

ASIDOLISIS ENZIMATIK FRAKSI TENGAH MINYAK SAWIT DENGAN ASAM STEARAT UNTUK SINTESIS *COCOA BUTTER EQUIVALENTS*

Soenar Soekopitojo

Abstract: *Enzymatic acidolysis of palm midfraction (PMF) with stearic acid for the synthesis of cocoa butter equivalents (CBE). CBE have chemical and physical properties compatible with those of cocoa butter (CB) and can be used to replace CB in chocolate confectionery product formulation. The main analysis were triacylglycerol (TAG) composition, solid fat content (SFC) and slip melting point (SMP). Enzymatic acidolysis of the substrates resulted in the formation of a complex mixture of acylglycerols and free fatty acids. Concentration of several TAG were increased, some were decreased, and several new TAGs were formed. Synthesis of target TAG (POS, SOS) increased with increasing proportion of stearic acid to 5:4 weight ratio in the substrates. The resulting changes in the TAG composition of the substrates were reflected in the SFC profiles and SMP values. The SFC values could be predicted from the proportion of MMM, StStM and StStD TAG groups, either single or combined.*

Abstrak: Asidolisis Enzimatis Fraksi Tengah Minyak Sawit dengan Asam Stearat untuk Sintesis *Cocoa Butter Equivalents* (CBE). CBE mempunyai sifat-sifat kimia dan fisik yang kompatibel dengan *cocoa butter* (CB) dan dapat digunakan sebagai pengganti CB dalam formulasi produk cokelat *confectionery*. Analisis utama meliputi komposisi triasilgliserol (TAG), *solid fat content* (SFC) dan *slip melting point* (SMP). Asidolisis enzimatis dari substrat menghasilkan terbentuknya campuran kompleks asilgliserol dan asam lemak bebas (ALB). Konsentrasi beberapa TAG meningkat, beberapa menurun dan beberapa TAG baru terbentuk. Sintesis TAG target (POS, SOS) meningkat dengan meningkatnya proporsi asam stearat sampai rasio berat 5:4 dalam substrat. Perubahan dalam komposisi TAG substrat tercermin pada profil SFC dan nilai SMP. Nilai SFC dapat diprediksi dari proporsi kelompok TAG MMM, StStM dan StStD, secara tunggal atau gabungan.

Kata-kata kunci: asidolisis enzimatis, *palm midfraction*, triasilgliserol, *cocoa butter equivalents*

C*ocoa Butter (CB)* dianggap sebagai lemak ideal dan pilihan dalam industri cokelat *confectionery* karena mempunyai karakteristik unik. Komposisi *CB*

hampir 80% didominasi oleh tiga triasilgliserol (TAG) simetrik, *saturated-unsaturated-saturated* (StUSt), yaitu palmitat-oleat-palmitat (POP, 16,8–19,0%),

palmitat-oleat-stearat (POS, 38,0–43,8%) dan stearat-oleat-stearat (SOS, 22,8–30,0%) (Lipp et al., 2001). Konsekuensinya CB bersifat keras dan rapuh di bawah suhu ruang, tetapi ketika dimakan, CB meleleh sempurna di mulut dengan tekstur *creamy* yang lembut dan suatu sensasi dingin (Akoh & Min, 2002).

Polimorfismenya juga berpengaruh besar terhadap sifat-sifat fisik dari produk cokelat, seperti kilap (*gloss*), derak (*snap*), kontraksi, ketahanan panas, pelelehan yang cepat dan tajam di mulut, serta ketahanan *bloom* (Osborn & Akoh, 2002).

Banyak keterbatasan menyangkut penggunaan CB, antara lain suplai yang tidak stabil, harga relatif mahal, kurang memadai untuk digunakan pada iklim panas serta kualitasnya bervariasi. Selain itu, proses *tempering* diperlukan untuk produk cokelat yang sepenuhnya menggunakan CB dalam formulasinya, karena cenderung akan mengalami *blooming* (Zaidul et al., 2007; Torbica et al., 2006).

Berbagai alasan tersebut mendorong dikembangkannya *specialty fats* alternatif CB oleh para peneliti maupun industri minyak dan lemak, sehingga dikenal istilah *cocoa butter alternatives* (CBA). Salah satu jenis CBA yang mempunyai sifat fisikokimia mirip CB dan sepenuhnya kompatibel dengan CB adalah *cocoa butter equivalents* (CBE).

CBE berperilaku seperti CB dan dapat dicampur dengan CB pada proporsi berapapun dalam formulasi cokelat tanpa mengubah karakteristik pelelehan, reologi, dan pengolahan, sehingga kualitas akhir produk tetap dipertahankan. CBE didesain agar mengandung komposisi TAG mirip CB, sehingga sifat-sifatnya diharapkan mirip dan kompatibel dengan CB dalam campuran untuk pembuatan cokelat (Zaidul et al., 2007). Berdasarkan hal tersebut, CBE mempunyai nilai ekonomi paling tinggi di antara jenis CBA lainnya. CBE mempunyai peranan antara lain untuk memperbaiki toleransi

terhadap lemak susu, meningkatkan daya simpan pada suhu tinggi, mengendalikan *blooming*, serta memberikan alternatif secara ekonomi terhadap penggunaan CB dalam formulasi cokelat (Widlak, 1999).

Akhir-akhir ini teknik interesterifikasi enzimatik menjadi salah satu pilihan dalam proses produksi CBE. Menurut Osborn & Akoh (2002) perhatian terhadap reaksi interesterifikasi, baik dari sudut pandang gizi maupun fungsional terus meningkat karena memungkinkan untuk dihasilkannya margarin bebas asam lemak trans, *cocoa butter alternatives* (CBA), dan pangan rendah kalori; memperbaiki sifat-sifat fisik dan fungsional pangan serta memperbaiki kualitas nutrisi lemak dan minyak.

Selama interesterifikasi akan terjadi redistribusi asam lemak dalam TAG, sehingga akan mengubah komposisi asam lemak dalam TAG. Perubahan jumlah dan jenis TAG tersebut akan mempengaruhi karakteristik fisik minyak dan lemak, seperti sifat pelelehan dan kristalisasi (Idris & Dian, 2005).

Interesterifikasi enzimatik lebih menawarkan banyak keuntungan dibandingkan dengan interesterifikasi kimia. Reaksi enzimatik lebih spesifik, kondisi reaksinya *mild* serta limbah yang dihasilkannya minimal. Selain itu apabila enzim yang digunakan dalam bentuk amobil, maka dapat digunakan berulang sehingga secara ekonomi lebih menguntungkan (Willis & Marangoni, 2002). Interesterifikasi kimia biasanya bersifat acak dan sulit dihentikan jika reaksi berlangsung sangat cepat, sedangkan reaksi interesterifikasi enzimatik biasanya berlangsung lebih lambat dan lebih mudah untuk dikendalikan.

