

KRISTALISASI PELARUT SUHU RENDAH PADA PEMBUATAN FRAKSI KAYA VITAMIN E MENGANDUNG TOKOTRIENOL DARI DISTILAT ASAM LEMAK MINYAK SAWIT

[Low Temperature Solvent Crystallization in Tocotrienol Containing Vitamin E Rich Fraction Preparation from Palm Fatty Acid Distillate]

Kgs Ahmadi^{1)*}, dan Teti Estiasih²⁾

¹⁾ Program Studi Teknologi Industri Pertanian – Universitas Tribhuwana Tungadewi Jl. Telaga Warna – Tlogomas - Malang

²⁾ Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan – Universitas Brawijaya Jl. Veteran – Malang

Diterima 05 November 2010 / Disetujui 10 Oktober 2011

ABSTRACT

Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) is a by-product of physical refining of CPO (Crude Palm Oil) in deodorization process. PFAD is a potential source of natural vitamin E, that besides tocopherol, also contains tocotrienol. Both have functions as antioxidant and vitamin. This research studied a method for obtaining vitamin E rich fraction that contained tocotrienol by low temperature hexane solvent crystallization. The elucidation factors were ratio of solvent to unsaponifiable fraction of PFAD (5:1, 6:1, and 7:1) and crystallization temperature (-20, -10, and 0°C). The experiment was conducted in factorial completely randomized design. The research showed that PFAD contains high tocotrienol. Low temperature solvent crystallization of unsaponifiable fraction gave 33.88% increase of vitamin E concentration compared to control. Temperature and ratio of solvent to unsaponifiable fraction affected enrichment of vitamin E in PFAD. Later, saponification increased vitamin E content in unsaponifiable fraction of PFAD. Enrichment of tocopherol was higher than that of tocotrienol, supposed as a result of improper separation process in crystallization stage. Modulation of Vitamin E concentration during saponification of PFAD increased antioxidant activity compared to unsaponifiable fraction. The best result was achieved at ratio of solvent to unsaponifiable fraction of 6:1 and crystallization temperature of -10°C.

Key words: low temperature, solvent crystallization, vitamin E, tocotrienol, palm fatty acid distillate

PENDAHULUAN

Distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) merupakan hasil samping pengolahan minyak sawit dan dihasilkan pada tahap deodorisasi. Jumlah DALMS yang dihasilkan pada proses pengolahan sawit di Indonesia mencapai 4,14 juta ton (Ekonomi dan Bisnis, 2007). Menurut Lewis (2001) DALMS merupakan salah satu sumber vitamin E alami. Musalmah *et al.* (2005) menyatakan keunggulan DALMS adalah sebagian besar vitamin E dalam bentuk tokotrienol (70%) dan sisanya adalah tokoferol (30%). Tokotrienol mempunyai efek fisiologis yang lebih baik dari tokoferol (Ng *et al.*, 2004; Nesaretnam *et al.*, 2004; Musalmah *et al.*, 2005; Wali dan Sylvester, 2007).

Ahmadi (1997) telah mengembangkan proses pemisahan fraksi kaya tokoferol dari DALMS dengan teknik saponifikasi dan adsorpsi. Komponen yang terdapat dalam fraksi tidak tersabunkan adalah vitamin E dan sterol (Watanabe *et al.*, 2004). Fraksi ini mengandung 86% tokoferol yang ada dalam DALMS, tetapi kadar tokoferol pada fraksi ini masih rendah yaitu 27,909,23 µg/g (Pitoyo, 1991). Pemurnian tokoferol dengan teknik adsorpsi menggunakan zeolit menunjukkan kemurnian tokoferol masih rendah (Ahmadi, 1997). Penelitian ini mengembangkan teknik lain untuk meningkatkan kadar vitamin E dari fraksi tidak tersabunkan DALMS. Teknik tersebut juga harus mampu memisahkan tokoferol dari tokotrienol sehingga diperoleh fraksi kaya vitamin E yang mengandung tokotrienol.

Teknik yang telah dicoba pada proses pembuatan konsentrat vitamin E dari minyak nabati meliputi metilasi kimia, distilasi molekuler, dan fraksinasi etanol (Nagao *et al.*, 2004), adsorpsi dengan adsorben (Ahmadi, 1997; Chu *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2008), ekstraksi dengan cairan superkritik (Ibanez *et al.*, 2002), enzimatis dan distilasi molekuler (Watanabe *et al.*, 2004), serta kombinasi distilasi, saponifikasi, dan winterisasi (Lewis, 2001). Teknik-teknik tersebut rumit dan umumnya melibatkan suhu tinggi. Isomer vitamin E sangat peka terhadap suhu, cahaya, dan oksigen (Park *et al.*, 2007).

Fitosterol dari fraksi tidak tersabunkan DALMS seperti sterol dan hidrokarbon pada suhu tertentu mengkristal sehingga dapat dipisahkan dengan vitamin E. Menurut Gapoor *et al.* (2002) fitosterol dapat dipisahkan dari fraksi lain dalam DALMS melalui teknik kristalisasi. Teknik ini dapat digunakan untuk memisahkan vitamin E dengan fitosterol.

