

Pengaruh Kandungan Komponen Minor dari Minyak Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Terhadap Aktivitas Antioksidan pada Proses Pemurnian Karotenoid

Ahmad Gazali Sofwan Sinaga¹, Donald Siahaan¹

¹Pengolahan Hasil dan Mutu, Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Email: gazalisofwan@gmail.com

Abstrak

Minyak kelapa sawit mengandung beberapa komponen minor yang memiliki aktivitas antioksidan, seperti karotenoid dan vitamin E. Pada proses pemurnian adanya paparan panas dan bahan kimia yang terlalu banyak dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas antioksidan dari karotenoid dan vitamin E yang diperoleh dari setiap tahap pada proses pemurnian berkelanjutan (transesterifikasi, solvolitik miselisasi dan saponifikasi). Kadar total karotenoid ditentukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-visibel pada λ 446 nm dan total vitamin E dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi, sedangkan analisis kandungan ester dan trigliserida dianalisis dengan kromatografi gas. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH dengan masa inkubasi selama 60 menit. Hasil aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa karotenoid dan vitamin E pada proses transesterifikasi lebih kuat dibandingkan proses solvolitik miselisasi dan saponifikasi dengan nilai IC_{50} secara berurutan 5,61; 11,20; dan 11,63 mcg/ml. Hasil ekstraksi karotenoid sangat tinggi diperoleh pada proses saponifikasi sekitar 229.968 mcg/ml, sedangkan kandungan vitamin E tertinggi diperoleh pada proses solvolitik miselisasi sekitar 97,64 mcg/ml. Aktivitas antioksidan tertinggi dari karotenoid dan vitamin E diperoleh dari proses transesterifikasi sedangkan proses lainnya mempunyai aktivitas antioksidan yang rendah, sehingga dapat disimpulkan bahwa paparan panas dan bahan kimia yang berlebihan berdampak pada aktivitas antioksidan.

Abstract

Palm oil contains carotenoid and vitamin E which possess antioxidant properties. A long exposure of heat and chemical substances during the purification process may lower antioxidant activity. This research was conducted to compare antioxidant activity of carotenoid and vitamin E obtained from each stage of three continuous purification process (transesterification, solvolytic micellization, and saponification). Total carotenoid concentration was analyzed by UV-visible spectrophotometer at λ 446 nm and total vitamin E concentration was analyzed by high-performance liquid chromatography, while ester and triglyceride concentration were analyzed by gas chromatography. Antioxidant activity was measured by DPPH assay with incubation time in 60 minutes. The highest concentration of carotenoid (229,968 mcg/ml) was extracted from saponification process, yet the highest concentration of vitamin E (97.64 mcg/ml) was extracted from transesterification process. The highest antioxidant activity of carotenoids and vitamin E was obtained from the transesterification process, while other processes had lower antioxidant activity, so it can be concluded that exposure to heat and excessive chemical substances could impact on antioxidant activity.

Keywords: Crude palm oil, carotenoid, vitamin E, antioxidant activity, DPPH

PENDAHULUAN

Minyak kelapa sawit (MKS) merupakan minyak nabati yang memiliki banyak jenis komponen minor seperti karotenoid, yang mempunyai potensi sebagai sumber provitamin A alami dan mampu menggantikan sumber vitamin A sintetik yang harganya relatif mahal (Gunstone, 2002). Senyawa karotenoid yang terdapat pada minyak kelapa sawit merupakan senyawa penting bagi tubuh yang berperan sebagai antioksidan (Nnaji, 2013). Karotenoid bersifat non polar dan struktur molekulnya memiliki ikatan ganda terkonjugasi yang menyebabkan kurang stabil. Di dalam tubuh, bentuk hidrofobiknya memiliki fungsi sebagai antioksidan yang berperan penting dalam pertahanan jaringan tubuh terhadap kerusakan akibat radikal bebas (Boon, 2010). Sumber radikal bebas terbesar dalam tubuh terjadi selama proses transpor elektron dengan menghasilkan radikal bebas anion superoksida dan produksinya dapat meningkat dalam keadaan hiperglikemia dan hiperkolesterolemia (Robertson *et al.*, 2003). Senyawa yang bersifat antioksidan banyak terdapat dalam sayur mayur, buah-buahan segar dan rempah-rempah karena mengandung vitamin C, vitamin E, karoten, likopen dan flavonoid yang dapat mencegah reaksi berantai radikal bebas (Kosasih, 2004). Senyawa antioksidan yang terkandung pada minyak dapat digunakan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh degradasi (Izbaim *et al.*, 2009).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan metode peredaman

radikal bebas menggunakan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH). Senyawa tersebut merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan dalam menentukan aktivitas antioksidan dari bahan-bahan alami dan minyak (Chang *et al.*, 2002; Rubalya & Neelamegam, 2012). Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan (Gurav *et al.*, 2007).

