

EKSTRAK ENZIM PROTEASE DARI DAUN PALADO (*Agave angustifolia*) DAN PEMANFAATANNYA DALAM PROSES PEMBUATAN VIRGIN COCONUT OIL

The Extract of Protease Enzyme of Palado (*Agave angustifolia*) Leaf and Its Use in The Making Process of Virgin Coconut Oil

*Kasmir Sy. Male, Siti Nuryanti dan Sitti Rahmawati

Pendidikan Kimia/FKIP - Universitas Tadulako, Palu - Indonesia 94118

Received 07 July 2014, Revised 01 August 2014, Accepted 04 August 2014

Abstract

Virgin coconut oil (VCO) can be made in several ways, namely through a heating process at low temperature, freeze-drying, fermentation, enzymatic, mechanical pressure or centrifugation. VCO with an enzymatic method is the making of VCO from coconut milk by using enzyme. The protein-oil bonds in the emulsions in coconut milk can be broken down into protease enzyme. The purpose of this research is to extract the protease enzyme in palado leaves and utilize the enzymes in the manufacturing process as well as determining the quality of VCO. This research method passed through some processes. Firstly enzyme extracts from palado leaves are prepared and coconut milk from coconut cream is made, then it is tested qualitatively the presence of protease enzyme with ninhydrin color reagent. Furthermore, the making of VCO enzymatically is undertaken by varying the ratio of the volume of coconut cream and enzyme extracts of 24 hours. VCO quality is analysis by using the parameters of smell, flavor, color, moisture content, levels of FFA (free fatty acid) and peroxide. The testing result with ninhydrin reagent gave a positive reaction (blue-purple) showing that there is enzymes alleged a class of protease in the palado leaf. The result of VCO made with the comparison of coconut cream and enzyme extracts from palado (10 : 1) has generate a VCO with a yield of 25.4%. However, from the analysis of VCO quality test results, it is obtained the smell of distinctive flavor oils, fragrance, the clean color, water content of 0.5% , FFA content of 0.25% and the peroxide number of 0 meq/kg.

Keywords: Enzyme Extract, Virgin Coconut Oil, Palado (*Agave angustifolia*)

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara tropis penghasil kelapa terbesar di dunia. Tanaman kelapa ditanam dalam bentuk pekarangan di pulau Jawa, sedangkan di pulau-pulau lain tanaman kelapa ditanam dalam bentuk monokultur perkebunan (Warisno, 1998). Daging buahnya dapat dipakai sebagai bahan baku untuk menghasilkan kopra, minyak kelapa, santan, dan kelapa parut (Pontoh & Makasoe, 2011).

Produk dari kelapa yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dan menjadi perbincangan di negara-negara penghasil kelapa, seperti USA dan beberapa negara berkembang adalah VCO (Bawalan & Chapman, 2006). VCO adalah minyak yang diperoleh dari daging buah kelapa

(*Cocos nucifera* L.) yang segar dan diproses dengan cara diperas menggunakan air atau tanpa penambahan air, tidak dengan pemanasan atau melalui pemanasan dengan suhu rendah (sekitar 60°C) dan aman dikonsumsi (Badan Standarisasi Nasional, 2008).

VCO mempunyai nilai tambah yang besar karena dapat digunakan sebagai bahan baku berbagai produk seperti kosmetik, sabun, makanan, dan obat-obatan (Hartatil dan Mulyanil, 2009). Hal ini disebabkan karena VCO mengandung sekitar 64% asam lemak jenuh rantai sedang atau medium chain saturated fatty acids (MCFA) yang terdiri lebih dari 50% asam laurat (C12), 6–7% asam kaprat (C10), dan 8% asam kaprilat (C8) (Sulistio, dkk., 2009). MCFA mempunyai kemampuan untuk meningkatkan sistem imun, juga dapat membantu penyerapan magnesium, kalsium dan asam amino oleh tubuh (Hanafiah, dkk., 2011).

*Korespondensi:

Kasmir Sy. Male

Program Studi Pendidikan kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Tadulako

email: kazmyr_kimia@ymail.com

© 2014 - Program Studi Pendidikan Kimia Universitas Tadulako

VCO berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan sediaan obat, karena mengandung asam laurat dan oleat yang dapat berperan melembutkan kulit. Disamping itu, VCO efektif dan aman digunakan sebagai moisturizer pada kulit sehingga dapat meningkatkan hidrasi kulit, dan mempercepat penyembuhan pada kulit (Lucida, dkk., 2008). Asam laurat yang terdapat dalam VCO bermanfaat sebagai antibiotik serta dapat meningkatkan metabolisme tubuh (Rampengan, 2006).

Nevin & Rajamohan (2004) melaporkan hasil penelitiannya terhadap sampel tikus yang diberi suntikan VCO di dalam serum darahnya yaitu VCO bermanfaat menurunkan kadar komponen lipid dibandingkan minyak kelapa biasa. VCO mengurangi jumlah total kolesterol, trigliserida, fosfolipid, low density lipoprotein (LDL) dan tingkat kolesterol very low density lipoprotein (VLDL) serta dapat meningkatkan kolesterol high density lipoprotein (HDL) dalam serum dan jaringan. Hal ini diduga disebabkan adanya kandungan senyawa polifenol yang terdapat dalam minyak yang berperan dalam aktivitas biologi.