Tokotrienol dengan tokoferol dapat dipisahkan dengan cara manipulasi suhu kristalisasi karena keduanya mempunyai perbedaan titik beku. Tokoferol mempunyai titik beku 2,5-3,5°C (Anonymous, 2007) dan tokotrienol karena bersifat lebih tidak jenuh diduga mempunyai titik beku yang lebih rendah. Kedua jenis vitamin E tersebut mempunyai sedikit perbedaan polaritas akibat perbedaan kejenuhan pada rantai samping struktur molekulnya.

Keunggulan kristalisasi pelarut adalah penggunaan suhu rendah dan mudah diaplikasikan dengan peralatan sederhana. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji suhu kristalisasi dan

*Korespondensi Penulis :
Email : kgs.ahmadi@yahoo.com

nisbah fraksi tidak tersabunkan DALMS pada pembuatan fraksi kaya vitamin E mengandung tokotrienol.

diperoleh dilanjutkan uji lanjut dengan DMRT jika perlakuan menunjukkan pengaruh yang signifikan ($\alpha=0,05$).

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah DALMS yang diperoleh dari industri pengolahan CPO PT Salim Ivomas Pratama Surabaya. Standar vitamin E (α -tokoferol dan α -, γ -, δ -tokotrienol) dan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dari Sigma Co., methanol, KOH, etanol, kloroform, asam asetat, natrium tiosulfat, pati, KI, gas nitrogen, asam askorbat, HCl, heksana, BaCl₂, Na₂SO₄ (p. a. dari Merck), heksana (teknis), kertas saring kasar, dan kertas saring Whatman No. 1. Peralatan yang digunakan meliputi perangkat HPLC Beckman dengan kolom C18, freezer, inkubator, rotary evaporator (Buchii), spektrofotometer (Spectronic), termometer digital, dan penangas air. Penelitian ini meliputi tahap saponifikasi DALMS dan kristalisasi pelarut suhu rendah fraksi tidak tersabunkan DALMS.

Saponifikasi DALMS

Saponifikasi dilakukan pada DALMS untuk memisahkan asam lemak bebas dengan fraksi tidak tersabunkan. Saponifikasi dilakukan dengan metode Ahmadi (1997). Sebelum digunakan DALMS dan fraksi tidak tersabunkan DALMS dianalisis untuk mengetahui kadar dan jenis-jenis vitamin E, aktivitas antioksidan, bilangan peroksida, kadar asam lemak bebas, dan rendemen.

Kristalisasi pelarut suhu rendah

Sebanyak 5 g fraksi tidak tersabunkan DALMS dilarutkan dalam heksana dengan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5:1, 6:1, 7:1 v/b) dan suhu kristalisasi (-20, -10, atau 0°C). Setelah 24 jam, fase kristal dipisahkan dari filtrat dengan cara penyaringan. Pelarut dalam filtrat diuapkan dengan rotavapor sampai semua pelarut menguap. Filtrat tanpa pelarut yang diperoleh adalah fraksi kaya vitamin E.

Fraksi kaya vitamin E yang diperoleh dianalisis meliputi kadar dan jenis-jenis vitamin E, aktivitas antioksidan, bilangan peroksida, kadar asam lemak bebas, dan rendemen berdasarkan fraksi tidak tersabunkan.

Metode analisis

Metode yang digunakan untuk menganalisis parameter yang dikaji meliputi: kadar α -tokoferol dan α -, δ -, γ -tokotrienol dengan HPLC (Nielsen dan Hansen, 2008), aktivitas antioksidan metode DPPH dan bilangan peroksida metode feriklorida (Kim, 2005), kadar asam lemak bebas (AOCS, 1989), rendemen.

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dua faktor dalam pola faktorial dengan 2 kali ulangan. Faktor pertama suhu kristalisasi (-20, -10, atau 0°C) dan faktor kedua adalah nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan (5:1, 6:1, 7:1 v:b). Analisis ragam dilakukan terhadap data yang

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik DALMS dan fraksi tidak tersabunkan DALMS

Karakteristik DALMS yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Komponen utama dalam DALMS adalah asam lemak bebas, dan DALMS mengandung komponen minor yang menguap pada proses deodorisasi. Menurut Hui (1996), 80 – 90% kandungan DALMS adalah asam lemak bebas. DALMS ini merupakan sumber vitamin E dan senyawa bioaktif yang lain seperti fitosterol. Menurut Hoed *et al.* (2006), proses pemurnian secara fisik menyebabkan fitosterol dan tokotrienol teruapkan dan terkonsentrasi dalam distilat deodorizer.

Tabel 1. Karakteristik DALMS, Fraksi Tidak Tersabunkan DALMS, dan Fraksi Kaya Vitamin E

Karakteristik	DALMS	Fraksi Tidak Tersabunkan DALMS	Fraksi Kaya Vitamin E
Kadar asam lemak bebas (%)	95,75	7,99	0,43
Bilangan peroksida (mek/kg)	0,27	0,22	0,43
Aktivitas antioksidan (%)	t. a.	81,51	93,00
Kadar vitamin E (%)	0,45	12,09	33,88
α -tokoferol	0,15	4,05	
α -tokotrienol	0,08	2,12	
δ -tokotrienol	0,13	3,51	
γ -tokotrienol	0,09	2,40	
Total tokotrienol	0,30	8,04	
Rendemen	t. a.	3,75*	50,25**

Keterangan :

t. a. = tidak dianalisis

*basis DALMS

** basis fraksi tidak tersabunkan

DALMS mengandung vitamin E yang cukup tinggi yaitu 0,45 g/100 g atau 4500 ppm. Nilai ini sangat tinggi dibandingkan sumber vitamin E yang lain seperti bekatul (300 ppm) (Xu *et al.*, 2001), biji-bijian dan berry dengan kisaran 84-318 dan 56-140 ppm (Kallio *et al.*, 2002), dan minyak zaitun (100-270 ppm) (Cunha *et al.*, 2006). Goh *et al.* (1985) menyatakan bahwa kandungan vitamin E pada DALMS berkisar antara 150–8,500 ppm.