Proses kerusakan karoten yang umum adalah isomerisasi, oksidasi dan fragmentasi molekul. Paparan panas, cahaya dan asam yang terjadi selama proses ekstraksi dapat mengakibatkan isomerisasi bentuk trans menjadi bentuk cis yang memiliki aktivitas provitamin A yang lebih rendah dibandingkan *all-trans-β-karotenoid* (Levin & Mokady, 1994). Senyawa karotenoid telah diekstraksi dengan berbagai metode seperti saponifikasi, urea, adsorpsi dan solvolitik miselisasi (Choo, 2000). Oleh Panjaitan *et al* (2008), disebutkan metode solvolitik miselisasi yang dilanjutkan dengan proses saponifikasi menghasilkan konsentrat karoten lebih dari 100.000 mcg/ml. Ekstraksi menggunakan kromatografi kolom adsorpsi menghasilkan konsentrat karotenoid enam

kali dari konsentrasi awal dengan tingkat rekoveri sebesar 74,65-86,50% (Masni, 2004).

Berdasarkan uraian di atas akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dari proses pemurnian senyawa karotenoid dan vitamin E yang diperoleh dari setiap tahap pada proses pemurnian berkelanjutan yaitu proses transesterifikasi, solvolitik miselisasi dan saponifikasi.

METODE

Alat yang digunakan pada penelitian adalah spektrofotometer UV-visibel 1700 (Shimadzu), kromatografi gas (GC-14B, Shimadzu), kromatografi cair kinerja tinggi (Perkin Elmer), kolom DB5-HT dan kolom C18 *reverse phase* (Agilent) dan kolom karotenoid untuk kromatografi cair kinerja tinggi (YMC Carotenoid).

Bahan yang digunakan adalah minyak kelapa sawit yang diambil dari Pabrik Kelapa Sawit PT. Perkebunan Nusantara IV Pabatu di Serdang Berdagai, Sumatera Utara. Bahan kimia yang digunakan berkualitas pro analisis yaitu kalium hidroksida (Brataco), metanol (Merck), heksana (Merck), kloroform (Merck), dietil eter (Merck) dan DPPH (Sigma-Aldrich).

Ekstraksi karotenoid dan vitamin E dari minyak kelapa sawit

Ekstraksi karotenoid dan vitamin E dari MKS dilakukan berdasarkan metode yang telah

dikembangkan oleh Panjaitan *et al* (2008), yaitu transesterifikasi, solvolitik miselisasi dan saponifikasi.

1. Ekstraksi karotenoid dan vitamin E dari proses transesterifikasi

Minyak kelapa sawit sebanyak 5 liter dilakukan proses transesterifikasi dengan pelarut KOH-metanolik, dihomogenkan dengan bantuan stirer selama 2 jam (suhu 70-80°C), dimasukkan ke dalam corong pisah dan diamkan selama 24 jam sampai memisah. Lapisan atas dicuci dengan akuades secara berulang-ulang sampai diperoleh lapisan bawah yang jernih dan diambil lapisan atas (ekstrak transesterifikasi).

3. Ekstraksi karotenoid dan vitamin E dari proses solvolitik miselisasi

Ekstrak transesterifikasi dibuat menjadi ekstrak solvolitik miselisasi, yaitu dengan menambahkan pelarut metanol, dihomogenkan dengan bantuan stirer selama 10 menit. Pindahkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan air panas berulang kali, kemudian diamkan selama 1 jam hingga memisah sempurna dan diambil lapisan atas (ekstrak solvolitik).

4. Ekstraksi karotenoid dan vitamin E dari proses saponifikasi

Ekstrak solvolitik miselisasi dilakukan proses pemurnian lanjutan yang dilakukan dengan metode saponifikasi menggunakan larutan KOH dan dietil eter selama 4 jam pada suhu 60°C, dan diambil lapisan atas (ekstrak saponifikasi).