Hasil penelitian Momuat, dkk., (2011) menerangkan bahwa kelompok hewan yang diberi pakan VCO memiliki malondialdehid (MDA) plasma lebih besar dari pada hewan yang tidak diberi pakan VCO. Tikus yang diuji sebagai hewan percobaan, karena sistem metabolisme tubuhnya sama dengan manusia. Hal ini menunjukkan bahwa mengkonsumsi VCO dapat menurunkan tingkat oksidasi dalam plasma.

Pembuatan VCO ada beberapa cara yaitu melalui proses fresh-dry, pendinginan dan pencairan, enzimatis, dan fermentasi (Mansor, dkk., 2012). Pembuatan VCO dengan cara enzimatis merupakan pembuatan VCO dari santan kelapa dengan bantuan enzim. Ikatan protein minyak yang berada pada emulsi santan bisa dipecah dengan bantuan enzim yaitu enzim protease. VCO yang dihasilkan dari proses enzimatis memiliki keunggulan antara lain VCO berwarna bening, kandungan asam lemak di dalam VCO tidak banyak berubah sehingga khasiatnya tetap tinggi, tidak mudah tengik karena komposisi asam lemaknya tidak banyak berubah. Rendemen yang dihasilkan tinggi (Setiaji, 2006).

Salah satu enzim yang dapat digunakan untuk memecahkan ikatan lipoprotein dalam emulsi lemak adalah enzim bromelin yang terdapat pada buah nanas (Setiaji, 2006). Penelitian pembuatan VCO menggunakan

enzim bromelin telah banyak dilakukan. Dewi dan Rahmawati (2012) telah menggunakan daun dan akar tanaman palado (*Agave angustifolia*) untuk pembuatan VCO dengan metode enzimatis dan membandingkannya dengan akar nanas yang mengandung enzim bromelin. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa tanaman palado dapat digunakan untuk pembuatan VCO secara enzimatis dengan rata-rata rendemen sebesar 17,5% dengan bilangan asam 0,56 (menggunakan daun palado) dan 0,44 (menggunakan akar palado).

Penelitian Dewi & Rahmawati (2012) menduga adanya enzim protease dalam akar dan daun palado yang digunakan untuk mendegradasi ikatan lipoprotein pada santan seperti halnya enzim bromelin yang terdapat dalam tanaman nanas. Akan tetapi, hal ini belum dapat dipastikan karena belum ada penelitian secara mendalam tentang enzim yang terkandung dalam tanaman palado tersebut. Berdasarkan pemaparan tersebut, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengekstrak enzim dari daun palado dan melakukan pengujian terhadap ekstrak enzim yang diperoleh dalam proses pembuatan VCO serta menentukan rendemen dan kualitas VCO yang dihasilkan.

Metode

Peralatan yang digunakan antara lain: neraca digital (ARC-120), desikator, oven (MM Medcenter Venticell), sentrifuge (HD-16 D), dan shaker (KS-130 Basic). Bahan yang digunakan antara lain: KH_2PO_4 , NaOH, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI, $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, NaHCO_3 , ninhidrin, asam asetat glasial, amilum, fenoltalein, kloroform 97%, etanol 95% dari MERCK, aquades, kelapa dan daun palado.

Preparasi ekstrak kasar enzim protease dari daun palado

Tanaman palado yang biasa tumbuh di daerah Tondo, diambil daunnya dan dibersihkan lalu dipotong-potong. Selanjutnya diparut dan diperas agar kadar airnya berkurang kemudian dikeringkan. Serbuk yang telah kering diambil 20 gram dan ditambahkan aquades 200 mL kemudian dihomogenkan sampai berbentuk jus, lalu disaring dan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat merupakan ekstrak kasar enzim dengan konsentrasi 10% (b/v) (Sulastri, 2008).

Preparasi krim santan dari buah kelapa

Dua buah kelapa setengah tua diambil

dagingnya, kemudian diparut dan ditambahkan air dengan perbandingan 1 : 1 (b/v). Campuran kelapa dan air ini diremas-remas selama 15-20 menit. Setelah itu disaring dengan menggunakan saringan kelapa dan dibiarkan selama 1-2 jam di dalam gelas kimia 2 L. Setelah terjadi dua lapisan, diambil bagian atas yang kemudian digunakan pada pembuatan VCO (Dewi & Rahmawati, 2012).

Uji kualitatif ekstrak enzim protease

Sebanyak 5 gram serbuk kering daun palado dihomogenkan dengan 50 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7 (1 : 10). Selanjutnya campuran disaring dan residunya dibuang, sedangkan filtrat didinginkan lebih lanjut pada suhu < 40°C selama 3 jam. Selanjutnya diekstraksi dengan cara pengocokan (shaking) selama 2 jam, dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi berupa endapan dan supernatan. Supernatan merupakan ekstrak kasar (crude) enzim. Ekstraksi juga dilakukan dengan menggunakan pelarut aquades. Supernatan diuji dengan pereaksi Ninhidrin dengan cara menambahkan 5 tetes larutan Ninhidrin 1% ke dalam 5 mL supernatan dan mendidihkannya sampai terjadi perubahan warna. Perubahan warna ini (menjadi biru keunguan) menunjukkan adanya enzim dalam supernatan tersebut (Chaidir, 1998).

