210	165
3	90	100	120	285	265
5	140	240	280	345	315

Stabilitas emulsi W/O oleh ESO *Rhizopus arrhizus* lebih baik dari pada ESO *Candida rugosa* disebabkan gugus hidrosi yang bersifat hidrofilik lebih banyak apad ESO *Rhizopus arrhizus* dan air lebih kuat terikat, sehingga emulsi lebih stabil. Hal ini juga diperkuat dengan data yang menunjukkan bahwa sorbitan monooleat lebih lama dapat mempertahankan emulsi W/O dari pada sorbitan trioleat. ESO *Rhizopus arrhizus* dan carica pepaya meskipun mempunyai nilai HLB 7,5-8,0, namun karena dalam struktur kimia masih mengandung gugus hidroksi yang cukup besar yaitu empat buah, maka dapat dimungkinkan daya ikat terhadap air yang ada dalam emulsi cukup besar sehingga masih dapat mempertahankan emulsi W/O. Menurut Hui, (1996) surfaktan yang mempunyai nilai HLB 8-15 berfungsi sebagai pengemulsi O/W, ternyata pada ESO CPL dan ESO RAL masih dapat mempertahankan emulsi W/O. Hal ini menunjukkan bahwa angka tersebut tidak bersifat mutlak, nilai HLB 7,5 ada diperbatasan yang dimungkinkan masih dapat berfungsi sebagai surfaktan dengan nilai HLB dibawahnya, meskipun tidak sekuat dengan surfaktan dengan HLB 3-6.

Kemampuan mempertahankan emulsi W/O oleh semua ESO yang disintesis dengan lipase bubuk getah pepaya, *Candida rugosa* maupun *Rhizopus arrhizus* lebih rendah diban-

dingkan emulsifier yang ada dipasaran yaitu sorbitan monooleat maupun sorbitan trioleat. Hal ini disebabkan kemurnian produk ESO masih relatif rendah (60-70%). Untuk mempertinggi kemampuan mempertahankan stabilitas emulsi dapat dilakukan dengan pemurnian, misalnya dengan melewati kolom kromatografi.

Tegangan permukaan ESO hasil sintesis menggunakan lipase bubuk getah pepaya dan *Rhizopus arrhizus* hampir sama yaitu masing-masing 35,1 dan 34,9 dyne/cm, sedangkan ESO hasil sintesis dengan lipase *Candida rugosa* sedikit lebih kecil yaitu 31,18-31,83 dyne/cm. Data ini menunjukkan bahwa ESO yang yang disintesis oleh lipase dari berbagai sumber dapat menurunkan tegangan permukaan suatu cairan, sehingga dapat digunakan sebagai emulsifier.

KESIMPULAN

1. Kondisi optimum sintesis ESO melalui reaksi esterifikasi menggunakan lipase getah pepaya suhu 45,15 °C, waktu inkubasi 51,73 jam, banyaknya enzim 56 unit untuk sorbitol 0,001molar dan asam oleat 0,003 molar, konversi substrat menjadi produk 37,30 % molar.
2. Kondisi optimum sintesis ESO melalui reaksi esterifikasi menggunakan lipase *Candida rugosa* pepaya suhu