Interesterifikasi enzimatik untuk sintesis lemak dengan profil TAG mirip CB dapat dilakukan melalui reaksi transesterifikasi ataupun asidolisis. Transesterifikasi merupakan reaksi pertukaran gugus asil antara dua ester, yaitu antara dua TAG. Sedangkan asidolisis merupakan

reaksi perpindahan gugus asil antara suatu asam dengan suatu ester, atau dapat diartikan sebagai inkorporasi asam lemak bebas baru ke dalam TAG (Willis & Marangoni, 2002).

Asidolisis enzimatis merupakan reaksi interesterifikasi yang paling banyak digunakan untuk TAG terstruktur. Penggunaan lipase spesifik-1,3 sebagai katalis dalam proses produksi CBE lebih menguntungkan untuk substrat berbasis sawit, karena minyak sawit dan fraksi-fraksinya mengandung jumlah signifikan TAG simetrik (POP) yang merupakan satu dari TAG utama yang ada dalam CB dan akan lebih mudah untuk dimodifikasi menjadi TAG POS dan SOS sebagai hasil reaksi antara TAG POP dengan bahan baku sumber asam stearat (Nielsen et al., 2000).

Produksi CBE secara asidolisis enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan lipase spesifik sn-1,3 yang mengkatalisis inkorporasi asam stearat dan palmitat pada posisi sn-1,3 dari minyak awal yang mengandung asam oleat pada posisi sn-2 sampai komposisi yang mirip dengan CB diperoleh (Ciftci et al., 2009). Efisiensi dari reaksi asidolisis untuk produksi CBE tergantung pada parameter reaksi yaitu rasio substrat, suhu reaksi, waktu reaksi, konsentrasi enzim dan kandungan air.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi proses sintesis triasilgliserol khas CBE secara asidolisis enzimatis dari substrat PMF dengan asam stearat dalam upaya mendapatkan teknologi proses produksi CBE skala laboratorium. Evaluasi yang dilakukan meliputi kajian terhadap pengaruh rasio substrat terhadap perubahan profil TAG dan sifat pelelehannya (profil SFC) setelah reaksi asidolisis serta mendapatkan hubungan antara profil TAG dengan profil SFC.

METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *palm midfraction* (PMF) dan *cocoa butter* (CB) (PT Karya Putrakreasi Nusantara, Wilmar Group, Medan). Lipase spesifik-1,3 amobil komersial dari *Thermomyces lanuginosa* yang disebut Lipozyme TL IM (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Denmark). Standar triasilgliserol (TAG) murni (OOO, POO, SOO, PPP, SSS) dari Sigma (St. Louis, MO USA), asam stearat (Merck) serta bahan-bahan kimia untuk analisis. Untuk melengkapi standar TAG, TAG murni dicampur dengan minyak/lemak yang telah diketahui komposisi TAG-nya, yaitu RBDPO (PLO, PLP, OOO, POO, PPP), CB (POP, POS, SOS, SOA) dan FHSO (PPP, PPS, PSS, SSS). Keterangan: A = asam arakhidat, L = asam linoleat, O = asam oleat, P = asam palmitat, S = asam stearat.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *orbital shaker*, *water bath*, pompa vakum, refrigerator, timbangan, *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC Hewlett Packard series 1100) dengan detektor *Refractive Index* (RI), *Bruker Minispec PC 100 Nuclear Magnetic Resonance Analyzer* (NMR) serta alat-alat gelas.

Asidolisis Enzimatis

Reaksi asidolisis enzimatis mengacu pada metode yang dimodifikasi dari Chong et al. (1992), Mojovic et al. (1993), Satiawihardja et al. (2001), dan Ciftci et al. (2009). Sebanyak 5 gr substrat campuran fraksi tengah minyak sawit (*palm midfraction*, PMF) dengan asam stearat pada rasio berat 5:1 sampai dengan 5:5 dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 25 mL. Selanjutnya enzim lipase sebanyak 6% (b/b minyak) ditambahkan ke dalam campuran substrat yang sudah dipanaskan terlebih dahulu pada suhu

sekitar 68–70°C selama 10 menit. Reaksi asidolisis dilakukan secara *batch* dengan kecepatan *orbital shaker* 200 rpm, suhu reaksi 68–70°C dan waktu reaksi 20 jam. Pemisahan enzim dari hasil asidolisis dilakukan dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring (dalam keadaan panas).

Komposisi Triasilgliserol

Analisis komposisi TAG mengacu pada metode yang dimodifikasi dari *AOCS Official Methods Ce 5c* (1997). Komposisi TAG dianalisis menggunakan HPLC *Hewlett Packard series 1100* dengan detektor Indeks Refraksi (*Refractive index*, RI). Laju aliran fase gerak (aseton: asetonitril, 85:15 v/v) sebesar 0,8 mL/menit. Kolom yang digunakan adalah dua kolom C-18 (Microsorb MV dan Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6×250 mm, ukuran partikel 5 µm) yang dipasang secara seri. Sampel dilarutkan dalam aseton atau campuran aseton : kloroform (2:1 v/v) dengan konsentrasi 5%, lalu disuntikkan ke dalam HPLC sebanyak 20 µL. Analisis komposisi TAG dilakukan terhadap substrat sebelum dan sesudah reaksi asidolisis.

Solid Fat Content (SFC)

Analisis SFC (IUPAC 2.150 ex 2.323, 1987) substrat dan produk asidolisis menggunakan *Bruker Minispec PC 100 NMR Analyzer*. Sampel dilelehkan terlebih dahulu pada suhu 80°C. Sampel dimasukkan ke dalam tabung NMR dengan menggunakan pipet tetes sebanyak 2.5 mL (setinggi *dry block*), lalu dipanaskan pada suhu 60°C selama 30 menit pada alat pemanas kering. Setelah itu sampel disimpan pada suhu 0°C selama 90 menit, selanjutnya sampel disimpan selama 40 jam pada suhu 26°C. Sampel disimpan lagi pada suhu 0°C selama 90 menit. Setelah itu sampel diinkubasi pada suhu 10, 20, 25, 30, 35, dan 40°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, sampel siap

dianalisis menggunakan *Bruker Minispec PC 100 NMR Analyzer*. Kalibrasi NMR menggunakan standar SFC 0%, 31,5% dan 72,9%.