Pembuatan VCO secara Enzimatis dan Penentuan Rendemennya

Disiapkan sebanyak 4 gelas kimia ukuran 250 mL, lalu ke dalam gelas tersebut dimasukkan krim santan sebanyak 100 mL. Ke dalam masing-masing gelas kimia ditambahkan ekstrak kasar enzim protease dengan berbagai volume yaitu 10 mL, 20 mL, 30 mL dan 40 mL. Campuran ditutup dan didiamkan selama 24 jam. Setelah terjadi pemisahan menjadi 3 lapisan, maka lapisan VCO (tengah) diambil dan ditempatkan di gelas kimia yang lain. Kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan VCO yang bersih. VCO yang diperoleh diukur jumlah volumenya dan dianalisis rendemennya. Rendemen VCO menyatakan perbandingan volume VCO yang dihasilkan terhadap jumlah krim santan yang digunakan (Sulastri, 2008).

Analisis Kualitas VCO

$$\text{Rendemen VCO (\%)} = \frac{\text{Volume VCO yang dihasilkan (mL)}}{\text{Volume Krim Santan yang digunakan (mL)}} \times 100\%$$

Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air menggunakan metode oven. Krusibel dicuci bersih dan dikeringkan lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam. Selanjutnya didinginkan dalam desikator selama ½ jam. Kemudian krusibel ditimbang dan dicatat bobotnya. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh bobot yang tetap. Selanjutnya sampel VCO dimasukkan ke dalam krusibel sebanyak 1 gram dan dipanaskan lagi pada oven dengan suhu 105°C selama 1 jam, lalu didinginkan dalam desikator selama ½ jam. Kadar air dinyatakan sebagai % (b/b), dihitung sampai dua desimal dengan menggunakan rumus (Badan Standarisasi Nasional, 2008):

$$\text{Kadar Air} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

Dimana : m_1 = bobot cuplikan (gram), dan m_2 = bobot cuplikan setelah pengeringan (gram).

Kadar FFA

Ditimbang 3 gr sampel ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 5 mL etanol 95% dan dipanaskan sampai mendidih (± 10 menit) dalam penangas air sambil diaduk, kemudian setelah dingin ditambahkan 2 tetes indikator pp dan dititrasi dengan larutan standar NaOH 0,1 N (yang sebelumnya telah distandarisasi dengan larutan H₂C₂O₄ 0,1 N) hingga warna merah muda tetap (tidak berubah selama 15 detik). Dilakukan penetapan blangko. Kadar FFA/asam lemak bebas/derajat asam (dihitung sebagai asam laurat) dinyatakan sebagai persen asam lemak, dihitung sampai dua desimal dengan rumus berikut (Badan Standarisasi Nasional, 2008):

$$\text{Kadar FFA (sebagai Asam Laurat)} = \frac{V \times N \times 200}{m \times 10}$$

Keterangan:

V = Volume NaOH untuk titrasi contoh (mL)

N = Normalitas NaOH

m = Massa sampel (gram)

200 = Massa molekul asam laurat

Bilangan Peroksida

1 gram contoh dalam erlenmeyer 100 mL ditambahkan 2 mL kloroform kemudian

dikocok dengan kuat. Ditambahkan 3 mL asam asetat glasial dan 0,2 mL larutan KI jenuh kemudian ditutup erlenmeyer tersebut dengan cepat dan dikocok kira-kira 5 menit di tempat gelap pada suhu 15-25 °C. Ditambahkan 15 mL air suling dan dikocok dengan kuat. Dititrasi dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,02 N (yang sebelumnya telah distandarisasi dengan $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,02 N) dengan larutan amilum 1% sebagai indikator. Dilakukan penetapan blanko dan dihitung bilangan peroksida dalam sampel. Bilangan peroksida dapat dinyatakan dalam miligram ekuivalen dari oksigen aktif per kg, dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Badan Standarisasi Nasional, 2008):

$$\text{Bilangan Peroksida (meq/Kg)} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 1000}{m}$$

Keterangan:

- V_1 = Volume $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ untuk penitrasi sampel (mL)
 V_0 = Volume $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ untuk penitrasi blanko (mL)
 N = Normalitas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
 m = Massa sampel (gram)

Hasil dan Pembahasan

Uji Kualitatif Ekstrak Kasar Enzim Protease

Penelitian ini diawali dengan menyiapkan ekstrak kasar enzim protease dari daun Palado (*Agave angustifolia*) yang berasal dari kelurahan Tondo, Kota Palu. Daun palado diambil pada sore hari dan dipotong kecil-kecil kemudian diparut untuk memudahkan memperoleh serat palado. Kemudian dilakukan pemerasan serat palado untuk memisahkan zat-zat klorofil daun dengan seratnya. Setelah itu dilakukan pengeringan selama 3 hari agar tidak terdapat

dari VCO yang akan dibuat.

Serat palado yang telah kering dihomogenkan/diblender dengan penambahan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dingin dengan perbandingan 1 : 10. Penghancuran jaringan dalam blender merupakan metode abrasi sel yang dapat digolongkan sebagai teknik mekanik (fisik), yang bertujuan untuk memisahkan komponen dan kompartemen sel secara kasar untuk selanjutnya akan mempermudah dalam homogenisasi. Sedangkan penambahan buffer selama proses homogenisasi bertujuan untuk mempertahankan agar kondisi komponen sel tetap optimum seperti keadaan yang sebenarnya dan tidak mengalami perubahan (Arjito, 2009).

