

## Efektivitas Penambahan Antioksidan L-Ascorbyl Palmitate Hasil Sintesis Secara Enzimatis pada Minyak Kelapa

### *Effectiveness of Added L-Ascorbyl Palmitate Antioxidant Synthesized Enzymatically in Coconut Oil*

Tri Agus Siswoyo<sup>1)</sup> dan Martiyas Pujirahayu<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember,

<sup>2)</sup>Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya

#### ABSTRACT

L-ascorbyl palmitate (AsA-Pal-Enz) was synthesized by using the immobilized lipase from *Aspergillus niger*. The antioxidative activity of AsA-Pal-Enz was investigated in coconut oil at different temperatures within a range of 30(RT)-120°C. The effectiveness of AsA-Pal-Enz in coconut oil was monitored by the rate of formation of hydroperoxides, conjugated dienes ( $K_{232}$ ) and decomposition of hydroperoxides ( $K_{270}$ ). Samples in storage experiments were periodically removed and analyzed for peroxide value,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  and radical scavenging activity (DPPH<sub>r</sub>). Application of AsA-Pal-Enz have markedly reduced the rate of peroxidation in coconut oil during incubation time at RT, 60 and 80°C but at 120°C the rate of peroxidation slightly increased. It has shown that the effectiveness of AsA-Pal-Enz antioxidant in coconut oil was strongly depend on temperature and the time of incubation.

Keywords : Antioxidant, L-Ascorbyl Palmitate, coconut oil, oxidation

#### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara produsen kelapa yang potensial. Luas pertanaman pada tahun 1997 sebesar 2.270.215 Ha dengan total produksi mencapai 1.594.879 ton kopra. Daging buah kelapa merupakan bagian yang paling banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan, utamanya digunakan sebagai sumber lemak yaitu diolah menjadi minyak kelapa. Minyak kelapa kaya akan kandungan asam lemak tak jenuh dengan rantai sedang dan medium. Hampir 70% kandungan minyaknya terdiri dari rantai sedang dengan kandungan asam laurat yang tertinggi sekitar 52%. Kandungan asam lemak tak jenuh sekitar 12% dengan kandungan asam oleat tertinggi sekitar 5%. Kandungan asam lemak tak jenuh ini sangat berpotensi mengalami ketengikan akibat dari oksidasi.

Oksidasi minyak merupakan reaksi utama terjadinya kerusakan pada beberapa jenis pangan yang mengandung minyak. Proses ini dapat mengakibatkan penurunan kualitas dengan menimbulkan perubahan seperti bau, rasa dan warna. Ketengikan pada minyak juga disebabkan oleh reaksi oksidasi lipid melalui sederetan mekanisme reaksi. Yang pertama pembentuk awal radikal bebas (inisiasi),

lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir (terminasi) yaitu pemusnahan atau perubahan menjadi radikal bebas stabil dan tak reaktif.

Ascorbic acid (AsA) diketahui mempunyai potensi sebagai antioksidan atau sebagai agen sinergistik antioksidan pada beberapa model dan makanan yang mengandung lipid (Yin *et al.* 1993). Ascorbic acid dapat juga mengakibatkan terpacunya oksidasi (pro-oksidan) pada minyak. Nampaknya ion besi merupakan hal utama yang mengakibatkan AsA sebagai pro-oksidan (Yin *et al.* 1993, Harel & Kanner 1985). Vitamin C-ester adalah bentuk derivat dari vitamin C (L-ascorbic acid) yang larut dalam minyak. Bentuk senyawa ini menawarkan bentuk baru dari antioksidan yang menepati bagian terpenting dari *ingredient* pada pangan dan kosmetik. Pada awalnya lipophilik vitamin C-ester diindikasikan efektif dalam mencegah peroksidasi pada lipoprotein (Liu *et al.* 1992, Liu *et al.* 1996), lebih lanjut penggunaan senyawa tersebut mulai berkembang, diantaranya sebagai agensia untuk mencegah terjadinya oksidasi pada minyak, *shortening-sparing*, pelunak pada roti (Koch *et al.* 2006) dan mencegah kerusakan pada kulit akibat radiasi sinar violet (Jurkovic *et al.* 2003).