Slip Melting Point (SMP)

Analisis SMP mengacu pada *AOCS Official Methods Cc 3–25* (2005). Sampel yang telah disaring dilelehkan dan dimasukkan ke dalam tabung kapiler (3 buah) setinggi 1 cm. Selanjutnya disimpan dalam *refrigerator* pada suhu 4–10°C selama 16 jam. Tabung kapiler diikatkan pada termometer dan termometer tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia (600 mL) berisi air (sekitar 300 mL). Suhu air dalam gelas kimia diatur pada suhu 8–10°C di bawah titik leleh sampel dan suhu air dipanaskan pelan-pelan (dengan kenaikan 0.5°C–1°C/menit) dengan pengadukan (*magnetic stirrer*). Pemanasan dilanjutkan dan suhu diamati dari saat sampel meleleh sampai sampel naik pada tanda batas atas. *Slip melting point* dihitung berdasarkan rerata suhu dari ketiga sampel yang diamati.

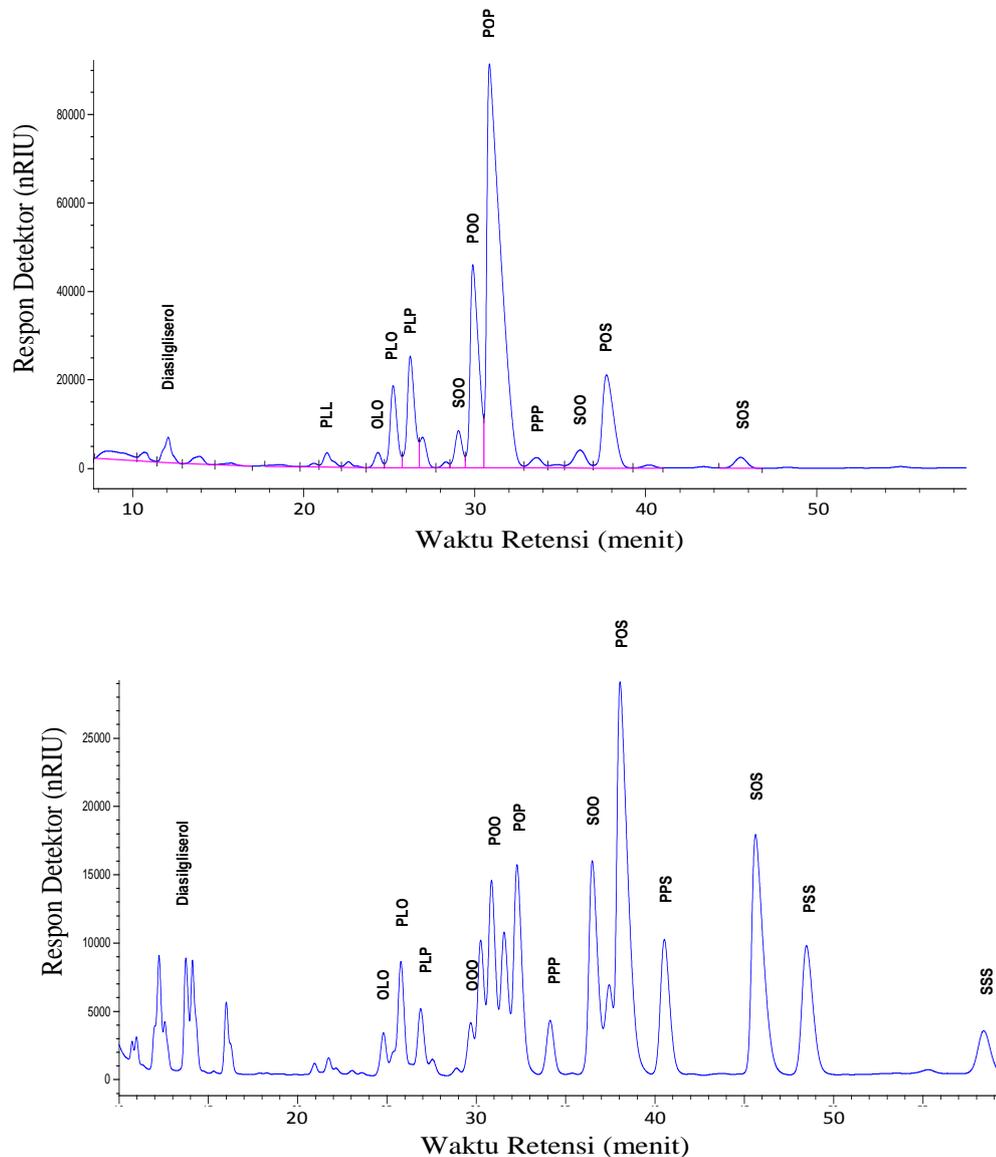
Analisis Statistik

Hubungan matematik antara komposisi TAG dengan SFC diduga melalui regresi linear berganda dengan pendekatan regresi bertahap (*stepwise regression*) menggunakan *Software SPSS Statistics 17.0*. R² digunakan untuk mengukur proporsi variabilitas dari variabel bebas untuk model yang digunakan.

HASIL

Komposisi TAG

Pada Gambar 1 dapat dilihat profil kromatogram hasil analisis komposisi TAG substrat PMF dan hasil asidolisis enzimatik. Sedangkan komposisi TAG substrat PMF dan hasil asidolisis enzimatik pada berbagai rasio berat dapat dilihat pada Tabel 1. Proses asidolisis enzimatik



Gambar 1. Profil Kromatogram Hasil Analisis Komposisi TAG PMF (atas) dan Substrat PMF/Asam Stearat Sesudah Reaksi Asidolisis (bawah)

terhadap substrat PMF/Asam Stearat mengakibatkan terbentuknya campuran kompleks asilgliserol dan asam lemak bebas (ALB).

Menurut Zhang et al. (2001), untuk interesterifikasi dengan katalis lipase spesifik-1,3, ALB dan sn-1,2(2,3)-DAG yang terbentuk merupakan produk samping hidrolisis. Proses asidolisis enzimatik juga mengakibatkan perubahan besar dalam komposisi TAG substrat. Profil TAG memperlihatkan adanya peningkat-

an dan penurunan konsentrasi beberapa TAG serta terbentuknya beberapa TAG baru. TAG yang meningkat konsentrasinya adalah PPP, SOO, POS, PPS dan SOS, TAG yang menurun konsentrasinya adalah PLL, OLO, PLO, PLP, OOO, POO dan POP, sedangkan TAG baru yang terbentuk adalah SLO, SLP, SLS, PPS, PSS dan SSS.