Komposisi vitamin E dari DALMS adalah α -tokoferol 33,48%, α -tokotrienol 17,57%, δ -tokotrienol 29,06%, dan γ -tokotrienol 19,89%. Penelitian sebelumnya (Ahmadi, 1997) menunjukkan bahwa kadar tokoferol dalam DALMS adalah 1.509,91 mg/100 g setara dengan hasil penelitian ini yaitu 0,15 g/100 g atau 1,500 mg/kg. Tokotrienol merupakan komponen terbesar vitamin E DALMS yang jumlahnya mencapai 66,52%, dan sisanya adalah tokoferol dalam bentuk α -tokoferol sebanyak 33,48%. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu Musalmah *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa keunggulan DALMS adalah sebagian besar vitamin E dalam bentuk tokotrienol (70%) dan sisanya adalah tokoferol (30%).

Menurut Puah *et al.* (2007), komposisi vitamin E minyak sawit selama proses pemurnian adalah α -tokoferol (14–17%), α tokotrienol (22–24%), γ -tokotrienol (49–53%), δ -tokotrienol (6–7%) dan α -tokomonoenol (3%). Total tokotrienol dalam DALMS pada penelitian ini lebih rendah dari minyak sawit. Diduga proses pemanasan suhu tinggi pada deodorisasi menyebabkan tokotrienol mengalami kerusakan yang lebih intensif dibandingkan tokoferol. Dilihat dari struktur molekulnya, tokotrienol mempunyai ikatan rangkap pada rantai isoprenoid yang diduga menyebabkan tokotrienol lebih labil terhadap panas dibandingkan tokoferol. Jumlah asam lemak bebas dan peroksida pada DALMS tinggi karena DALMS merupakan hasil samping proses pemurnian minyak sawit pada tahapan deodorisasi.

Ahmadi (1997) mendapatkan bahwa bilangan peroksida 15,98 mek/kg dengan α -tokoferol 1,509,91 mg/kg. Bilangan peroksida yang rendah pada DALMS yang digunakan pada penelitian ini diduga disebabkan bahwa DALMS yang digunakan masih segar, walaupun sebagian produk hasil oksidasi menguap pada proses deodorisasi. Bilangan peroksida yang rendah menunjukkan bahwa tingkat oksidasi DALMS yang juga rendah.

Menurut Hui (1996), produk oksidasi selama proses pengolahan CPO hilang pada saat deodorisasi dan DALMS merupakan hasil samping deodorisasi. Produk oksidasi tidak terakumulasi dalam DALMS karena bersifat volatil sehingga tidak terekoveri pada saat distilasi menjadi DALMS. Distilat asam lemak minyak sawit yang akan digunakan pada kristalisasi pelarut suhu terlebih dahulu dilakukan saponifikasi. Fraksi tidak tersabunkan DALMS selanjutnya diambil untuk digunakan pada tahapan kristalisasi pelarut suhu rendah. Hasil analisis karakteristik fraksi tidak tersabunkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Bila dibandingkan DALMS dengan fraksi tidak tersabunkan dari DALMS, kadar asam lemak bebas yang menurun signifikan yaitu dari 95,75% menjadi 7,99%. Reaksi KOH dengan asam lemak bebas menghasilkan sabun sehingga mudah dipisahkan dari fraksi tidak tersabunkan. Hal ini menyebabkan jumlah asam lemak bebas pada fraksi tidak tersabunkan menjadi sangat menurun. Dibandingkan DALMS, kadar vitamin E fraksi tidak tersabunkan jauh lebih tinggi (Tabel 1). Proses saponifikasi menghasilkan fraksi tidak tersabunkan.

Menurut Mitei *et al.* (2009), komponen terbesar dari fraksi tidak tersabunkan adalah fitosterol dan vitamin E. Komposisi vitamin E fraksi tidak tersabunkan dan DALMS adalah sama. Tokotrienol mempunyai kadar yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol. Peningkatan kadar vitamin E fraksi tidak tersabunkan dari DALMS adalah 26,87 kali, yaitu dari 0,45 g/100 g pada DALMS menjadi 12,87 g/100 g pada fraksi tidak tersabunkan DALMS. Komponen lain yang ada dalam fraksi tidak tersabunkan DALMS selain asam lemak bebas adalah fitosterol, hidrokarbon, dan lilin (Hui, 1996). Aktivitas antioksidan fraksi tidak tersabunkan cukup tinggi yaitu 81,51%.

Hal ini menunjukkan fraksi tidak tersabunkan dari DALMS mengandung antioksidan yang cukup tinggi. Rendemen fraksi tidak tersabunkan dari DALMS sebesar 3,75%. Angka ini sudah tinggi karena menurut Hui (1996) kandungan fraksi tidak tersabunkan dari DALMS berkisar antara 1,6–3,7%. Hal ini menunjukkan bahwa saponifikasi yang dilakukan sudah

optimum karena dapat menghasilkan rendemen yang maksimum akan tetapi kadar asam lemak bebas masih cukup tinggi.