Sintesis AsA-ester secara kimia telah banyak dilakukan terutama di negara-negara berkembang, akan tetapi metode yang digunakan mempunyai beberapa kelemahan diantaranya adalah instabilitas AsA yang dapat mengakibatkan produksi menjadi rendah dan adanya residu pelarut yang terikat pada produk (Chen *et al.* 1994). Residu yang terikat pada produk tersebut dibidang pangan dan kosmetik sangat tidak direkomendasikan untuk digunakan, dikarenakan akan dapat menimbulkan efek samping pada pengguna (Humeau 1995). Sejak ditemukan lipase sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi atau trans-esterifikasi lipid membuka suatu wacana baru dalam memproduksi AsA-ester secara enzimatik dan mengaplikasikannya. Oleh sebab itu maka penelitian ini bertujuan untuk menguji efektifitas penambahan L-Ascorbyl palmitate hasil sintesa secara enzimatik (AsA-Pal-Enz) pada minyak kelapa.

## METODE

### Isolasi minyak kelapa

Ekstraksi minyak kelapa dilakukan dengan metode basah (wet method), satu butir buah kelapa tua setelah dibersihkan digiling menggunakan laboratorium milling sampai halus (fine). Bubuk yang diperoleh diekstrak dengan mencampur dengan hot butanol: water (3:1) panas selama 3 jam pada kondisi 60°C. Ekstraksi ini diulang sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi berupa larutan filtrat dikumpulkan dan dikonsentrasikan dengan menggunakan *rotary evaporator* dalam kondisi tereduksi. Hasil yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C sampai analisa selanjutnya.

### Purifikasi minyak kelapa

Pemurnian minyak kelapa dilakukan berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Lampi *et al.*, (1992) yang dimodifikasi oleh Subagio and Morita (2001). Seratus gram minyak yang dilarutkan pada n-hexane dimasukkan pada kolom kromatografi lapis (2,6 cm i.d x 70 cm) dengan komposisi terdiri dari 25 gr silica gel, 10 gr celite 545 : karbon aktif (1:2), 40 gr celite 545: powdered sugar (1:2) dan 15 gr silica gel aktif. Sampel dielusi secara pasif dengan bantuan pompa vakum. Larutan sampel yang diperoleh, dikumpulkan dan dikonsentrasikan dengan cara menghilangkan larutan n-heksane menggunakan *rotary evaporator* pada kondisi tereduksi. Masing-masing minyak kelapa yang telah dimurnikan disimpan pada suhu -80°C sampai analisa selanjutnya.

### Perlakuan.

Dua puluh gram minyak kelapa hasil pemurnian masing-masing sampel dibagi menjadi dua bagian,

bagian 1 minyak yang ditambah dengan AsA-Pal-Enz dan bagian lain sebagai control tanpa AsA-Pal-Enz dengan tiga kali ulangan. Masing-masing bagian minyak kelapa tersebut kemudian disimpan/diinkubasi selama waktu tertentu (0-50 jam) pada suhu yang bervariasi 30(RT)-120°C dengan interval waktu pengamatan yang telah ditentukan.

### Spektrofotometri uv-vis.

Cuplikan minyak 0,25 gr dimasukkan dalam erlenmeyer, dicampur dengan iso-oktan sampai homogen. Penentuan nilai ekstensi koefisien  $K_{232}$  dan  $K_{270}$  berdasarkan oleh nilai absorbansi pada  $\lambda_{232}$  dan 270 nm seperti yang dijelaskan pada metode European Regulation EEC 2568/91.

### Iodine value.

Berdasarkan metode yang dijelaskan di AOCS method Cd 1-25.

### Index warna

Penentuan perbedaan warna minyak berdasarkan index L, a dan b dengan menggunakan alat *coloureader* dimana L\* adalah nilai dari kecerahan (*whiteness* atau *brightness/darkness*), a\* nilai dari kemerahan (+) atau kehijauan (-) dan b\* nilai kekuningan (+) atau kebiruan (-).