Hasil homogenisasi disaring dengan kain saringan untuk memisahkan filtrat yang mengandung komponen-komponen sel dengan residu yang mengandung dinding sel. Filtrat kemudian didinginkan pada suhu 4°C dan didiamkan selama 3 jam. Pendinginan bertujuan untuk mempertahankan agar enzim tidak rusak, sedangkan pendiaman bertujuan untuk mengendapkan sisa-sisa serat palado yang masih ada (Julianti, 2012). Kemudian dilanjutkan dengan proses pengocokan selama 2 jam dan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Proses pengocokan bertujuan agar ekstraksi enzim lebih sempurna dan sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan supernatan yang diduga merupakan ekstrak kasar (crude) enzim dengan sisa-sisa serat palado. Ekstrak kasar umumnya mempunyai aktivitas yang rendah karena enzim ini masih merupakan campuran dari beberapa enzim dan kemungkinan masih mengandung senyawa-senyawa yang bukan enzim (Wuryanti, 2004).

Supernatan kemudian diuji secara kualitatif dengan pereaksi spesifik ninhidrin dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji kualitatif ekstrak kasar enzim protease

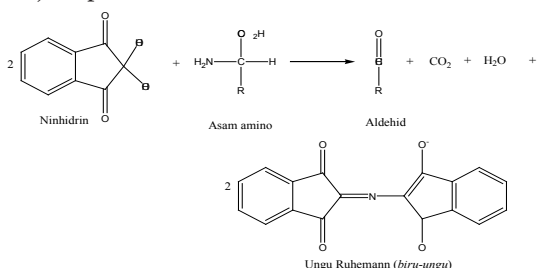
No	Perlakuan	Pengamatan	Keterangan
1.	Supernatan enzim hasil ekstraksi dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 + Ninhidrin dan dididihkan	Terjadi perubahan warna dari kekuningan menjadi biru keunguan	Positif mengandung enzim
2.	Supernatan enzim hasil ekstraksi dengan aquades + Ninhidrin dan dididihkan	Terjadi perubahan warna dari kekuningan menjadi biru keunguan	Positif mengandung enzim

lagi zat-zat pigmen warna daun yang akan mempengaruhi tampilan warna, bau dan rasa

Supernatan enzim hasil ekstraksi baik menggunakan buffer fosfat maupun aquades

memberikan hasil yang positif dengan pereaksi ninhidrin (Tabel 1). Pengujian supernatan menunjukkan hasil positif dengan ninhidrin yang ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru keunguan. Reaksi enzim dengan ninhidrin (triketohidrindena-hidrat) menghasilkan senyawa yang berwarna ungu (yang disebut ungu Ruhemann), CO_2 , ammonia dan aldehyd berat atom C kurang satu dari jumlah semula (Fessenden & Fessenden, 1986).

Enzim dikatakan sebagai suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam aktivitas biologis (Lehninger, 1993). Semua enzim adalah protein yang mengandung asam amino dan mempunyai struktur yang sangat rumit, namun ada sebagian yang agak sederhana. Reaksi yang terjadi antara enzim dengan pereaksi ninhidrin sama seperti yang terjadi pada asam amino (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi antara Ninhidrin dengan Asam Amino (Fessenden & Fessenden, 1986)

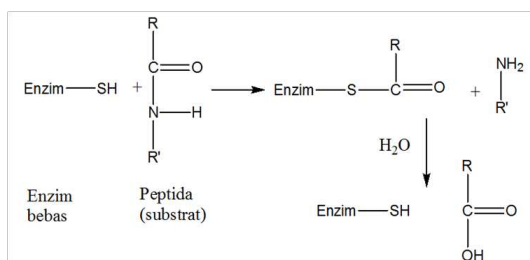
Pembuatan VCO secara Enzimatis

Pembuatan VCO dengan cara enzimatis merupakan pemisahan minyak dalam santan tanpa pemanasan. Ikatan protein minyak yang berada pada emulsi santan dipecah dengan bantuan enzim. Santan merupakan emulsi yang terdiri dari dua fase, yaitu fase air dan fase minyak yang tidak saling bercampur, karena distabilkan oleh suatu emulgator atau zat pengemulsi yaitu protein. Kedua fase tersebut diikat oleh molekul protein yang mengandung rantai hidrokarbon dengan ujung polar. Bagian karbon dari protein bersifat hidrofobik yang larut dalam minyak dan ion bersifat hidrofilik yang larut dalam fase air karena asam amino larut dalam air, gugus karboksilat akan melepaskan ion H^+ , sedangkan gugus amina akan menerima ion H^+ . Asam amino dapat membentuk ion yang bermuatan positif dan juga bermuatan negatif atau ion amfoter (Winarno, 2004).

Minyak dapat keluar dari sistem emulsi bila

ikatan emulsi tersebut dirusak. Metode yang digunakan untuk merusak sistem emulsi adalah metode enzimatis. Terbentuknya minyak merupakan terhidrolisisnya ikatan peptida pada krim santan oleh enzim. Jika ikatan peptida tersebut terhidrolisis dan putus, maka minyak dapat keluar dari sistem emulsi. Mekanisme enzimatis untuk hidrolisis dari ikatan peptida dalam protein dikatalisis oleh gugus sulfhidril ($-\text{SH}$) dari bagian enzim peptida disajikan dalam Gambar 2 (Effendi, dkk., 2012).