Kadar vitamin E pada fraksi kaya vitamin E

Nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan dan suhu merupakan faktor penting yang diduga mempengaruhi kristalisasi pelarut. Pelarut yang digunakan adalah heksana. Menurut Hartel (2001), faktor-faktor yang mempengaruhi kristalisasi adalah suhu kristalisasi, laju pendinginan, agitasi, nisbah pelarut:minyak, waktu kristalisasi, dan jenis pelarut. Kadar vitamin E pada fraksi kaya vitamin E merupakan parameter utama yang menentukan keberhasilan pengayaan fraksi tidak tersabunkan DALMS dengan vitamin terutama tokotrienol. Tokotrienol merupakan komponen yang ingin ditingkatkan sehingga pemilihan suhu mempertimbangkan tingkat pengayaan tokotrienol. Menurut Anonymous (2007), tokoferol mempunyai titik leleh 2,5–3,5°C. Diduga titik leleh tokotrienol karena bersifat tidak jenuh pada rantai isoprenoid (tiga ikatan rangkap) atau farnesil dan mempunyai titik leleh yang lebih rendah dari vitamin E. Oleh karena itu taraf faktor suhu yang dikaji pada penelitian ini adalah -20, -10, dan 0°C.

Nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan merupakan parameter yang mempengaruhi viskositas larutan. Viskositas larutan pada proses kristalisasi pelarut mempengaruhi transfer massa dan transfer panas. Menurut Hartel (2001), pertumbuhan kristal dipengaruhi oleh pindah massa dan pindah panas. Pertumbuhan kristal berkaitan dengan viskositas cairan induk. Viskositas cairan dipengaruhi oleh nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan. Jika viskositas tinggi, pindah massa dari cairan induk ke inti kristal, dan pindah panas dari kristal ke sistem pendingin akan terhambat. Akibatnya ukuran kristal yang terbentuk tidak optimum sehingga proses separasi menjadi tidak sempurna.

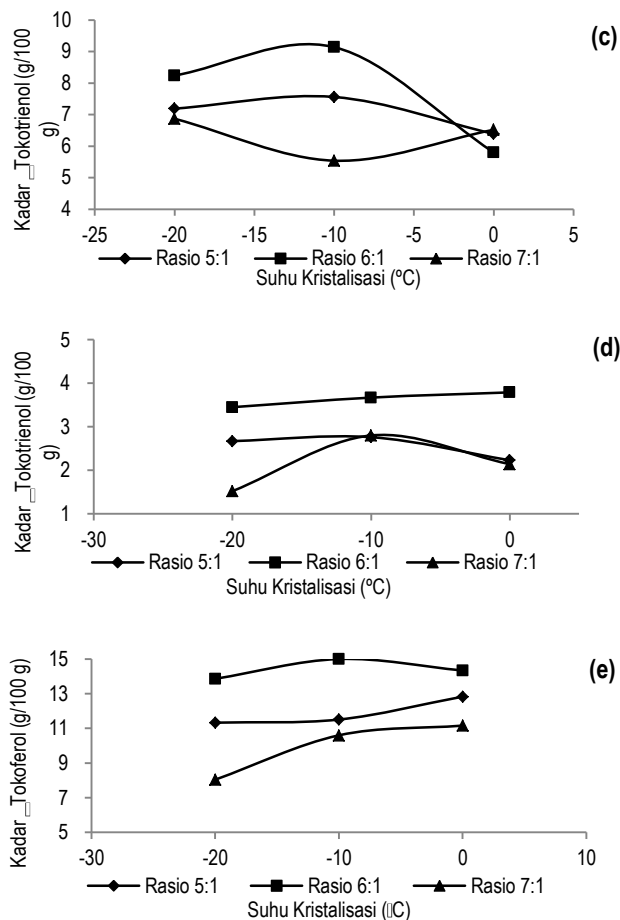
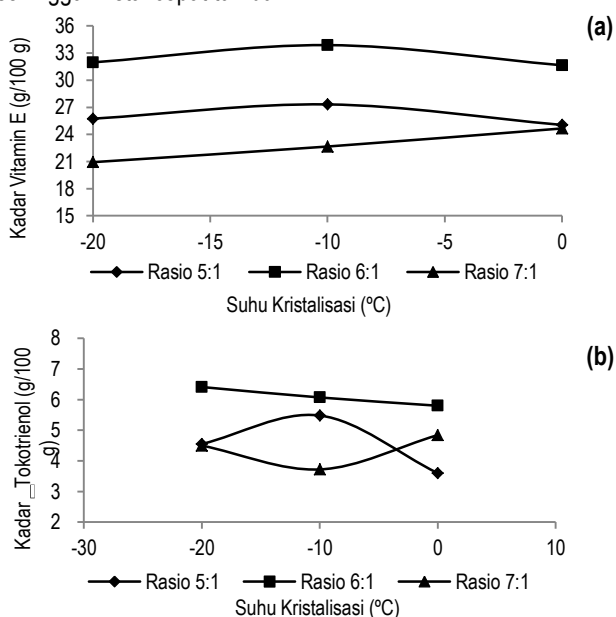
Larutan yang encer akan mudah mentransfer massa dan panas/energi yang diambil dari bahan. Akan tetapi, jika viskositas terlalu encer akan menyulitkan proses rekovery fraksi yang tidak mengkristal. Faktor yang mempengaruhi kadar vitamin E akibat perubahan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan yang berbeda adalah viskositas sistem. Krishnamurthy dan Kellens (1995) menyatakan bahwa kemampuan sistem untuk memulai pembentukan inti kristal berbanding terbalik dengan besarnya viskositas. Pada nisbah yang lebih kecil yaitu 5:1 diduga viskositas masih terlalu tinggi sehingga ruang gerak molekul terbatas yang menyebabkan proses pindah panas dan pindah massa akan terhambat. Akibatnya proses kristalisasi komponen-komponen non vitamin E tidak dapat berlangsung dengan baik. Peningkatan kadar vitamin E sampai nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1 diduga disebabkan oleh semakin rendahnya viskositas sistem. Nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5:1 mempunyai viskositas tertinggi. Pada kondisi ini viskositas terlalu tinggi sehingga menghambat pembentukan inti kristal dan pertumbuhan kristal. Peningkatan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1 mengakibatkan viskositas sistem menurun. Proses pindah panas dan pindah massa dapat berjalan lebih baik. Selain itu pembentukan inti kristal menjadi efisien untuk menyeleksi jenis asam lemak yang akan dipisahkan. Proses kristalisasi komponen-komponen non