### Penentuan bilangan peroksida (PV)

Sampel minyak kelapa yang telah dimurnikan ditimbang sebanyak  $\pm 0,001$  gr dan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambah dengan 15 ml asam asetat dan 1 ml potassium iodida, dikocok selama beberapa menit dan dijauhkan dari cahaya pada suhu 15 – 25°C. larutan kemudian ditambah dengan 75 ml air destilasi. Iod yang dibebaskan dititrasi dengan larutan sodium thiosulfat (0,01N), dikocok dengan kuat. Sebagai indikator digunakan larutan pati. Pengukuran dilakukan masing - masing sebanyak 3 kali untuk sampel yang sama. Titrasi dilakukan juga pada larutan blanko. Dimana PV merupakan nilai milli equivalen oksigen aktif per kg sampel (meq O<sub>2</sub>/kg).

### Pengukuran potensi aktivitas radical scavenging

Potensi aktivitas *radical scavenging* sampel diukur menggunakan metode *DPPH Radical-Scavenging* berdasarkan jumlah donor hidrogen atau kemampuan *radical scavenging* dari radikal berupa DPPH yang stabil (Yamaguchi *et al.* 1998, Gadow *et al.* 1997). 500  $\mu$ M DPPH dalam ethanol disiapkan sebagai larutan stock. 0.6 ml larutan DPPH dan 2.4 ml ethanol dicampur kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 0.1 ml larutan methanolik sampel. Setelah dibiarkan pada suhu ruang selama 30 min, penurunan absorbansi yang diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan Shimadzu spectrophotometer UV-160A (Kyoto Japan). Absorbansi larutan DPPH radikal tanpa sampel diukur untuk digunakan sebagai kontrol.

Perhitungan sisa DPPH<sub>r</sub> dilakukan berdasarkan persamaan:

$$\% \text{ DPPH}_r = (\text{DPPH}_r / \text{DPPH}_0) \times 100\%$$

keterangan: konsentrasi DPPH<sub>r</sub> diperoleh berdasarkan persamaan linear  $\text{DPPH}_r = (3.4 \times 10^{-4})A_{517} + (7.5 \times 10^{-7})$  dan DPPH<sub>0</sub>, awal konsentrasi DPPH pada awal reaksi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan nilai beberapa parameter fisik maupun kimia minyak kelapa sebelum dan sesudah pemurnian dengan metode kolom berlapis dapat dilihat pada Tabel 1.

Penurunan nilai karakter kimia seperti pada bilangan peroksida (PV), bilangan asam, K<sub>232</sub> dan K<sub>270</sub> menunjukkan efektivitas dari kolom berlapis untuk dapat memisahkan beberapa senyawa yang tidak dikehendaki. Menurut Carelli *et al.* (2005), pemurnian minyak menggunakan kolom berlapis dapat mengurangi senyawa endogenous yang dapat menghambat terjadinya oksidasi (antioksidan) atau mempercepat terjadinya oksidasi (pro-oksidan). Beberapa peneliti juga menyatakan bahwa pemurnian ini dapat menurunkan senyawa produk utama oksidasi berupa asam lemak hydroperoxides (PV dan K<sub>232</sub>) dan senyawa samping berupa asam lemak hydroperoxides dekomposisi (K<sub>270</sub>) (Gomes-Alonso *et al.* 2004a,b). Berdasarkan standart

kualitas minyak kelapa menunjukkan bahwa dengan tahap pemurnian dapat juga meningkatkan kualitas minyak dengan menurunkan bilangan peroksida dibawah 1 dari 1.32 menjadi 0.78 meqO<sub>2</sub>/kg.