Pembuatan VCO diawali dengan preparasi sampel ekstrak kasar enzim protease dan krim



Gambar 2. Mekanisme Enzimatis untuk Hidrolisis Ikatan Peptida

santan. Preparasi ekstrak kasar enzim protease sama seperti pada pengujian kualitatif enzim protease, akan tetapi pelarut yang digunakan adalah air karena murah dan mudah diperoleh dibandingkan buffer fosfat. Sedangkan krim santan diperoleh dari buah kelapa tua yang dagingnya diparut kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1 : 1 (b/v) kemudian diperas selama 15 menit sampai diperoleh santan. Pamarutan dan pemerasan berfungsi untuk merusak dinding sel buah kelapa, sehingga emulsi minyak dalam daging buah dapat keluar bersama zat-zat lain dalam daging buah. Selanjutnya didiamkan selama 1 jam sehingga diperoleh pemisahan krim santan (lapisan atas) dan skim (lapisan bawah). Krim santan berada pada lapisan atas santan karena mengandung emulsi minyak dalam jumlah besar dan mempunyai berat jenis yang lebih kecil dari berat jenis air murni. Sedangkan skim mengandung banyak zat-zat ion yang terlarut dalam air dan mempunyai berat jenis lebih besar dibandingkan minyak sehingga berada pada lapisan bawah. Krim santan diambil dengan menggunakan sendok dan diperoleh 600 mL krim santan dari 2 butir kelapa.

Selanjutnya krim santan sebanyak 100 mL dicampur dengan ekstrak kasar enzim protease dengan variasi volume 10 mL, 20 mL,

30 mL dan 40 mL. Hal ini bertujuan untuk mengetahui volume ekstrak yang paling baik dalam pembuatan VCO. Selanjutnya campuran ditutup dengan aluminium foil dan diberi sedikit lubang untuk sirkulasi udara kemudian didiamkan pada suhu kamar dengan waktu pendiaman 24 jam. Setelah didiamkan selama 24 jam, maka diperoleh tiga lapisan yaitu lapisan atas (blondo), lapisan tengah (minyak) dan lapisan bawah (air). Lapisan minyak diambil dan disaring serta diukur volumenya untuk memperoleh nilai rendemen VCO.

Tabel 2. Nilai rendemen VCO yang dibuat dengan ekstrak enzim protease

No.	Volume krim santan : volume ekstrak enzim (mL)	Rendemen (%)
1.	100 : 10	25,4
2.	100 : 20	24,0
3.	100 : 30	23,2
4.	100 : 40	18,6

Tabel 2 menunjukkan bahwa rendemen VCO yang paling banyak adalah pada volume ekstrak enzim dari daun palado 10 mL. Penambahan volume ekstrak enzim yang bervariasi pada pembuatan VCO mengakibatkan konsentrasi pada setiap volume juga berbeda. Semakin banyak volume ekstrak yang ditambahkan, maka semakin besar pula konsentrasinya. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim, maka rendemen VCO yang dihasilkan semakin rendah. Hal ini berbeda dengan literatur yang menyatakan bahwa kenaikan konsentrasi enzim akan meningkatkan aktivitasnya (Lehninger, 1993). Sehingga seharusnya semakin tinggi konsentrasi enzim, maka VCO yang dihasilkan juga semakin banyak karena semakin banyak

rendah, kecepatan reaksinya bergantung pada konsentrasi substrat itu sendiri. Pada konsentrasi substrat yang tinggi, kecepatan reaksinya tidak lagi tergantung pada konsentrasi substrat itu sendiri (kecepatan reaksinya tidak dipengaruhi lagi oleh pertambahan konsentrasi substrat) karena semua bagian aktif enzim telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Pada konsentrasi substrat tertentu kecepatan reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Hal ini karena semakin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan bagian aktif enzim menyebabkan kecepatan reaksinya semakin besar dan jumlah hasil reaksinya pun bertambah (Sangi, 2011).

Konsentrasi enzim yang digunakan pada pembuatan VCO dalam penelitian ini cukup tinggi yaitu 10%, sehingga diduga pada volume ekstrak enzim 10 mL, kerja enzim telah mencapai optimum dan pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi, kerja enzim menjadi berkurang. Hal ini karena enzim telah jenuh dengan substrat, akibatnya enzim tidak lagi menghidrolisis protein yang ada pada substrat, tetapi menghidrolisis enzim itu sendiri (Hairi, 2010). Harga kecepatan maksimum pada konsentrasi substrat tertentu disebut dengan kinetika penjumlahan. Apabila enzim bekerja pada kondisi optimum tersebut maka akan diperoleh produk yang maksimal (Herdyastuti, 2006).

Analisis Sifat Fisik VCO (Bau, Rasa dan Warna)

Analisis sifat fisik VCO diawali dengan analisis organoleptik (analisis yang menggunakan panca indera) yaitu: penciuman (bau), pengecap (rasa), dan penglihatan (warna) (Asy'ari & Cahyono, 2006). Hasil analisis organoleptik dari VCO yang dibuat dengan ekstrak enzim protease disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis organoleptik VCO

No	Volume krim santan : volume ekstrak enzim (mL)	Bau	Rasa	Warna	Keterangan
1.	100 : 10	Wangi	Khas minyak	Bening	Normal
2.	100 : 20	Wangi	Khas minyak	Bening	Normal
3.	100 : 30	Wangi	Khas minyak	Bening	Normal
4.	100 : 40	Wangi	Khas minyak	Bening	Normal

enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida dalam sistem emulsi (protein-minyak). Pada konsentrasi substrat (krim santan) yang

Semua VCO yang dihasilkan memiliki bau, rasa dan warna yang sesuai dengan SNI 7381 Tahun 2008 yaitu berturut-turut memiliki

bau yang wangi, rasa yang khas seperti minyak dan warna yang bening. Sehingga dapat disimpulkan secara fisik VCO yang dihasilkan normal atau sesuai dengan standar SNI.