Perubahan paling besar terjadi terutama pada TAG dominan dalam substrat. Pada rasio berat 5:3, konsentrasi TAG

Tabel 1. Komposisi TAG PMF dan Hasil Asidolisis Substrat PMF/Asam Stearat pada Berbagai Rasio Berat

Jenis TAG (%area)	PMF	Rasio PMF/Asam Stearat (b/b)				
		(5:1)	(5:2)	(5:3)	(5:4)	(5:5)
PLL	1,85	0,85	0,58	0,53	0,59	0,54
OLO	1,66	2,73	1,77	1,45	1,30	1,26
PLO	8,49	6,76	4,91	4,32	4,26	4,13
PLP	9,04	3,96	2,72	2,45	2,46	2,56
OOO	3,46	3,67	2,40	1,83	1,65	1,49
SLO	ND*	2,71	3,79	4,23	4,18	4,16
POO	19,62	13,42	9,04	7,57	7,41	7,60
SLP	ND*	2,98	4,21	4,86	4,86	4,87
POP	39,03	15,43	10,75	9,21	9,28	9,50
PPP	1,67	5,55	3,84	2,48	2,24	2,19
SOO	2,43	7,07	8,40	8,92	9,06	9,14
SLS	ND*	1,14	1,65	2,45	2,63	2,62
POS	7,58	14,90	18,55	20,15	20,98	21,25
PPS	0,39	7,98	8,56	6,91	6,24	5,97
SOS	0,93	4,36	8,65	11,76	12,94	13,23
PSS	ND*	4,23	6,86	7,15	6,57	6,43
SSS	ND*	0,90	1,92	2,58	2,45	2,52
TAG lain	3,86	1,38	1,40	1,15	0,91	0,55
DAG	4,63	16,38	12,04	10,73	10,53	9,44
ALB	0,10	17,37	26,24	35,43	41,94	46,17
St3:	2,06	18,66	21,18	19,11	17,49	17,10
StStSt	2,06	18,66	21,18	19,11	17,49	17,10
St2U:	56,58	42,76	46,53	50,89	53,15	54,02
StStM	47,54	34,69	37,96	41,12	43,20	43,97
StStD	9,04	8,07	8,57	9,77	9,95	10,05
StU2:	32,39	30,81	26,72	25,57	25,51	25,57
StMM	22,05	20,49	17,44	16,49	16,47	16,74
StMD	8,49	9,47	8,70	8,56	8,44	8,29
StDD	1,85	0,85	0,58	0,53	0,59	0,54
U3:	5,12	6,40	4,17	3,27	2,95	2,75
MMM	3,46	3,67	2,40	1,83	1,65	1,49
MMD	1,66	2,73	1,77	1,45	1,30	1,26

*ND = tidak terdeteksi

POP menurun dari 39,03% menjadi 9,21%. Sementara itu, komponen TAG target (POS dan SOS), konsentrasinya meningkat cukup tinggi, konsentrasi TAG POS dan SOS meningkat masing-masing dari 7,58% dan 0,93% menjadi 20,13% dan 11,76%. Bahkan TAG POS menjadi TAG dominan pada hampir semua rasio berat substrat. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa sintesis POS dan SOS

dalam reaksi asidolisis enzimatik meningkat hanya sampai rasio substrat 5:4, sedangkan di atas konsentrasi tersebut penambahan asam stearat tidak lagi meningkatkan sintesis POS dan SOS.

Neff et al. (1999) dan Silva et al. (2009), mengelompokkan TAG menjadi empat kelompok menggunakan lambang U untuk gugus asam lemak tidak jenuh (*unsaturated*) dan St untuk gugus asam

lemak jenuh (*saturated*). Kelompok tersebut adalah St3 (*trisaturated*), St2U (*disaturated*), StU2 (*monosaturated*) dan U3 (*triunsaturated*). Selanjutnya Neff et al. (1999) juga mengelompokkan TAG berdasarkan derajat ketidakjenuhannya, dengan lambang St, mengandung asam lemak jenuh (St = palmitat, oleat); M, mengandung asam lemak *monoene* (M = oleat); D, mengandung asam lemak *diene* (D = linoleat) dan T, mengandung asam lemak *triene* (T = linolenat), sehingga diperoleh kombinasi StStSt (PPP, SSS), StStM (POP, POS), StStD (PLP), StMM (POO) dan seterusnya. Pada dasarnya pengelompokan TAG tersebut merupakan penjabaran dari pengelompokan TAG sebelumnya secara lebih terperinci. Pengelompokan selengkapnya untuk masing-masing rasio berat substrat juga dapat dilihat pada Tabel 1.

Profil SFC

Profil SFC hasil asidolisis enzimatis substrat PMF/Asam Stearat pada berbagai rasio berat disajikan pada Gambar 2. Sebagai pembanding di-gunakan SFC PMF dan CB. Profil SFC produk asidolisis memberikan kisaran (*range*) pelelehan yang lebih melebar dibandingkan dengan bahan bakunya. Tinggi rendahnya nilai SFC dipengaruhi oleh proporsi antara bahan baku dengan asam stearat dalam campuran substrat awal. Semakin tinggi konsentrasi PMF dalam campuran substrat, maka nilai SFC produk asidolisis semakin rendah pada masing-masing suhu pengukuran.

Nilai SMP

Proses asidolisis enzimatis mengakibatkan terjadinya penurunan SMP pada semua rasio berat substrat. Produk hasil asidolisis berbentuk padat pada suhu ruang, dengan SMP berkisar antara 39,5 sampai 56,3°C (Tabel 2). SMP tersebut relatif lebih rendah dibandingkan dengan substrat awal sebelum asidolisis yang

mempunyai nilai SMP berkisar antara 51,1–62,1°C.