Analisis kandungan ester dan gliserida

Penentuan kandungan ester dan gliserida pada ekstrak dari setiap proses dengan menggunakan kromatografi gas mengacu pada metode test MPOB c2.11 (Kuntom *et al.*, 2005).

Analisis kandungan total karotenoid dan vitamin E

Penentuan kadar total karotenoid pada ekstrak dari setiap proses dianalisis berdasarkan metode MPOB p2.6, dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada λ 446 nm (Kuntom *et al.*, 2005) dan pengujian kandungan vitamin E (tokoferol dan tokotrienol) dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (Gimeno *et al.*, 2000).

Penentuan kemampuan aktivitas antioksidan

Penentuan kemampuan antioksidan diukur sebagai penurunan absorbansi larutan DPPH (peredaman warna ungu DPPH) sebelum dan sesudah penambahan larutan uji yang dihitung

sebagai persen peredaman (Molyneux, 2004). Penentuan nilai *inhibitory concentration* (IC_{50}) menunjukkan konsentrasi larutan uji dan pembanding ($\mu\text{g/ml}$) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses pemurnian karotenoid dan vitamin E dari minyak kelapa sawit dapat dilakukan dengan beberapa tahapan proses yang berkelanjutan yaitu transesterifikasi, solvolitik miselisasi dan saponifikasi, kemudian dianalisis kandungan ester dan gliserida, total karotenoid, konsentrasi vitamin E, dan pengujian aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas dengan metode DPPH.

Hasil kandungan ester dan gliserida

Analisis kandungan ester dan gliserida dari masing-masing tahapan proses dengan kromatografi gas digunakan metode tes MPOB c2.11 (Kuntom *et al.*, 2005), hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan gliserida dan ester pada ekstrak dari tiap proses

Jenis Proses	Kandungan (%)			
	Trigliserida	Digliserida	Monotrigliserida	Ester
Proses transesterifikasi	(-)	0,17	1,95	97,88
Proses solvolitik miselisasi	(-)	(-)	1,67	98,83
Proses saponifikasi	(-)	(-)	(-)	74,36

(-) = tidak terdeteksi

Pada Tabel 1. Menunjukkan bahwa pada tahap proses saponifikasi tidak terdapat kandungan trigliserida, digliserida dan monogliserida, sedangkan pada tahap transesterifikasi masih ditemukan digliserida 0,17 % dan monogliserida sekitar 1,95 %, begitu juga pada tahap solvolitik masih ditemukan 1,67 % monotrigliserida. Hal tersebut dapat terjadi karena pada proses saponifikasi seluruh gliserida dan sebagian ester bereaksi dengan basa kuat yang menghasilkan sabun (Hájek & Skopal, 2009).

Hasil analisis total karotenoid

Analisis total karotenoid dari masing-masing tahapan proses dengan spektrofotometer UV-Visibel pada λ 446 nm dapat dilihat pada tabel 2. Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa ekstrak proses saponifikasi memiliki kandungan total karotenoid yang sangat tinggi sekitar 229.968 mcg/ml dibandingkan dengan solvolitik miselisasi sekitar 7.346 mcg/ml dan transesterifikasi sekitar 599 mcg/ml. Hal tersebut dapat terjadi karena pada tahapan

Tabel 2. Hasil analisis total karotenoid pada ekstrak dari tiap proses

Jenis Proses	Konsentrasi (mcg/ml)
Proses transesterifikasi	599
Proses solvolitik miselisasi	7.346
Proses saponifikasi	229.968

proses tersebut seluruh ester dan gliserida yang tersisa bereaksi dengan basa kuat (KOH) dan membentuk sabun, sehingga karotenoid terkonsentrat dengan proses saponifikasi (Hájek & Skopal, 2009). Pada proses sebelumnya masih terdapat kandungan ester dan gliserida yang tinggi, dimana karotenoid pada minyak kelapa sawit sangat mudah larut dengan gliserida (Hasibuan *et al.*, 2012). Proses transesterifikasi mengubah molekul besar dari trigliserida menjadi molekul lebih sederhana (metil ester asam lemak) yang tingkat kelarutannya jauh lebih tinggi, sehingga karotenoid lebih mudah dipisahkan dan dilarutkan (Puah *et al.*, 2007). Pada proses solvolitik miselisasi menggunakan

pelarut mayor seperti metanol dan pelarut minor yang berfungsi untuk membentuk dua lapisan bersifat hidrofobik (kaya karotenoid) dan hidrofilik (kaya ester) (Lamria, 2006). Menurut Rivani *et al.*, (2009), bahwa proses pemurnian sebaiknya dilakukan berulang dengan jumlah air yang tidak terlalu banyak, karena dapat menyebabkan karotenoid terdegradasi dan tidak terkonsentrat.