vitamin E dapat berlangsung lebih sempurna sehingga kadar vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E meningkat.

Dari Gambar 1 diketahui bahwa kadar vitamin E paling tinggi dihasilkan pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1. Peningkatan kadar vitamin E sampai nisbah pelarut:minyak 6:1 berkaitan erat dengan viskositas sistem. Krishnamurthy dan Kellens (1995) menyatakan bahwa kemampuan sistem untuk memulai pembentukan inti kristal berbanding terbalik dengan besarnya viskositas. Ada kecenderungan bahwa semakin tinggi nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan, kadar vitamin E mengalami peningkatan. Peningkatan terjadi sampai nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1, peningkatan nisbah lebih lanjut mengakibatkan penurunan kadar vitamin E. Fenomena yang sama pernah dilaporkan oleh Ahmadi (2006) bahwa hubungan antara kadar asam lemak ω -3 dengan nisbah pelarut:minyak bersifat kuadratik. Artinya, kadar asam lemak ω -3 meningkat sampai nisbah pelarut:minyak 5,94:1 dan peningkatan nisbah pelarut minyak tidak menyebabkan peningkatan kadar asam lemak ω -3.

Penggunaan teknik kristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan fraksi kaya vitamin E didasarkan pada perbedaan titik beku antara masing-masing fraksi tidak tersabunkan dalam DALMS. Menurut Pan *et al.* (2005) fitosterol dalam distilat *deodorizer* minyak jarak dapat dipisahkan dari vitamin E dengan kristalisasi pada suhu -8°C . Tokoferol dan tokotrienol dapat dipisahkan dengan perlakuan suhu karena keduanya mempunyai perbedaan kejenuhan. Menurut Heinemann *et al.* (2008), rantai samping tokoferol bersifat jenuh sedangkan tokotrienol bersifat tidak jenuh. Perbedaan ketidakjenuhan tersebut berdampak pada perbedaan titik beku.

Suhu kristalisasi sangat menentukan keberhasilan pembentukan kristal. Laju pendinginan berkaitan dengan pembentukan inti kristal dan pertumbuhan kristal. Pendinginan yang cepat menyebabkan inti kristal banyak terbentuk dan laju pertumbuhan kristal lebih cepat. Laju pendinginan yang tinggi karena suhu yang rendah menyebabkan pindah panas cepat sehingga kristal cepat tumbuh.



Gambar 1. Pengaruh nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan dan suhu kristalisasi terhadap kadar vitamin E (a), α -tokotrienol (b), δ -tokotrienol (c), γ -tokotrienol (d), dan α -tokoferol (e) fraksi kaya vitamin E dari DALM

Hartel (2001) menyatakan bahwa suhu yang terlalu tinggi menyebabkan proses transfer panas dari sistem ke lingkungan tidak maksimum. Akibatnya inti kristal yang terbentuk terbatas, dan transfer massa pada inti kristal yang terbentuk menjadi terbatas pula akibat transfer energi yang belum maksimum. Kristal yang terbentuk menjadi belum maksimum sehingga senyawa-senyawa bukan vitamin E seperti sterol masih banyak yang terlarut didalam pelarut. Sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan pembentukan inti Kristal yang banyak. Inti kristal yang banyak pada proses pertumbuhannya memerlukan massa dari sistem. Transfer massa pada inti kristal menyebabkan pertumbuhan kristal.

Selama pertumbuhan kristal, senyawa-senyawa dengan kelarutan rendah akibat berada dibawah titik lelehnya akan bermigrasi pada inti kristal dan mengkristal. Akibatnya pada suhu -20°C , sebagian vitamin E ikut mengkristal karena diduga berada dibawah titik lelehnya yang mengakibatkan kadar vitamin E pada suhu -20°C untuk nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5:1 dan 6:1 mengalami penurunan.