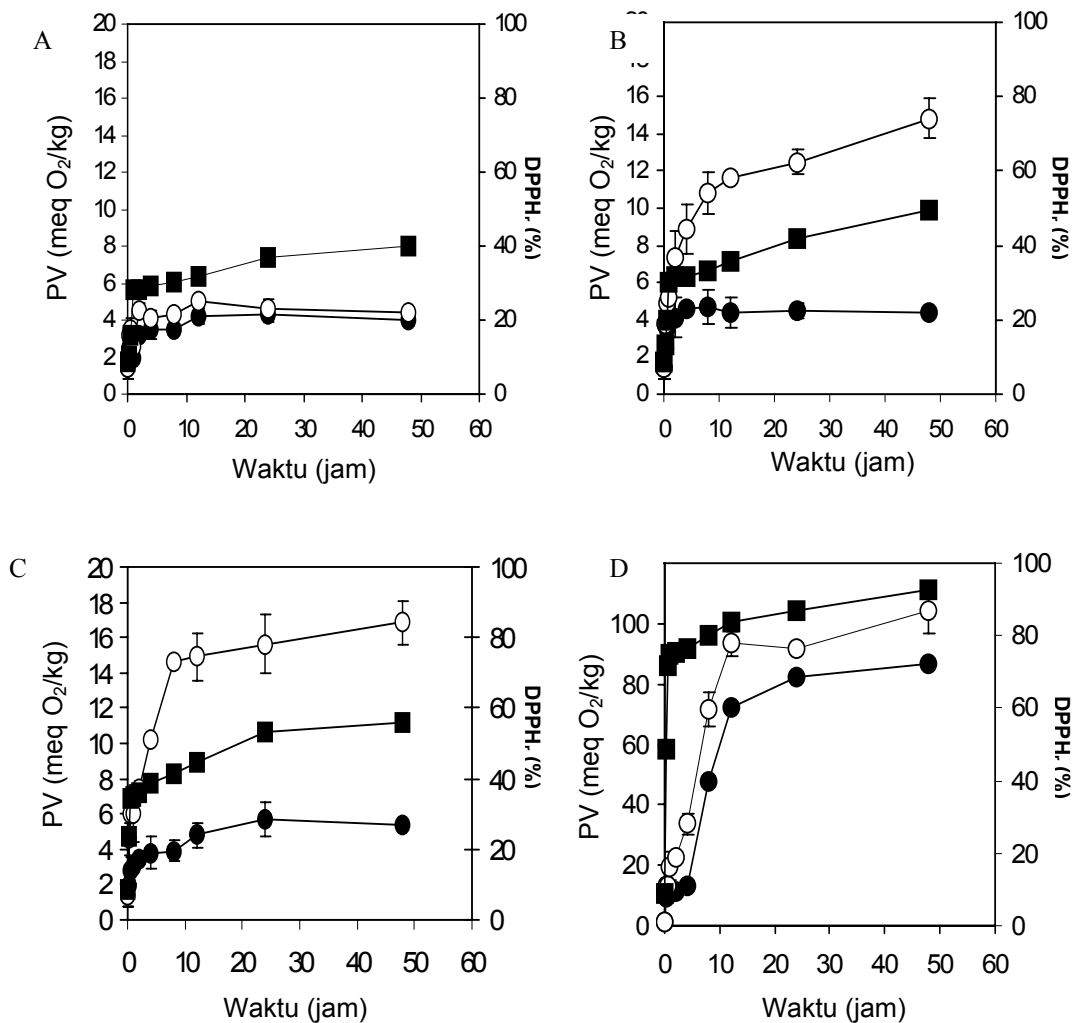
Pemurnian juga menghasilkan indeks warna seperti L\* mengalami peningkatan dari 71,89 menjadi 99.93 akan tetapi nilai a\* dan b\* mengalami penurunan berturut-turut -3.8 menjadi -7.6 dan 15.8 menjadi 5.1. Teknik pemurnian ini juga dilakukan oleh beberapa peneliti pada minyak corn (Subagio & Morita, 2001), olive (Gomes-Alonso *et al.* 2004a,b), sunflower (Carelli *et al.* 2005) dan canola (Onal & Ergin 2002) dengan tujuan untuk mempelajari pengaruh efektivitas penambahan antioksidan baik alami atau sintesis pada sistem minyak.

Minyak kelapa yang sudah dimurnikan digunakan sebagai bahan untuk menguji efektivitas L-Ascorbyl palmitate hasil sintesa secara enzimatik (AsA-Pal-Enz). Pengaruh penambahan antioksidan AsA-Pal-Enz pada minyak kelapa terhadap nilai PV pada suhu yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 1. Dari data menunjukkan bahwa nilai PV mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan waktu inkubasi. Pada suhu ruang (RT) (Gambar 1A) menunjukkan bahwa selama 50 jam penyimpanan peningkatan nilai PV pada kontrol dan perlakuan hampir dapat dikatakan tidak ada perbedaan dengan nilai

Tabel 1. Perbandingan karakter minyak kelapa sebelum dan sesudah pemurnian.