Analisis kandungan vitamin E (tokoferol dan tokotrienol)

Analisis kandungan vitamin E (tokoferol dan tokotrienol) dari masing-masing tahapan proses dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan tokoferol dan tokotrienol pada ekstrak dari tiap proses

Jenis Proses	Tokoferol (%)		Tokotrienol (%)			Total
	Δ	α	δ	α	γ	
Proses transesterifikasi	0,29	7,41	11,08	9,28	69,58	97,64
Proses solvolitik miselisasi	0,12	(-)	15,89	9,02	58,35	83,38
Proses saponifikasi	(-)	(-)	0,36	0,30	16,00	16,66

(-) = tidak terdeteksi

Pada Tabel 3. dapat dilihat bahwa ekstrak dari proses transesterifikasi memiliki kandungan vitamin E paling tinggi sekitar 97,64%, sedangkan solvolitik miselisasi sekitar 83,38% dan saponifikasi sekitar 16,66%. Hal tersebut dapat terjadi karena proses transesterifikasi telah mengkonversi trigliserida menjadi ester sehingga tingkat kelarutan vitamin E menjadi lebih tinggi terhadap pelarut non polar (Panjaitan *et al.*, 2008). Namun pada tahapan proses selanjutnya terjadi penurunan kadar vitamin E yang dapat disebabkan

adanya proses yang menggunakan panas dalam waktu yang relatif lama sehingga paparan panas, udara dan bahan kimia yang berlebihan dapat mengakibatkan degradasi vitamin E (Aguilar *et al.*, 2008).

Hasil pengujian aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan dari masing-masing tahapan proses menggunakan metode peredaman radikal bebas dengan DPPH dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Konsentrasi penghambatan (IC₅₀) pada ekstrak dari tiap proses

Jenis Proses	Konsentrasi Penghambatan IC ₅₀ (mcg/ml)
Proses transesterifikasi	5,61
Proses solvolitik miselisasi	11,2
Proses saponifikasi	11,6

Pada Tabel 4. dapat dilihat bahwa ekstrak dari proses transesterifikasi memiliki aktivitas antioksidan paling kuat yang diketahui berdasarkan nilai penghambatan radikal bebas (IC₅₀) sekitar 5,61 mcg/ml, sedangkan proses solvolitik miselisasi sekitar 11,2 mcg/ml dan proses saponifikasi sekitar 11,6. Hal tersebut dapat disebabkan oleh tingginya kandungan vitamin E sebagai tokoferol dan

tokotrienol pada proses transesterifikasi dibandingkan pada proses solvolitik miselisasi dan saponifikasi. Menurut Palozza *et al.*, 2006, aktivitas antioksidan tokotrienol lebih besar dibandingkan dengan tokoferol. Pada ekstrak dari proses solvolitik miselisasi dan saponifikasi mengandung karotenoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan proses transesterifikasi, namun kandungan

tokoferol dan tokotrienol lebih rendah sehingga kemampuan antioksidan lebih rendah (Panpipat & Chaijan, 2011).

KESIMPULAN

Kandungan total karotenoid yang paling tinggi diperoleh pada ekstrak setelah melalui proses saponifikasi, dan kandungan vitamin E sebagai tokoferol dan tokotrienol yang sangat tinggi diperoleh pada ekstrak setelah melalui proses transesterifikasi. Meskipun demikian, aktivitas antioksidan dari seluruh ekstrak yang berasal dari masing-masing proses masih menunjukkan nilai yang kuat dimana nilai IC_{50} yang diperoleh berada dibawah 50 mcg/ml.