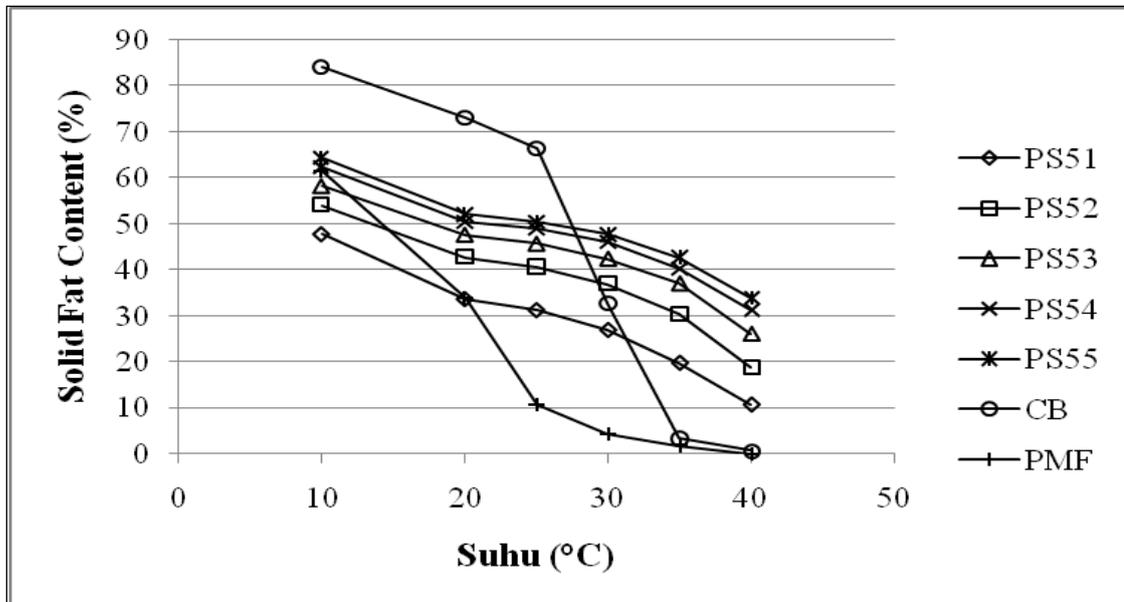
Tabel 2. SMP Substrat Sebelum (BA) dan Sesudah (SA) Reaksi Asidolisis Enzimatis

Rasio Berat Substrat	PMF/Asam Stearat	
	SMP	
	BA	SA
Rasio 5:1	51,1–52,0	39,5–40,2
Rasio 5:2	57,0–57,2	41,0–41,2
Rasio 5:3	60,0–60,3	45,0–45,8
Rasio 5:4	60,7–61,0	53,1–53,3
Rasio 5:5	61,4–61,9	56,2–56,3

PEMBAHASAN

Reaksi interesterifikasi yang dikatalisis enzim lipase dapat dilakukan pada media yang berbeda, baik dalam pelarut organik maupun dalam sistem bebas pelarut organik. Sintesis dalam sistem bebas pelarut organik menawarkan beberapa keuntungan meliputi dampak lingkungan yang minimal dengan menghindarkan penggunaan pelarut organik yang toksik dan mudah terbakar, penghematan biaya yang signifikan karena tidak adanya proses lebih lanjut serta tahap purifikasi yang lebih mudah dan lebih sedikit (Chaibakhsh et al., 2009).

Pada penelitian ini, proses asidolisis enzimatis dilakukan pada sistem bebas pelarut organik dengan suhu reaksi dipertahankan pada 68–70°C, sehingga substrat tetap dalam keadaan cair. Asam stearat yang digunakan pada penelitian ini mempunyai SMP tinggi (sekitar 67–70°C), sehingga digunakan suhu minimum 68°C untuk menjaga berlangsungnya reaksi. Menurut Zhang et al. (2001), pengurangan kadar air lipase dari 6% sampai 3% tidak mempengaruhi aktivitas lipase, tetapi cenderung menurunkan pembentukan DAG dalam sistem. Hal ini mengindikasikan bahwa air di dalam sistem, baik yang dibawa oleh enzim atau bahan baku dapat meningkatkan pembentukan produk samping, seperti ALB dan DAG.



Keterangan: PS51, PS52, PS53, PS54, PS55 = Rasio berat substrat PMF/Asam Stearat masing-masing 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 dan 5:5.

Gambar 2. Profil SFC PMF, CB dan Hasil Asidolisis Enzimatis Substrat PMF/Asam Stearat (bawah) Pada Berbagai Rasio Berat

Pengaruh Rasio Substrat terhadap Komposisi TAG

PMF didominasi oleh TAG POP (39,03%), diikuti oleh TAG POO (19,62%), PLP (9,04%) dan PLO (8,49%). Konsentrasi TAG POP pada PMF yang digunakan pada penelitian ini relatif lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi TAG POP pada sPMF yang dilaporkan oleh Braipson-Danthine et al. (2007), yaitu 51,75% dan 44,52% dan Calliauw et al. (2007), yaitu 48,90% dan 40,75%. Walaupun demikian, reaksi asidolisis enzimatis tetap dapat berlangsung yang ditunjukkan oleh adanya perubahan besar dalam komposisi TAG.

Perubahan-perubahan dalam komposisi TAG selama reaksi asidolisis enzimatis mengindikasikan terjadi pertukaran asil antara TAG dari PMF (sumber POP, POO) dengan TAG asam stearat dalam campuran reaksi selama reaksi asidolisis seperti halnya interesterifikasi yang dilakukan oleh Mojovic et al. (1993) terhadap substrat PMF dengan asam stearat

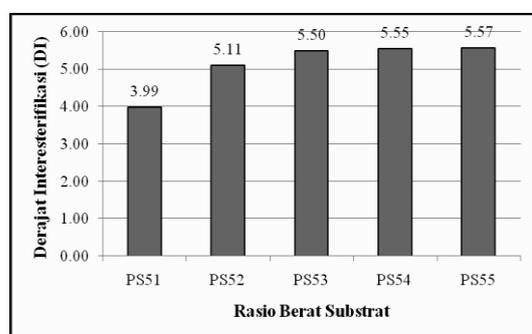
dalam heksana. Hasil ini juga sejalan dengan hasil penelitian Noor Lida & Ali (1998), yang melaporkan bahwa selama interesterifikasi, terjadi penurunan dan peningkatan konsentrasi beberapa jenis TAG serta terjadi sintesis beberapa jenis TAG baru.

Peningkatan konsentrasi TAG selama interesterifikasi dinyatakan oleh (Chen et al. 2007) sebagai derajat interesterifikasi (DI) yang didefinisikan sebagai total konsentrasi TAG (%area) yang meningkat konsentrasinya pada waktu reaksi tertentu, $[TAGI_t]$, terhadap total konsentrasi TAG (%area) yang meningkat tersebut pada awal reaksi, $[TAGI_0]$. Sedangkan $[TAGI_t]$ dan $[TAGI_0]$ dihitung relatif terhadap total konsentrasi TAG pada masing-masing campuran reaksi. Selanjutnya DI dapat dapat dihitung menggunakan formula berikut:

$$DI = \frac{[TAGI_t]}{[TAGI_0]}$$

Pada Gambar 3 dapat dilihat Derajat Interesterifikasi (DI) substrat PMF/Asam Stearat pada berbagai rasio berat. Pada prinsipnya, TAG yang dijadikan dasar perhitungan DI sama dengan TAG yang telah diuraikan sebelumnya untuk reaksi asidolisis.