Karakteristik Minyak	Sebelum**	Sesudah**
Bilangan Peroksida/PV (meq O <sub>2</sub> /kg)	1,32 ± 0,03	0,78 ± 0,00
Bilangan Asam (% FFA)	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Ektinsi koefisien (K <sub>232</sub> )	1,31 ± 0,08	0,89 ± 0,01
Ektinsi koefisien (K <sub>270</sub> )	0,21 ± 0,03	0,013 ± 0,01
Indek Warna		
L*	71,87 ± 0.13	99,93 ± 0.08
a*	-3.8 ± 0.04	-7.6 ± 0.00
b*	15.8 ± 0.13	5.1 ± 0.00

Keterangan: \*\*Data merupakan hasil dari rata-rata (SD dari tiga kali pengulangan. L\*, kecerahan ;a\*, kemerahan(+) atau kehijauan(-) dan b\*, Kekuningan (+) atau kebiruan (-).



Gambar 1. Pengaruh penambahan ascorbyl palmitate hasil sintesa secara enzimatik terhadap tingkat bilangan oksidasi (PV) minyak kelapa pada suhu yang bervariasi. A. Suhu ruang (RT); B. 60°C; C. 80°C dan D. 120°C. ○, kontrol; ●, penambahan AsA-Pal-Enz; ■, DPPH<sub>r</sub>.

bilangan oksidasi sebesar 4 meq O<sub>2</sub>/kg. Pada Gambar 1B dan C dengan suhu 60 dan 80°C untuk kontrol nilai PV mengalami peningkatan yang cukup berarti mulai 0.25 sampai 16 meq O<sub>2</sub>/kg dengan lama inkubasi 50 jam, sedangkan untuk minyak kelapa yang ditambahkan AsA-Pal-Enz tidak mengalami peningkatan yang berarti dengan nilai PV sekitar 4.42 (60°C) dan 5.42 (80°C) meq O<sub>2</sub>/kg. Hal ini berbeda dengan perlakuan suhu 120°C pada awal inkubasi sudah menunjukkan bilangan oksidasi yang meningkat sampai pada nilai 74 meq O<sub>2</sub>/kg setelah itu mengalami peningkatan secara maksimal sampai pada nilai 104 meq/kg