DAFTAR ACUAN

Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Dekant, W., et al. (2008). Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission on mixed tocopherols, tocotrienol tocopherol and tocotrienols as sources for vitamin E. *The EFSA Journal*, 640, 1-34

Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J., Decker, E.A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenes in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 515-532

Choo, Y.M. (2000). Specialty products carotenoids. *Advances in oil palm*

research. Volume II. (Editor: Y. Basiron, B.S. Jalani, and K.W. Chan). Kuala Lumpur: Malaysia Palm Oil Board. pp 1036-1060

Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., de la Torre, M.C., Lopez-Sabater, M.C. (2000). Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881, 251-254

Gunstone, F.D. (2002). *Vegetables oils in food technology: composition, properties and uses*. New York: Blackwell Publishing Ltd. Pages 76

Gurav, S., Deskhari, N., Gulkari, V., Durangkar, N., and Patil, A. (2007). Free radical scavenging activity of *polygala chinensis* Linn. *Pharmacology online*, 2, 245-253

Hájek, M and Skopal, F. (2009). Purification of the glycerol phase after transesterification of vegetable oils. *44th International Petroleum Conference* (pp. 1-6). Bratislava, Slovak Republic

Hasibuan, H.A., Herawan, T., and Rivani, M. (2012). Recovery of palm fatty acid alkyl ester by short part distillation. *International Oil Palm Conference*, 345-353

Izbaim, D., Faiz, B., Moudden, A., Taifi, N., and Hamine, A. (2009). Use of Ultrasonic's for the quality assesment of frying oil. *International Journal of Signal System Control and Engineering application*, 2(2), 35-39

Kosasih. (2004). *Peranan antioksidan*

- pada lanjut usia*. Jakarta: Pusat Kajian Nasional masalah Lanjut Usia. Hal 15.
- Kuntom, A., Lin, S.W., Ai, T.Y., Idris, N.A., Yusof, M., Sue, T.T., and Ibrahim, N.A. (2005). *MPOB TEST METHOD: A compendium of test on palm oil products, palm kernel products, fatty acids, food related products and other*. Kuala Lumpur: Malaysian Palm Oil Board.
- Lamria, M., Soerawidjaja, T.H., and Siahaan, D. (2006). Solvolytic Micellization in carotene recovery from palm biodiesel. *Proceeding International Oil Palm Conference* (pp. 330-338). Bali, Indonesia.
- Levin, G., and Mokady, S. (1994). Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans β -carotene in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(1), 77-82
- Masni. (2004). Kajian pemanfaatan limbah pabrik kelapa sawit sebagai sumber karotenoid. *Disertasi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219
- Nnaji, L.C., Okonkwo, I.F., Solomon, B.O., and Onyia, O.C. (2012). Comparative study of beta-carotene content of egg yolk of poultry. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 2(1), 1-3
- Palozza, P., Verdecchia, S., Avanzi, L., Vertuani, S., Serini, S., Iannone, A., and Manfredini, S. (2006). Comparative antioxidant activity of tocotrienols and the novel chromanyl-polyisoprenyl molecule FeAox-6 in isolated membranes and intact cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 287(1-2), 21-32
- Panjaitan, F. R., Siahaan, D., Herawan, T., Rivani, M., dan Hasibuan, H. A. (2008). Studi awal penjumlahan karoten sawit dengan teknik *Solvolytic Micellization* menggunakan pelarut mayor etanol. *Jurnal penelitian Kelapa Sawit*, 16(3), 163-170
- Panpipat, W., and Chaijan, M. (2011). Extraction and free radical scavenging activity of crude carotenoids from palm oil meal. *Asian Journal of Food Agro-Ind*, 4(6), 382-387
- Puah, C.W., Choo, Y.M., Ma, A.N., Chuah, C.H. (2007). Solubility of tocopherols and tocotrienols from palm oil in supercritical carbon dioxide. *Journal Food Lipids*, 14, 377-385
- Rivani, M., Panjaitan, F.R., Hasibuan, H.A., Siahaan, D., dan Herawan, T. (2009). Optimasi penjumlahan karotenoid dari metil ester sawit dengan proses *Solvolytic Micellization*. *Journal Pen. Kelapa Sawit*, 17(1), 30-36
- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y., and Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52, 1-7
- Rubalya, V.S., and Neelamegam, P. (2012). Antioxidant potential in vegetable oil. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 16(2), 87-94