Fenomena berbeda terjadi pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 7:1. Pada kondisi ini, sistem sangat encer sehingga inti kristal sangat banyak. Komponen-komponen non

vitamin banyak yang mengkristal sehingga kadar vitamin E masih mengalami peningkatan. Hasil analisis parameter vitamin E menunjukkan bahwa kadar vitamin E terbaik diperoleh pada kombinasi perlakuan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan DALMS (6:1) dengan suhu kristalisasi -10°C .

Kadar masing-masing jenis isomer vitamin E berbeda-beda bergantung pada komposisinya pada fraksi tidak tersabunkan (Tabel 1). Pengaruh nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan dan suhu kristalisasi mengakibatkan pola perubahan kadar masing-masing jenis isomer vitamin E berbeda-beda. Tokoferol dan tokotrienol mempunyai struktur pada rantai samping, yaitu rantai samping fitil bersifat jenuh pada tokoferol dan rantai farnesil yang tidak jenuh pada tokotrienol.

Masing-masing isomer tokotrienol mempunyai perbedaan struktur pada cincin kromanol (Gambar 1). Kemungkinan perbedaan gugus R yang terikat pada cincin kromanol (gugus metil atau atom hidrogen) mempengaruhi titik lelehnya. Ada kecenderungan kadar tokotrienol mengalami penurunan dengan menurunnya suhu. Sebaliknya dengan kadar tokoferol yang cenderung meningkat dengan peningkatan suhu.

Komposisi vitamin E pada fraksi kaya vitamin E

Jenis-jenis isomer vitamin E yang terdeteksi dalam fraksi kaya vitamin E dari DALMS adalah α -tokoferol serta α -, δ -, dan γ -tokotrienol. Pada DALMS, fraksi tidak tersabunkan, dan fraksi kaya vitamin E tidak ditemukan δ -, β -, dan γ -tokoferol, serta β -tokotrienol. Tabel 2 menunjukkan bahwa komposisi komponen penyusun vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E dipengaruhi oleh suhu kristalisasi dan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan. Kadar tokotrienol dalam fraksi kaya vitamin E yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan tokoferol. Persentase tokotrienol lebih dari 50%, kecuali untuk perlakuan suhu kristalisasi 0°C dan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5:1. Kadar tokotrienol dalam fraksi tidak tersabunkan adalah 66,50% sedangkan dalam DALMS adalah 66,67%. Kadar tokotrienol dalam fraksi kaya vitamin E berkisar 48-62% (Tabel 2).

Kadar total tokotrienol (α -, δ -, dan γ -tokotrienol) mengalami peningkatan dengan semakin meningkatnya nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan (Tabel 2). Peningkatan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan menyebabkan sistem mempunyai viskositas yang semakin rendah. Hal ini mengakibatkan transfer energi dari sistem ke lingkungan semakin efisien. Akibatnya, energi kinetik molekul-molekul yang ada dalam sistem menjadi berkurang dan cenderung bermigrasi menuju inti kristal yang terbentuk. Demikian pula transfer massa akan semakin efisien sehingga kristal dapat tumbuh dengan baik.

Akibatnya sebagian komponen non vitamin E yang mempunyai titik leleh yang lebih tinggi mengkristal. Hal ini yang menyebabkan peningkatan kadar vitamin E dengan meningkatnya nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan. Akan tetapi, peningkatan kadar vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E tidak menyebabkan peningkatan proporsi tokotrienol. Proporsi tokotrienol dalam fraksi kaya vitamin E (48-62%) mengalami penurunan jika dibandingkan fraksi tidak tersabunkan (66,50%). Kemungkinan, suhu dan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan yang digunakan pada penelitian ini mengakibatkan tokoferol masih ada dalam filtrat dan belum dapat dipisahkan dengan baik dengan tokotrienol.

Tabel 2. Komposisi vitamin E pada fraksi kaya vitamin E pada berbagai suhu dan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan

Perlakuan		Jenis Vitamin E (%)				
Suhu	Nisbah Pelarut:FTT	δ -T3	α -T3	γ -T3	α -T	Total T3
-20°C	5:1	27,93	17,68	10,36	44,04	55,97
	6:1	25,78	20,06	10,80	43,37	56,64
	7:1	32,81	21,51	7,28	38,40	61,60
-10°C	5:1	27,68	20,07	10,10	42,15	57,85
	6:1	26,99	17,91	10,83	44,27	55,73
	7:1	24,43	16,43	12,35	46,79	53,22
0°C	5:1	25,51	14,37	8,90	51,21	48,79
	6:1	24,41	18,31	11,98	45,31	54,69
	7:1	26,45	19,63	8,66	45,26	54,74

Keterangan:

FTT = Fraksi Tidak Tersabunkan, T3=tokotrienol, T= tokoferol

Aktivitas antioksidan fraksi kaya vitamin E

Aktivitas biologi tokoferol atau vitamin E berkaitan erat dengan kemampuannya untuk menghambat peroksidasi dalam membran biologis (Qureshi *et al.*, 2000). Tokoferol merupakan antioksidan alami yang paling banyak digunakan. Senyawa ini berperan menghambat proses propagasi pada tahap auto-oksidasi radikal bebas dengan cara bereaksi dengan berbagai senyawa radikal bebas (Bandarra *et al.*, 1999). Aktivitas antioksidan α -tokoferol telah banyak diteliti, akan tetapi penelitian tentang kemampuan tokotrienol sebagai antioksidan masih terbatas (Qureshi *et al.*, 2000; Abidi, 2003).