Kadar Air VCO

Pengujian terhadap kadar air sangat penting untuk menduga ketahanan minyak. Kadar air dalam VCO sangat mempengaruhi mutu minyak tersebut, minyak yang berkadar air tinggi akan cenderung memiliki masa simpan pendek (Sudarmadji, dkk., 2007).

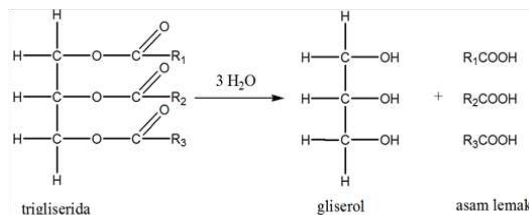
Tabel 4. Kadar air VCO

No.	Volume krim santan : volume ekstrak enzim (mL)	Kadar Air (%)
1.	100 : 10	0,5
2.	100 : 20	0,5
3.	100 : 30	0,5
4.	100 : 40	1,0

Kadar air dari VCO yang diperoleh belum memenuhi standar SNI untuk kadar air dan senyawa yang menguap dalam VCO yaitu maksimal 0,2%, sedangkan hasil VCO yang diperoleh memiliki kadar air berkisar antara 0,5-1,0%, dimana kadar air tertinggi pada volume ekstrak enzim 40 mL (Tabel 4). Hasil ini menunjukkan bahwa kadar air VCO meningkat seiring bertambahnya volume ekstrak enzim protease. Hal ini terjadi karena semakin tinggi volume ekstrak enzim, maka kadar air (sebagai pelarut) dalam ekstrak juga tinggi. Tingginya kadar air pada ekstrak enzim inilah yang menyebabkan kadar air dalam VCO yang dihasilkan juga besar. Semakin tinggi kadar air maka ketengikan minyak semakin cepat terjadi (Effendi, dkk., 2012).

Kadar air berhubungan dengan reaksi hidrolisis dari lemak. Jika dalam lemak atau minyak terdapat air maka minyak tersebut akan terhidrolisis sehingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Jika minyak tersebut banyak mengandung air, kemungkinan besar asam lemak bebas minyak akan besar pula, akibatnya kualitas minyak tersebut akan menurun. Reaksi hidrolisis minyak (Gambar 3) akan mengakibatkan kerusakan minyak atau lemak sehingga menghasilkan flavour dan bau

tengik pada minyak tersebut (Ketaren, 2008).



Gambar 3. Reaksi hidrolisis minyak (trigliserida)

Kadar FFA VCO

Asam lemak bebas (FFA) penting dilakukan sebab tingginya asam lemak bebas dapat mempengaruhi cita rasa dan bau pada minyak sehingga menyebabkan penurunan kualitas dari minyak tersebut. Semakin tinggi nilai FFA maka semakin banyak asam lemak bebas yang terdapat dalam minyak tersebut (Ketaren, 2008).

Kadar FFA VCO yang dihasilkan dengan menggunakan beragam variasi konsentrasi tidak berbeda jauh yaitu berkisar antara 0,21-0,25% (Tabel 5). Kadar FFA VCO ini belum memenuhi standar SNI yaitu maksimal 0,20%. Tingginya kadar FFA VCO ini disebabkan oleh tingginya kadar air dalam VCO sehingga mempengaruhi kualitas VCO yang diperoleh.

Tabel 5. Kadar FFA VCO

No.	Volume krim santan : volume ekstrak enzim (mL)	Kadar FFA (%)
1.	100 : 10	0,25
2.	100 : 20	0,25
3.	100 : 30	0,21
4.	100 : 40	0,23

Secara kimia minyak adalah lemak yang disebut juga trigliserida. Trigliserida jika dihidrolisis akan menghasilkan 3 molekul asam lemak rantai panjang dan 1 molekul gliserol (Budimarwanti, 2013). Asam lemak bebas terbentuk karena proses hidrolisis (reaksi dapat dilihat pada Gambar 3). Hidrolisis minyak dapat disebabkan oleh adanya sejumlah air yang terdapat dalam minyak. Proses hidrolisis dapat dipengaruhi oleh lamanya waktu penyimpanan minyak. Semakin lama minyak disimpan, kemungkinan minyak terhidrolisis akan semakin besar (Sangi, 2011).

Bilangan Peroksida VCO

Angka peroksida sangat penting untuk identifikasi tingkat oksidasi minyak. Minyak yang mengandung asam-asam lemak tak jenuh dapat teroksidasi oleh oksigen menghasilkan suatu senyawa peroksida (Anwar, 1996).