Pada Gambar 3 terlihat pula bahwa DI menunjukkan nilai yang meningkat sampai rasio berat 5:4 dan selanjutnya menurun lagi. Tinggi rendahnya nilai DI konsisten untuk semua jenis substrat. Fenomena ini sangat dipengaruhi oleh proporsi TAG terhadap Asam Stearat dalam substrat yang menentukan besar kecilnya peluang TAG yang dihasilkan.



Keterangan: PS51, PS52, PS53, PS54, PS55 = Rasio berat substrat PMF/Asam Stearat masing-masing 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 dan 5:5.

Gambar 3. Derajat Interesterifikasi (DI) Hasil Asidolisis Enzimatis

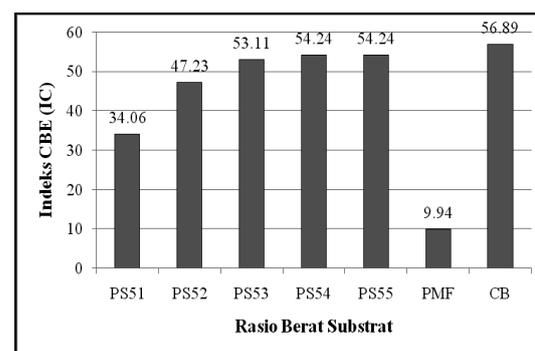
Sementara itu, Bloomer et al. (1990) mengukur aktivitas interesterifikasi berdasarkan reaksi etil stearat dan PMF yang dinyatakan sebagai inkorporasi stearat ke dalam TAG *monounsaturated* dari produk, yang dirumuskan dengan formula:

$$\Sigma = (\% \text{ POS} + 2 [\% \text{ SOS}]) / 2 (\% \text{ POP} + \% \text{ POS} + \% \text{ SOS}) \times 100$$

Selanjutnya formula tersebut dalam penelitian ini dinyatakan sebagai indeks CBE (IC) seperti yang dilakukan oleh Satiawihardja et al. (2001) untuk mengetahui kedekatan proporsi TAG POP, POS dan SOS hasil interesterifikasi maupun

hasil fraksinasi produk interesterifikasi (CBE) terhadap proporsi TAG utama CB tersebut. CB yang digunakan pada penelitian ini mempunyai indeks CBE 56.89 (POP = 15,40%, POS = 38,57%, SOS = 26,49%).

Pada Gambar 4 dapat dilihat indeks CBE (IC) substrat setelah asidolisis enzimatis pada berbagai rasio berat. Proses asidolisis enzimatis mengakibatkan terjadinya peningkatan nilai IC. Nilai IC meningkat dengan meningkatnya konsentrasi asam stearat sampai rasio berat 5:4 (PMF:asam stearat). Di atas rasio tersebut, nilai IC relatif konstan atau sedikit menurun. Walaupun demikian, nilai IC tidak dapat memberikan gambaran tentang komposisi TAG hasil asidolisis maupun profil pelelehannya, tetapi hanya kedekatannya dengan proporsi TAG utama CB (POP, POS, SOS).



Keterangan: PS51, PS52, PS53, PS54, PS55 = Rasio berat substrat PMF/Asam Stearat masing-masing 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 dan 5:5.

Gambar 4. Indeks CBE (IC) PMF, CB serta Hasil Asidolisis Enzimatis

Pengaruh Rasio Substrat terhadap Profil SFC dan SMP

SFC dapat mengidentifikasi persentasi bagian padat dalam lipida pada berbagai suhu, oleh karena itu SFC menjadi parameter penting untuk menganalisis sifat-sifat lemak padat seperti margarine dan shortening (Li et al., 2010). Hasil analisis SFC menunjukkan bahwa PMF mempunyai nilai SFC relatif tinggi pada suhu rendah dan terjadi penurunan yang

Tabel 3. Model untuk Memprediksi SFC Produk Asidolisis dari Konsentrasi Kelompok TAG secara Tunggal maupun Gabungan

TAG Tunggal	$SFC_{10} = 1,89 \text{ StStM} - 11,55 \text{ (R}^2 = 0,97; \sigma = 1,29)$
	$SFC_{20} = 65,22 - 9,79 \text{ MMM (R}^2 = 0,94; \sigma = 2,04)$
	$SFC_{25} = 2,12 \text{ StStM} - 32,16 \text{ (R}^2 = 0,94; \sigma = 2,12)$
	$SFC_{30} = 2,22 \text{ StStM} - 38,99 \text{ (R}^2 = 0,94; \sigma = 2,25)$
	$SFC_{35} = 2,36 \text{ StStM} - 49,97 \text{ (R}^2 = 0,93; \sigma = 2,55)$
	$SFC_{40} = 0,83 \text{ ALB} - 4,97 \text{ (R}^2 = 0,96; \sigma = 1,91)$
	$SFC_{10} = 15,69 + 1,30 \text{ StStM} - 3,05 \text{ MMM (R}^2 = 0,99; \sigma = 1,29)$
	$SFC_{20} = 51,77 - 7,25 \text{ MMM} + 0,23 \text{ ALB (R}^2 = 0,97; \sigma = 1,39)$
	$SFC_{25} = 11,42 + 1,18 \text{ StStM} - 4,88 \text{ MMM (R}^2 = 0,96; \sigma = 1,62)$
	$SFC_{30} = 1,79 \text{ StStM} + 1,53 \text{ StStD} - 36,73 \text{ (R}^2 = 0,97; \sigma = 1,59)$
	$SFC_{35} = 1,77 \text{ StStM} + 2,07 \text{ StStD} - 46,91 \text{ (R}^2 = 0,98; \sigma = 1,26)$
	$SFC_{40} = 0,56 \text{ ALB} + 0,87 \text{ StStM} - 25,83 \text{ (R}^2 = 0,99; \sigma = 1,07)$

cukup tajam sampai suhu 25°C, kemudian laju penurunan nilai SFC-nya relatif konstan sampai suhu sekitar 30–35°C.

Penelitian ini digunakan SFC sebagai pembanding, karena nilai SFC yang terlalu tinggi dalam campuran substrat akan mengganggu kristalisasi. Hal ini tentu saja akan berpengaruh terhadap hasil pengukuran SFC. Menurut Hashimoto et al. (2001), adanya triasilgliserol St3, diasilgliserol (DAG) dan asam lemak bebas (ALB) akan mengganggu kristalisasi PMF, sehingga harus dihilangkan.