Aktivitas antioksidan fraksi kaya vitamin E pada penelitian ini ditentukan dengan metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang mengukur kemampuan suatu senyawa antioksidan untuk menstabilkan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas DPPH. Dengan demikian, metode DPPH merupakan metode untuk mengukur aktivitas antioksidan primer. Vitamin E merupakan senyawa fenolik yang termasuk ke dalam antioksidan primer (Pokorny *et al.*, 2001) dan merupakan antioksidan yang larut dalam lemak (Abidi, 2003).

Vitamin E berperan sebagai antioksidan primer dengan cara mendonorkan atom H dari cincin kromanol ke senyawa peroksi radikal. Setelah mendonorkan atom H, tokoferol berubah menjadi tokoferil radikal. Hal ini yang menyebabkan beberapa senyawa, seperti fosfolipid, bersifat sinergis dengan vitamin E karena mampu meregenerasi tokoferil radikal menjadi tokoferol (Pokorny *et al.*, 2001).

Peningkatan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan (Gambar 3a). Aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1 dan 7:1, serta terendah pada nisbah 5:1. Jika dihubungkan dengan kadar vitamin E, kadar vitamin E pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 7:1 adalah yang terendah. Akan tetapi, aktivitas antioksidan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 7:1 adalah yang tertinggi. Hal ini diduga berkaitan dengan sifat vitamin E yang berubah menjadi prooksi dan pada konsentrasi tinggi. Semakin tinggi nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan, kadar vitamin E semakin meningkat dan pada konsentrasi yang digunakan pada pengujian menjadi bersifat prooksidan. Hal ini yang menyebabkan aktivitas antioksidan menurun. Menurut Frankel (1998) vitamin E pada konsentrasi tinggi bersifat sebagai prooksidan karena meregenerasi radikal peroksi dengan reaksi kebalikan.

Aktivitas antioksidan meningkat sampai suhu -10°C dibandingkan 0°C , dan penurunan suhu lebih lanjut menyebabkan aktivitas antioksidan menurun. Fenomena yang sama terjadi pada kadar vitamin E pada fraksi kaya vitamin E, yaitu kadar vitamin E meningkat pada suhu -10°C dan menurun pada suhu -20°C . Perubahan aktivitas antioksidan sebagai pengaruh suhu kristalisasi berkaitan erat dengan kadar vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E.

Masing-masing jenis tokotrienol mempunyai aktivitas antioksidan yang berbeda. Menurut Qureshi *et al.* (2000) kemampuan antioksidatif δ -tokotrienol $>$ γ -tokotrienol $>$ α -tokotrienol. Suzuki *et al.* (1993) sebelumnya menunjukkan bahwa kemampuan antioksidan γ -tokotrienol lebih baik dibandingkan α tokotrienol. Alfa (α)-tokotrienol mempunyai kemampuan antioksidan yang sama dengan α -tokoferol (Schroeder *et al.*, 2006). Alfa (α)-tokotrienol dan α -tokoferol merupakan vitamin E yang mempunyai cincin kromanol yang sama tetapi mempunyai perbedaan pada rantai sampai hidrokarbon. Akan tetapi menurut Suzuki *et al.* (1993), α tokotrienol mempunyai potensi melindungi terhadap radikal bebas yang menginduksi stress oksidatif lebih baik dibandingkan α -tokoferol.

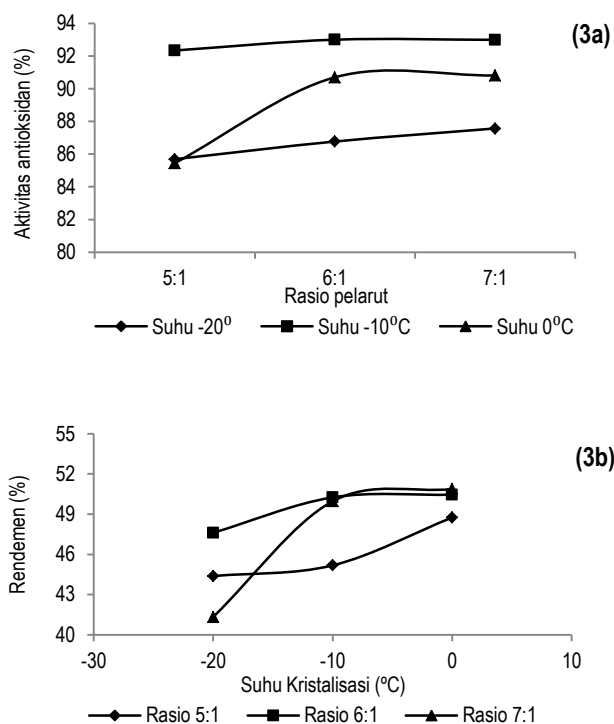
Rendemen

Rendemen fraksi kaya vitamin E diukur sebagai persentase berat fraksi kaya vitamin E dibandingkan berat fraksi tidak tersabunkan DALMS. Rendemen yang dihasilkan berkisar antara 41,33-50,87% (Gambar 3b) dengan rendemen fraksi tidak tersabunkan dibandingkan DALMS adalah 3,75%.