Tabel 6. Bilangan Peroksida VCO

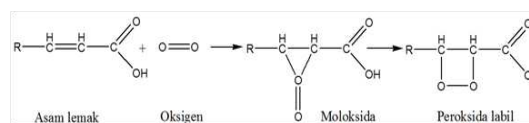
No.	Volume krim santan : volume ekstrak enzim (mL)	Bilangan Peroksida (meq/Kg)
1.	100 : 10	0,0
2.	100 : 20	1,5
3.	100 : 30	2,5
4.	100 : 40	3,0

Bilangan peroksida dari setiap VCO yang dihasilkan cukup berbeda jauh yaitu berkisar antara 0-4 meq/kg (Tabel 6). Bilangan peroksida dari VCO yang dihasilkan ini cukup beragam, ada yang memenuhi standar SNI (pada volume ekstrak enzim 10 mL dan 20 mL) dan ada yang tidak memenuhi standar SNI (pada volume ekstrak enzim 30 mL dan 40 mL) yaitu maksimal 2,0 meq/kg. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin besar penambahan volume ekstrak enzim, maka semakin besar juga nilai bilangan peroksida VCO yang dihasilkan. Hal ini berarti tingkat oksidasi VCO meningkat seiring bertambahnya konsentrasi enzim. Tingkat oksidasi VCO berhubungan dengan adanya asam-asam lemak tak jenuh dalam VCO yang dihasilkan. Oksidasi terjadi pada ikatan tak jenuh dalam asam lemak. Setiap satu ikatan tak jenuh dapat mengabsorpsi 2 atom oksigen pada suhu kamar sampai dengan suhu 100 °C, sehingga terbentuk persenyawaan peroksida yang bersifat labil. Proses pembentukan peroksida ini dipercepat oleh adanya cahaya, suasana asam, kelembapan udara dan katalis (Hairi, 2010).

VCO yang mengandung asam-asam lemak tak jenuh dapat teroksidasi oleh oksigen yang menghasilkan suatu senyawa peroksida. Sehingga semakin tinggi bilangan peroksida dari VCO, maka diduga kandungan asam-asam lemak tak jenuh (asam lemak yang mengandung ikatan rangkap) juga semakin tinggi. Namun dugaan lain dilaporkan oleh Selfawati (2003), kenaikan bilangan iodin (yang hampir sama dengan bilangan peroksida yaitu berhubungan dengan adanya asam-asam lemak tak jenuh dalam minyak) ini bukan karena bertambahnya ikatan rangkap pada minyak tetapi karena telah

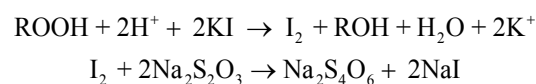
terpisahnya senyawa-senyawa non minyak yang mengandung ikatan rangkap seperti polimer, protein, hidrokarbon, glikosida dan β -karoten, sehingga diduga oksidasi tidak hanya terjadi pada minyak, melainkan pada senyawa-senyawa non minyak tersebut.

Bilangan peroksida menyatakan jumlah ekuivalen hidroperoksida yang terbentuk setiap 1000 g sampel. Hidroperoksida terbentuk dari reaksi radikal bebas peroksida dengan asam lemak tak jenuh pada minyak. Secara umum, reaksi pembentukan peroksida dapat dilihat pada Gambar 4 (Ketaren, 2008):



Gambar 4. Reaksi Radikal Bebas Peroksida dengan Asam Lemak Tak Jenuh Pada Minyak

Reaksi kimia yang terjadi pada penentuan bilangan peroksida disajikan pada Gambar 5. Reaksi tersebut didasarkan pada reaksi gugus hidroperoksida ($ROOH$) dengan ion iodida (I^-). Jumlah iodin (I_2) yang dibebaskan sebanding dengan konsentrasi hidroperoksida yang ada. Iodin yang terbentuk dapat diketahui jumlahnya melalui titrasi natrium tiosulfat menggunakan indikator pati. Kalium iodida (KI) digunakan sebagai reduktor untuk mereduksi hidroperoksida, dan bila bereaksi akan terbentuk I_2 bebas (Asa dalam Sangi, 2011).



Gambar 5. Reaksi Kimia yang Terjadi pada Penentuan Bilangan Peroksida

Kesimpulan

Hasil uji kualitatif ekstrak daun palado (*Agave angustifolia*) menggunakan pereaksi ninhidrin menunjukkan hasil yang positif yaitu berwarna biru keunguan yang membuktikan bahwa di dalam daun palado terdapat enzim yang diduga merupakan golongan protease karena dapat mendegradasi protein dalam santan. Rendemen VCO yang terbaik diperoleh 25,4% dengan menggunakan perbandingan volume krim santan dan ekstrak enzim 100 : 10. Kualitas VCO dari rendemen yang terbaik

yaitu baunya wangi, rasanya khas minyak, warnanya bening, kadar air 0,5%, kadar FFA 0,25% dan, 0 meq/kg.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada: Husnia, Nurbaya, Zainal Abidin, Sitti Nadira, Agustiawan A. Salim, Ukhuwah Islamiyah, Irna Vidianawati, Zakiyah S. Rewa, Sri Utarid, Novia Ch. Patunde, Cresna, Heri Sulistiyono, dan Sofyan Ramadhan yang telah membantu secara intensif selama penelitian.