Profil SFC produk asidolisis memberikan kisaran (*range*) pelelehan yang lebih melebar dibandingkan dengan bahan bakunya. Tinggi rendahnya nilai SFC dipengaruhi oleh proporsi antara bahan baku dengan asam stearat dalam campuran substrat awal. Semakin tinggi konsentrasi PMF dalam campuran substrat, maka nilai SFC produk asidolisis semakin rendah pada masing-masing suhu pengukuran.

Pada analisis SMP, lemak di dalam tabung kapiler akan mengalami *slip* (melesat) ketika kandungan lemak padatnya sekitar 4–5% (Noor Lida & Ali, 1998), sehingga dapat dianalogikan bahwa SMP

menunjukkan kondisi ketika minyak/lemak mempunyai nilai SFC sekitar 4–5%. Penurunan nilai SMP pada produk asidolisis enzimatis terutama disebabkan oleh perubahan komposisi TAG dalam produk asidolisis enzimatis, selain akibat berubahnya komposisi ALB dan DAG dalam campuran substrat tersebut.

Menurut Braipson-Danthine & Gibon (2007), ada hubungan yang jelas antara komposisi TAG, sifat pelelehan dan perilaku polimorfik dari minyak sawit dan fraksi-fraksinya. Meskipun demikian, nilai SMP ini masih jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan SMP CB (32–34°C). Hal ini diakibatkan komposisi TAG hasil asidolisis enzimatis masih sangat beragam jenis TAG-nya dibandingkan dengan komposisi TAG CB yang didominasi oleh TAG simetrik (*monounsaturated*), yaitu POP, POS dan SOS.

Selain itu, juga terlihat bahwa pada substrat dengan proporsi asam stearat tinggi, penurunan nilai SMP-nya relatif lebih kecil dibandingkan dengan substrat dengan proporsi asam stearat yang relatif lebih kecil. Hal ini mengindikasikan bahwa nilai SMP pada produk asidolisis sangat ditentukan oleh proporsi ALB dalam campuran substrat.

Hubungan Komposisi TAG dan SFC

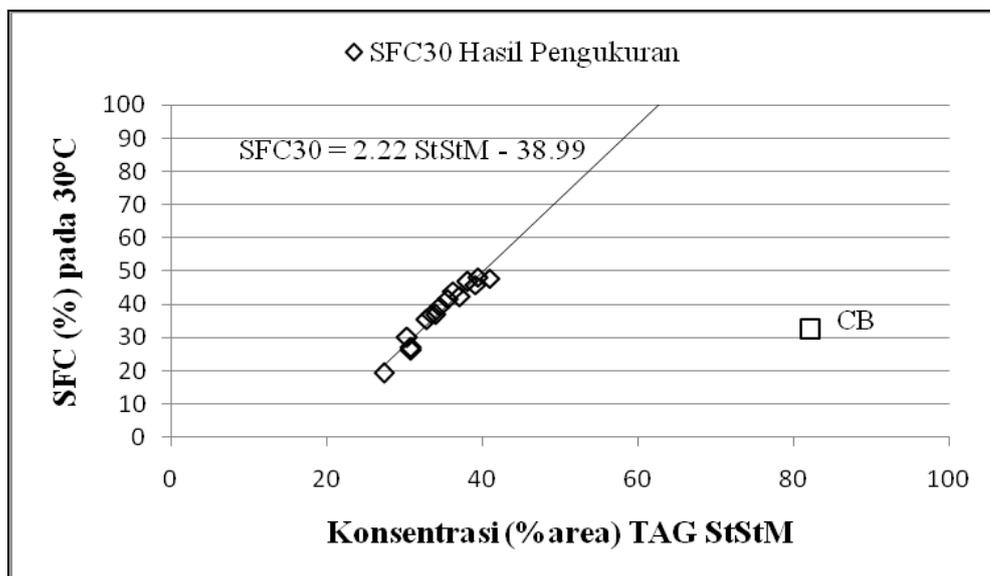
Menurut Neff et al. (1999), pengelompokan TAG dengan lambang St, M, D, dan T lebih mencerminkan korelasi komposisi TAG dengan titik leleh, *solid fat index* dan kemungkinan peningkatan stabilitas oksidatif. Oleh karena itu, pada penelitian ini dibuat model berdasarkan pendugaan melalui regresi linear berganda dengan pendekatan regresi bertahap (*stepwise regression*) dari hubungan matematik antara SFC dengan konsentrasi (%area) kelompok TAG. Pada Tabel 3 dapat dilihat model untuk memprediksi SFC produk asidolisis pada berbagai suhu pengukuran dari konsentrasi (%area) kelompok TAG secara tunggal maupun gabungan. Data yang dianalisis merupakan data gabungan dari produk asidolisis semua jenis substrat pada berbagai rasio berat.

Solid Fat Content pada 10°C (SFC10), SFC25, SFC30, SFC35 dapat diprediksi secara akurat dari konsentrasi (%area) kelompok TAG yang sama, yaitu StStM (POP, POS, SOS) secara tunggal. Sedangkan SFC20 dapat diprediksi dari TAG MMM (OOO), dan SFC40 dari ALB. Sementara itu, gabungan dari TAG

StMM dan MMM dapat digunakan untuk memprediksi SFC10 dan SFC25, sedangkan TAG StStM dan StStD (PLP, SLP) untuk memprediksi SFC30 dan SFC35. Sementara itu SFC10 dapat diprediksi dari TAG MMM dan ALB, sedangkan SFC40 dapat diprediksi dari TAG StStM dan ALB.

R^2 dapat digunakan untuk membandingkan dua regresi berganda dengan variabel terikat (Y) yang sama, tetapi banyaknya variabel bebas (X) berbeda. Semakin besar nilai R^2 (mendekati 1), maka semakin baik model tersebut memprediksi. Pada Tabel 3 terlihat bahwa TAG secara tunggal maupun gabungan mempunyai nilai R^2 yang hampir sama, sehingga ketepatan prediksinya juga hampir sama. Oleh karena itu, prediksi SFC produk asidolisis dari kelompok TAG secara tunggal sudah cukup untuk memberikan prediksi yang akurat dan model yang lebih sederhana tentu saja lebih disukai.

Sebagai ilustrasi, pada Gambar 5 dapat dilihat SFC hasil pengukuran produk asidolisis pada 30°C menggunakan NMR *Analyzer* dengan SFC pada suhu tersebut sebagai hasil prediksi SFC ber-



Gambar 5. Prediksi SFC Hasil Asidolisis pada 30°C dari Kelompok TAG StStM

dasarkan kelompok TAG secara tunggal (TAG StMM) sesuai dengan model pada Tabel 3. Pada Gambar 5 tersebut terlihat bahwa hasil prediksi dari TAG StStM (POP, POS, SOS) tidak berbeda jauh dari SFC hasil pengukuran ($R^2 = 0,94$). Sebagai pembanding konsentrasi TAG StStM pada CB dengan SFC pada suhu pengukuran 30°C. SFC pada 30°C penting untuk menunjukkan kompatibilitas terhadap CB.