- 45,08 °C, waktu inkubasi 53,42 jam, banyaknya enzim 75 unit untuk sorbitol 0,001molar dan asam oleat 0,003 molar, konversi substrat menjadi produk 59,48 % molar.
3. Kondisi optimum sintesis ESO melalui reaksi esterifikasi menggunakan lipase *Rhizopus arrhizus* suhu 45,01 °C, waktu inkubasi 61,68 jam, banyaknya enzim 66 unit untuk sorbitol 0,001molar dan asam oleat 0,003 molar, konversi substrat menjadi produk 61,89 % molar.
 4. Karakteristik ESO yang diproduksi menggunakan lipase getah pepaya, dan *Rhizopus arrhizus* mempunyai derajat esterifikasi (DE) 1 dan DE 2, sedangkan yang diproduksi dengan lipase *Candida rugosa* merupakan campuran ESO dengan DE 1, DE 2 dan DE 3. Semua ESO dapat digunakan untuk emulsifier sistem emulsi W/O.
 5. Meskipun ESO yang dihasilkan lipase getah pepaya (37,9%) lebih rendah dari pada lipase *Candida rugosa* (59,4%) dan *Rhizopus arrhizus* (61,8%) pada sintesis ester sorbitol oleat, tetapi karena preparasi lipase getah pepaya sangat mudah dan produktivitas tanaman pepaya sangat tinggi, maka sangat potensial untuk dikembangkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih kepada RUSNAS-MAKSI yang telah memberikan dana penelitian ini pada tahun 2003-2004.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M.(1997). *Teknik kromatografi untuk analisis bahan makanan*. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Adelhorst, K., Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E. dan Kirk, O. (1990). Enzyme catalysed preparation of 6-O-acylpyranosides. *Synthesis* **2**:112-115.
- Akoh, C.C. (1994). Synthesis of carbohydrate fatty acid polyesters. Dalam Akoh C.C. dan Swanson B.G. (ed). *Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes*, hal. 9-35, Marcel Dekker, Inc. New York.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists*. Sidney W. (ed.). The AOAC Inc., Virginia. USA.
- Arcos, J.A., Bernabe, M. dan Otero, C. (1998). Quantitative enzymatic production of 1,6diacyl sorbitol esters. *Journal of Biotechnology and bioengineering*, **60**: 53-60
- Box, G.E.P. dan Wilson, K.B. (1951). On the Experiment Attainment of Optimum Conditions. *Journal of Royal Statist Soc. (Series B)* **13** : 1 – 45
- Brockerhoff, H., dan Jensen, R.G. (1974). *Lipolytic enzymes*. Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Cao, L., Fisher, A. Bornscheuer, U.T. dan Schmid, R.D. (1996). Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters. *Journal of Biocatalyst and Bio-transformation*. **14**:269-283.
- Caro Y, Villeneuve, P., Pina, M., Reynes, M. dan Graille, J. (2000). Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **77** : 891-901.
- Chopineau, J., McCafferty, F.D., Therisod, M. dan Klibanov, A.M. (1988). Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a non-aqueous medium. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*. **31**:208-214.
- Chung, H-Y., Park, J., Kim, J-H., and Kong, U-Y. (1996). Preparation of sorbitol fatty acid polyesters, potential fat substitutes : Optimization of reaction conditions by Response Surface Methodology. *Journal of American Oil Chemistry Society*.. **73** : 637 – 643
- Gandhi, N.N. dan Mukherjee, K.D. (2001). Specificity of papaya lipase in esterification of aliphatic alcohols- a comparison with microbial lipases. *Journal of American Oil Chemistry Society*.. **78** : 161-165
- Gupta R.K., James, K. dan Smith, F.J. (1983). Sucrose esters and sucrose ester / Glyceride blend as emulsifiers. *Journal of American Oil Chemistry Society*.**60**: 862-869.
- Gustone, F.D., dan Padley, F.B. (1977). *Lipid technology and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hui, Y.H. (1996). *Bailey's industrial oil and fat products*. Volume 2. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Macrae, A.R. (1983). Lipase Catalyzed Interesterification of Oil and Fat. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **60**: 291-294.
- Marseno, D.W., Indarti, R. dan Ohta, Y. (1998). A Simplified ethods for determination of free fatty acids for soluble and immobilized lipase assay. *Indonesia Food and Nutrition Progress*. **5**:79-83.
- McClements, J.D. (1999). *Food Emulsions : Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, USA.
- Montgomery, D.C. (1997). *Design and analysis of experiments*. 4th ed. John Wiley and Sons, New York.
- Mouquet, C.J., Dumas, C. dan Guilbert, S. (1992). Texturization of sweetened mango pulp : Optimization us-

- ing response surface methodology. *Journal of Food Science*. **57** : 1395-1400.
- Mukherjee, K.D., and Kiewitt, I. (1996). Specificity of *Carica papaya* latex as biocatalyst in the esterification of fatty acids with 1-butanol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **44**:1948-1952
- Pulido, R., Lopez, F.O. dan Gotor, V. (1992). Enzymatic regioselective acylation of hexoses and pentoses using oxime esters. *Journal of Chemical Society*. Perkin-Trans. **I**:2981-2988.
- Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A.P.G dan Klibanov, A.M. (1988). Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **110**:584-589
- Schlotterbeck, A., Lang, S., Wray, V. dan Wagner, F. (1993). Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Ibid*. **15**:61-64.
- Seino, H., dan Tsuyoshi, U. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I) Esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **61**: 1761-1765 .
- Shieh, C.J., Akoh, C.C. dan Koehler, P.E. (1995). Four factor response surface methodology. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **72**: 619-623.
- Suhardi. (2003). Penggunaan getah pepaya dalam sintesis ester xilitol asam lemak (EXAL). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **XIV**.
- Suhardi, Tranggono, dan Sudarmanto S. (2003). Sintesis ester xilitol asam lemak (EXAL) dengan lipase spesifik Sn 1,3 dari *Rhizopus arrhizus*. *Prosiding Seminar Nasional PATPI*. Peranan Industri dalam Pengembangan Produk Pangan Indonesia, Yogyakarta 22-23 Juli 2003.
- Suhardi, Tranggono, Hastuti, P. dan Muchalal, M. (2004). Isolasi dan karakterisasi lipase getah pepaya. *Prosiding Seminar Nasional PBBMI*, di Yogyakarta, 2 Oktober 2004, ISBN : 979-96008-1-2
- Therisod, M., and Klibanov, A.M. (1986). Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **108**: 5638-5640.
- Villeneuve, P. and Foglia, T.A. (1997). Lipase specificities : Potential application in lipid bioconversions. *INFORM*. **8**:640-650
- Yan, Y., Bornscheuer, U.T., Cao, L. dan Schmid, R.D. (1999). Lipase catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters: Removal of by products by azeotropic distillation. *Journal of Enzyme and Microbial Technology*. **25**:725-728.
- Yan, Y., Bornscheuer, U.T., Stadler, G., Wahl, S.L, Reuss, M. dan Schmid, R.D. (2001). Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor : Optimization of parameters by response surface methodology. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **78**:147-152.