Referensi

- Anwar, C. (1996). *Pengantar praktikum kimia organik*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Arjito, I. P. D. (2009). Analisis protein jaringan otak sapi dengan metode isolasi, purifikasi dan visualisasi. *Jurnal GaneÇ Swara*, 3(2), 55-58.
- Asy'ari, M., & Cahyono, B. (2006). Prastandarisasi: Produksi dan analisis minyak virgin coconut oil (VCO). *JSKA*, 9(3), 1-9.
- Badan Standarisasi Nasional. (2008). *Minyak kelapa virgin (VCO)*. Standar Nasional Indonesia (SNI) 7381.
- Bawalan, D. D., & Chapman, K. R. (2006). *Virgin coconut oil production manual for micro- and village-scale processing*. Bangkok: Food and Agriculture Organization Regional Office for Asia and the Pacific.
- Budimarwanti. (2013). *Analisis lipida sederhana dan lipida kompleks*. [Online]. Diunduh kembali dari <http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/131877177/analisis%20lipid.pdf>.
- Chaidir, Z. (1998). Ekstraksi enzim protease dari madu lebah. *Jurnal Kimia Andalas*, 4(2), 118-123.
- Dewi, S., & Rahmawati, S. (2012). Pemanfaatan protease dari akar agave, daun palado (agave), dan daun nenas pada proses pembuatan virgin coconut oil (VCO). *Jurnal Matematika dan Sains*, 8(2), 231-238.
- Effendi, A. M., Winarni, & Sumarni, W. (2012). Optimalisasi penggunaan enzim bromelin dari sari bonggol nanas dalam pembuatan minyak kelapa. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 1(1), 1-6.
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. (1986). *Kimia organik Jilid II edisi ketiga*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Hairi. (2010). Pengaruh umur buah nanas dan konsentrasi ekstrak kasar enzim bromelin pada pembuatan virgin coconut oil dari buah kelapa typical (*Cocos nucifera* L). (Skripsi tidak publikasikan). Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Hanafiah, A., Widyasari, E. M., & Oekar, N. K. (2011). Pembuatan, pemurnian dan stabilitas virgin coconut oil (VCO) bertanda radioiodium-131. *Indonesian Journal of Nuclear Science and Technology*, 12(2), 75-84.
- Hartatil, A., & Mulyanil, A. (2009). Profil dan prospek bisnis minyak dara (virgin coconut oil/VCO) di kabupaten Cilacap. *Jurnal Agroland*, 16(2), 130-140.
- Herdyastuti, N. (2006). Isolasi dan karakterisasi ekstrak kasar enzim bromelin dari batang nanas (*Ananas comusus* L.Merr). *Berk. Penel. Hayati*, 12, 75-77.
- Julianti, E. (2012). *Isolasi dan pemurnian enzim I*. [Online]. Diunduh kembali dari <http://elisajulianti.files.wordpress.com/2012/09/isolasi-dan-pemurnian-enzim1.pdf>.
- Ketaren, S. (2008). *Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Lehninger, L. (1993). *Dasar-dasar biokimia jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Lucida, H., Salman., & Hervian, M. S. (2008). Uji daya peningkat penetrasi virgin coconut oil (VCO) dalam basis krim. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 13(1), 23-30.
- Mansor, T. S. T., Che Man, Y. B., Shuhaimi, M., Afiq, M. J. A., & Nurul, F. K. M. (2012). Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. *International Food Research Journal*, 19(3), 837-845.

- Momuat, L. I., Sangi, M. S., & Purwati, N. (2011). Pengaruh VCO mengandung ekstrak wortel terhadap peroksidasi lipid plasma. *Jurnal Ilmiah Sains*, 11(2), 296-301.
- Nevin, K. G., & Rajamohan, T. (2004). Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry*, 37(9), 830-835.
- Pontoh, J., & Makasoe, L. (2011). Perbandingan beberapa metode pembuatan metil ester dalam analisa asam lemak dari virgin coconut oil (VCO). *Jurnal Ilmiah Sains*, 11(2), 241-247.
- Rampengan, V. F. (2006). Beberapa karakteristik virgin coconut oil yang diolah secara fermentasi. *Journal Eugenia*, 12(3), 229-234.
- Sangi, M. S. (2011). Pemanfaatan ekstrak batang buah nenas untuk kualitas minyak kelapa. *Jurnal Ilmiah Sains*, 11(2), 210-218.
- Selfawati, E. (2003). Kajian proses degumming dan netralisasi pada pemurnian minyak goreng bekas. (Skripsi tidak dipublikasikan). Bogor; FTP IPB.
- Setiaji, B. (2006). *Membuat VCO (virgin coconut oil) berkualitas tinggi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., & Suhardi. (2007). *Analisa bahan makanan dan pertanian*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
- Sulastri, S. (2008). Pemanfaatan protease dari akar nanas pada proses pembuatan virgin coconut oil (VCO). (Tesis tidak dipublikasikan). Bandung: ITB.
- Sulistio, J., Rahayu, R. D., & Poeloengan, M. (2009). Ekstraksi secara enzimatik minyak kelapa murni (VCO) dan uji pra-klinis menggunakan mencit DDY. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus*; 3A, 101-106.
- Warisno. (1998). *Budi daya kelapa kopyor*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Winarno, F. G. (2004). *Pengantar teknologi pangan*. Jakarta: Gramedia.
- Wuryanti. (2004). Isolasi dan penentuan aktivitas spesifik enzim bromelin dari buah nanas (*Ananas comosus L.*). *JKSA*, 7(3), 83-87.