SIMPULAN DAN SARAN

Asidolisis enzimatis substrat menghasilkan terbentuknya campuran kompleks asilgliserol dan asam lemak bebas. Selama asidolisis enzimatis, pertukaran asil terjadi terutama antara grup palmitoil dari PMF dengan stearoil dari asam stearat. Konsentrasi beberapa TAG meningkat, beberapa TAG menurun dan beberapa TAG baru terbentuk.

Sintesis TAG khas CB (POS,SOS) yang dinyatakan sebagai indeks CBE (IC) meningkat seiring meningkatnya proporsi asam stearat sampai rasio berat 5:4 (fraksi minyak sawit:asam stearat) dalam campuran substrat, tetapi tidak selalu seiring dengan derajat intersterifikasi (DI). Perubahan komposisi TAG dalam produk asidolisis enzimatis tercermin dalam profil SFC dan menentukan nilai SMP.

Hubungan antara komposisi TAG (kelompok TAG) dan nilai SFC pada masing-masing suhu pengukuran dapat dinyatakan dalam model regresi linear berganda. Nilai SFC pada berbagai suhu pengukuran secara akurat dapat diprediksi dari proporsi kelompok TAG MMM (OOO), StStM (POP, POS, SOS) dan StStD (PLP, SLP, SLS), secara tunggal ataupun gabungan.

Disarankan untuk mengukur *progress* (kemajuan) reaksi dalam sintesis CBE, perlu dirumuskan indeks baru yang dapat menggambarkan sifat fisik dan kimia maupun tingkat kualitas terhadap CB dari

suatu produk lemak. Indeks CBE yang digunakan saat ini tidak menggambarkan sifat-sifat tersebut karena hanya mempertimbangkan proporsi TAG utama CB (POP, POS, SOS), tidak mempertimbangkan komposisi TAG secara keseluruhan maupun sifat pelelehan dari produk lemak.

DAFTAR RUJUKAN

- Akoh, C.C. & Min, D.B. (Eds.). 2002. *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- American Oil Chemists' Society (AOCS). 2005. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. Illinois: Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. 1990. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67(8): 519-524.
- Braipson-Danthine S. & Gibon, V. 2007. Comparative analysis of triacylglycerol composition, melting properties and polymorphic behavior of palm oil and fractions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 359-372.
- Calliau, G., Gibon, V., Greyt, W.D., Plees, L., Foubert, I., & Dewettinck, K. 2007. Phase composition during palm olein fractionation and its effect on soft PMF and superolein quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84:885-891.
- Chaibakhsh, N., Rahman, M.B.A., Abd-Azis, S., Basri, M., Salleh, A.B., & Rahman, R.N.Z.R.A. 2009. Optimized lipase-catalyzed synthesis of adipate ester in a solvent-free system. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 36: 1149-1155.
- Chong, C.N., Hoh, Y.M., & Wang, C.W. 1992. Fractionation procedures for obtaining cocoa butter-like fat from

- enzymatically interesterified palm olein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69(2): 137–140.
- Ciftci, O.N., Fadiloglu, S., & Gogus, F. 2009. Utilization of olive-pomace oil for enzymatic production of cocoa butter-like fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86: 119–125.
- Hashimoto, S., Nezu, T., Arakawa, H., Ito, T., Maruzeni, S. 2001. Preparation of sharp-melting hard palmidfraction and its use as hard butter in chocolate. *J Am Oil Chem Soc* 78(5):455–460.
- Idris, N.A & Dian, N.L.H.M. 2005. Interesterified palm products as alternatives to hydrogenation. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 14(4): 396–401.
- Li, D., Adhikari P., Shin, J.A., Lee, J.H., Kim, Y.J., Zhu, X.M., Hu, J.N., Jin, J., Akoh, C.C., & Lee, K.T. 2010. Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats. *LWT–Food Science and Technology* 43:458–464.
- Lipp, M., Simoneau, C., Ulberth, F., Anklam, E., Crews, C., Brereton, P., Greyt, W. de, Schwack, W., & Wiedmaiers, C. 2001. Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. *Journal of Food Compo-sition and Analysis* 14: 399–408.
- Mojovic, L., Marinkovic, S.S., Kukic, G., & Novakovic, G.V. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent Fat. *Enzyme Microb Technol* 15: 438–443.
- Neff, W.E., List, G.R., & Byrdwell, W.C. 1999. Effect of triacylglycerol composition on functionality of margarine basestocks. *Lebensm-Wiss u-Technol* 32: 416–424.
- Noor Lida, H.M.D & Ali A., R.Md. 1998. Physicochemical characteristics of palm-based oil blends for the production of reduced fat spreads. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1625–1631.
- Satiawihardja, B., Hariyadi, P., & Budi-yanto, S. 2001. *Studi Pembuatan Mentega Cokelat Tiruan dari Minyak Sawit dengan Proses Interesterifikasi Enzimatik*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/1–3 Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 1998/2001 tidak diterbitkan. Bogor: Fateta, IPB.
- Silva, R.C., Cotting, L.N., Poltronieri, T.P., Balcao, V.M., de Almeida, D.B., Goncalves, L.A.G., Grimaldi, R., & Gioielli, L.A. 2009. The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil. *LWT–Food Science and Technology* 42:1275–1282.
- Osborn, H.T. & Akoh, C.C. 2002. Structured lipids–novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 110–120.
- Torbica, A., Jovanovic, O., & Pajin, B. 2006. The advantages of solid fat content determination in cocoa butter and cocoa butter equivalents by the Karlshamns method. *Eu. Food Res. Technol.* 222: 385–391.
- Widlak, N. (Ed.). 1999. *Physical Properties of Fats, Oils and Emulsi-fiers*. Illinois: Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign.
- Willis, W.M. & Marangoni, A.G. 2002. Enzymatic Interesterification. Di dalam: Akoh CC, Min DB, editor. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Ed ke-2. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Zaidul, I.S.M., Nik Norulaini, N.A., Mohd. Omar, A.K., & Smith Jr. R.L. 2007. Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extracted

- palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers. *Journal of Food Engineering* 78: 1397–1409.
- Zhang, H., Xu, X., Nilsson, J., Mu, H., Adler-Nissen, J., & Hoy, C.E. 2001. Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated *Thermomyces lanuginosa* lipase in a large-scale study. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(1): 57–64.