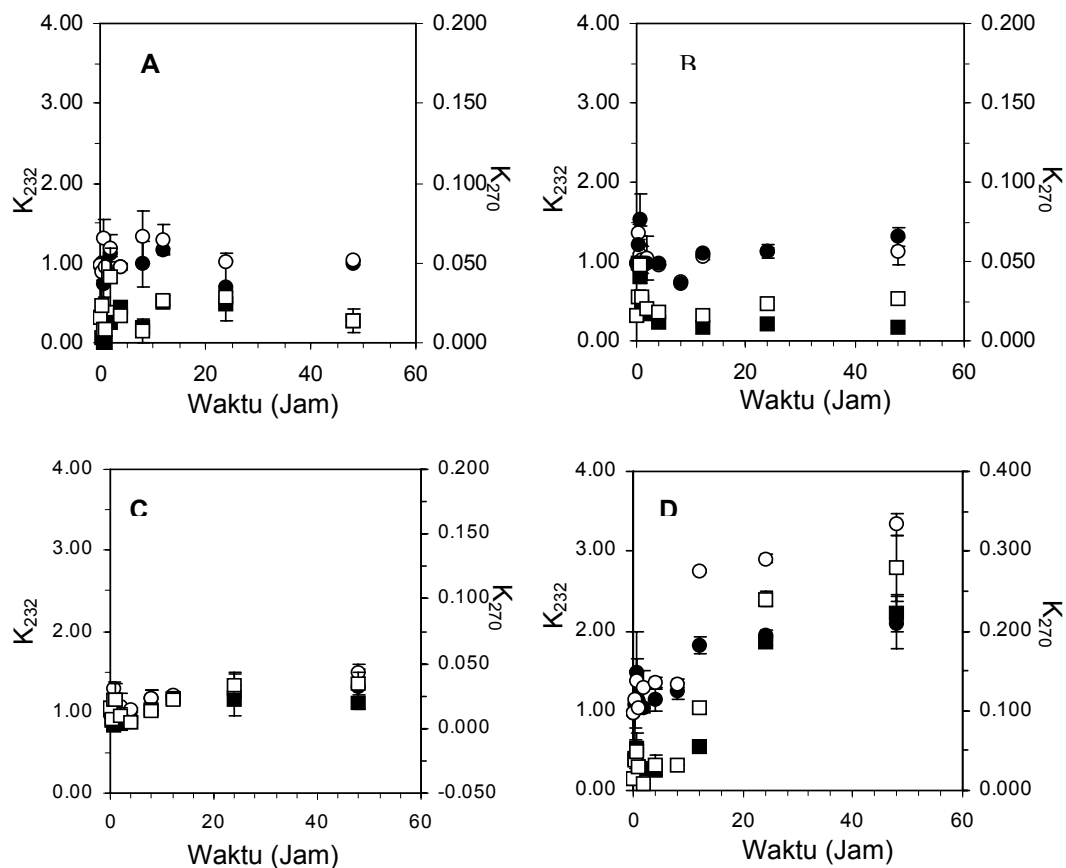
dengan waktu inkubasi 48 jam. Sedangkan untuk sampel yang ditambahkan AsA-Pal-Enz peningkatan bilangan oksidasi terjadi lebih rendah dibandingkan dengan kontrol dengan nilai bilangan oksidasi tertinggi sekitar 86 meq O<sub>2</sub>/kg. Rendahnya perubahan nilai PV pada suhu ruang (RT), 60 dan 80°C menunjukkan bahwa penambahan Asa-Pal-Enz mampu menahan terjadinya oksidasi. Hal ini ditunjukkan dengan nilai DPPH<sub>r</sub> yang relative stabil pada suhu RT, 60 dan 80°C selama inkubasi, berbeda dengan nilai DPPH<sub>r</sub> pada suhu 120°C dimana nilai tersebut melonjak dengan cepat pada awal inkubasi hampir 100%

dengan nilai PV juga tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa stabilitas Asa-Pal-Enz sebagai antioksidan mengalami degradasi atau penurunan fungsi sehingga tidak mampu untuk menahan terjadinya oksidasi pada minyak kelapa selama inkubasi. Pada suhu yang tinggi kemungkinan AsA-Pal mengalami degradasi struktur atau deformasi struktur yang mempengaruhi fungsinya sebagai pengstabil radikal bebas.

Hasil absorbansi pengaruh dari penambahan AsA-Pal-Enz pada suhu yang variasi ditunjukkan dengan nilai  $K_{232}$  dan  $K_{270}$  dapat dilihat pada Gambar 2. Diene konjugat peroksidasi (asam lemak hydroperoxides) merupakan produk utama oksidasi ditunjukkan pada nilai absorbansi maksimal antara 230-232 nm, sedangkan konjugated ketodienes, dienal dan trienes (hydroperoxides dekomposisi)

ditunjukkan pada nilai absorbansi maksimal antara 268-270 nm. Proses oksidasi lipid dapat diindikasikan terjadinya peningkatan kemampuan absorpsi terhadap sinar violet. Sehingga dalam pengukuran oksidasi dapat digunakan panjang gelombang 232 dan 270 nm.

Dalam penelitian ini minyak kelapa yang ditambahkan AsA-Pal-Enz menunjukkan sedikit perbedaan terhadap tingkat oksidasi dibandingkan dengan kontrol pada 3 perlakuan suhu (Gambar 2A,B,C). Menurut Che Man & Tan (1999) bahwa terjadi suatu persamaan antara laju pembentukan diene dengan laju perubahan betuk polimernya. Pada Gambar 2D menunjukkan laju perubahan nilai  $K_{232}$  dan  $K_{270}$  selama masa inkubasi pada suhu  $120^{\circ}\text{C}$  sangat signifikan antara kontrol dan minyak kelapa yang ditambahkan AsA-Pal-Enz.



Gambar 2. Pengaruh penambahan ascorbyl palmitat hasil sintesa secara enzimatik terhadap nilai  $K_{232}$  dan  $K_{270}$  minyak kelapa pada suhu yang bervariasi. A. Suhu ruang (RT); B.  $60^{\circ}\text{C}$ ; C.  $80^{\circ}\text{C}$  dan D.  $120^{\circ}\text{C}$ .  $\circ$ , kontrol;  $\bullet$ , penambahan AsA-Pal-Enz;  $\square$ , kontrol ( $K_{270}$ );  $\blacksquare$ , penambahan AsA-Pal-Enz ( $K_{270}$ ).

Sedangkan untuk suhu ruang (RT), 60 dan 80°C tidak menunjukkan perubahan yang cukup berarti. Hal ini menunjukkan sifat stabilitas dari AsA-Pal-Enz pada perlakuan suhu tersebut sesuai yang dilaporkan oleh Onal & Ergin (1991).

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan antioksidan L-ascorbyl palmitate hasil sintesa secara enzimatik pada minyak kelapa dapat memperbaiki stabilitas oksidasi minyak kelapa. Lama inkubasi dan suhu pemanasan berpengaruh terhadap efektivitas penambahan antioksidan L-ascorbyl palmitate pada minyak kelapa.

### Ucapan terima kasih

Penelitian ini dibiayai dari dana hibah bersaing XII (DIKTI/DP2M) untuk disampaikan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- AOCS. 1997. *Sampling and analysis of commercial fats and oils*, American Oil Chemists Society Official Methods (CD 1-25) Press. Champaign. Illinois. USA.
- Commission Regulation (EEC) No. 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis.
- Che Man YB & Tan CP. 1999. Effects of natural and synthetic antioxidants on changes in refined, bleached, and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. *JAOCs*. **76**:331-339.
- Chen ST, Chen SY, Chen SJ, Wang KT. 1994. Vinyl Carboxylate, an acylating reagent for selective acylation of amines and diols. *Tetrahedron Lett.*, **35**:3583-3584.
- Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric.Food Chem.*, **45**:632-638.
- Gomez-Alonzo S, Salvador MD, Fregapane G. 2004a. Evolution of the oxidation process in olive oil triacylglycerol under accelerated storage condition (40-60°C). *JAOCs*. **81**: 177-184.
- Gomez-Alonzo S, Mancebo-Campos V, Salvador MD, Fregapane G. 2004b. Oxidation kinetics in olive oil triacylglycerols under accelerated shelf-life testing (25-75°C). *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, **106**: 369-375.
- Harel K & Kanner J. 1985. Muscle membranal lipid peroxidation initiated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- activated metmyoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **33**: 1188-1192.
- Humeau C, Girardin M, Rovel B, Miclo A. 1998. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *J. Mol Catal B. B: Enzymatic* . **5**:19-23.
- Jurkovic P, Sentjurc M, Gasperlin M, Kristl J, Pecar S. 2003. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. **56**: 59-66.
- Koch RL, Paul AS, Hoseney FTC. 2006. Incorporating L-Ascorbyl 6-Palmitate in bread and its shortening-sparing and anti-firming effects. *Journal of Food Science*. **52**: 954-957
- Lampi AM, Hopia A, Ekholm P, Piironen V. 1992. Method for the preparation of triacylglycerol fractions from rapeseed and other oil for autoxidation studies. *Food Science and Technology*. **25**: 386-388.
- Liu GT, Zhang TM, Wang BE, Wang YW. 1992. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 147-152.
- Liu ZQ, Ma LP, Liu ZL. 1996. Making vitamin C lipophilic enhances its protective effect against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids*. **95**:49-57.
- Onal B & Ergin G. 2002. Antioxidative effects of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate on thermal oxidation of canola oil. *Nahrung/Food*. **6**:420-426.
- Siswoyo TA, Ardyati T, Miswar. 2006. Optimalisasi Sintesa Vitamin C-ester Secara Enzimatik Menggunakan Immobilisasi Lipase dari *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*. **7**: 6-12.
- Subagio A & Morita N. 2001. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food Res. Int.*, **34**: 183-188.
- Yin MC, Faustman C, Riesen JW, Williams SN. 1993.  $\alpha$ -Tocopherol and ascorbate delay oxymyoglobin and phospholipid oxidation in vitro. *J. Food Sci*. **58**: 1273-1276, 1281.
- Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **62**: 1201-1204.