Rendemen semakin menurun dengan menurunnya suhu kristalisasi. Penurunan suhu menyebabkan proses kristalisasi semakin efisien karena kecepatan penurunan suhu yang meningkat. Menurut Hartel (2001), kecepatan penurunan suhu mempengaruhi pembentukan inti kristal, yaitu semakin rendah suhu kecepatan penurunan suhu semakin meningkat. Akibatnya inti kristal yang terbentuk semakin banyak. Inti yang banyak memfasilitasi massa dalam fase cair untuk bermigrasi secara cepat pada inti kristal. Akibatnya sebagian besar massa dalam fase cair yang mempunyai kemampuan untuk mengkristal, mengalami proses kristalisasi. Akibatnya massa dalam fase cair mengalami penurunan sehingga rendemen yang dihasilkan menurun.

Peningkatan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan dari 5:1 menjadi 6:1 mengakibatkan peningkatan rendemen yang dihasilkan. Peningkatan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan lebih lanjut menyebabkan rendemen menurun. Peningkatan rendemen dari nisbah 5:1 menjadi 6:1 disebabkan peningkatan kadar vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E yang dihasilkan. Faktor yang mempengaruhi kadar vitamin E akibat perubahan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan yang berbeda adalah viskositas sistem. Krishnamurthy dan Kellens (1995) menyatakan bahwa kemampuan sistem untuk memulai pembentukan inti kristal berbanding terbalik dengan besarnya viskositas. Pada nisbah yang lebih kecil yaitu 5:1 diduga viskositas masih terlalu tinggi sehingga ruang gerak molekul terbatas yang menyebabkan proses pindah panas dan pindah massa akan

terhambat. Akibatnya proses kristalisasi komponen-komponen non vitamin E tidak dapat berlangsung dengan baik.



Gambar 3. Grafik hubungan aktivitas antiksidan (a) dan rendemen (b) dengan suhu kristalisasi dan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan

Peningkatan rendemen sampai nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1 diduga disebabkan oleh semakin rendahnya viskositas sistem. Nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5:1 mempunyai viskositas tertinggi. Pada kondisi ini viskositas terlalu tinggi sehingga menghambat pembentukan inti kristal dan pertumbuhan kristal. Viskositas yang tinggi menunjukkan terdapat banyak molekul di dalam sistem yang mengakibatkan pergerakan molekul dan pindah panas terbatas. Akibatnya penggabungan molekul untuk membentuk struktur kristalin yang teratur menjadi terhambat. Peningkatan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1 mengakibatkan viskositas sistem menurun. Proses pindah panas dan pindah massa dapat berjalan lebih baik. Selain itu pembentukan inti kristal menjadi efisien untuk menyeleksi jenis asam lemak yang akan dipisah-kan.

Proses kristalisasi komponen-komponen dapat berlangsung lebih sempurna sehingga rendemen fraksi kaya vitamin E meningkat. Viskositas sistem yang rendah pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 7:1 mengakibatkan pindah panas dan pindah massa dari minyak cair ke kristal menjadi lebih tinggi sehingga inti kristal yang terbentuk dalam sistem menjadi lebih banyak. Fenomena ini diduga menyebabkan sebagian besar massa dalam fase cair ikut mengkristal sehingga rendemen fraksi kaya vitamin E menurun.

KESIMPULAN

Distilat asam lemak minyak sawit merupakan sumber yang potensial untuk dikembangkan sebagai sumber vitamin E alami yang mengandung tokotrienol tinggi. Saponifikasi meningkatkan kadar vitamin E dalam fraksi tidak tersabunkan. Kristalisasi pelarut suhu rendah fraksi tidak tersabunkan dapat meningkatkan kadar vitamin E sehingga dihasilkan fraksi kaya vitamin E dengan kadar vitamin E tertinggi dalam fraksi kaya vitamin E mencapai 33,88% dari berbagai nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan dan suhu kristalisasi yang dikaji. Suhu dan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan mempengaruhi pengayaan vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E. Peningkatan kadar vitamin E dalam fraksi kaya vitamin E menyebabkan aktivitas antioksidan meningkat jika dibandingkan fraksi tidak tersabunkan. Kristalisasi pelarut suhu rendah menggunakan heksana pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 6:1 dan suhu -10°C memberikan hasil terbaik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DP2M) – Dikti–Kemendiknas atas dana Penelitian Hibah Bersaing (PHB) Tahun 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidi SL. 2003. Tocol-derived minor constituents in selected plant seed oils. *J Amer Oil Chem* 80(4): 327-333.
- Ahmadi K. 1997. Aktivasi Zeolit Alam dan Penggunaannya untuk Pemurnian Tokoferol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit. Thesis. Program Pascasarjana – UGM, Yogyakarta.
- Ahmadi K. 2006. Optimasi kristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan minyak kaya asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *Agritek* 14(3): 580-593.
- Anonymous. 2007. Tocotrienol. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tocotrienol>. [13 Januari 2007].
- [AOCS] Association of Official Analytical Chemist. 1989. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemistry Society. 4th ed. Broadmaker Drive, Champaign, Illinois.
- Bandarra NM, Campos RM, Batista I, Nunes ML, Empis JM. 1999. Antioxidant synergy of alpha-tocopherol and phospholipids. *J Amer Oil Chem Soc* 76(8): 905-913.
- Chu BS, Baharin BS, Man YB, Quek SY. 2004. Separation of vitamin E from palm fatty acid distillate using silica: I Equilibrium of batch adsorption. *J Food Eng* 62(1): 97-103.
- Chu BS, Baharin YB, Man C, Quek SY. 2005. Comparison of selected adsorbents for adsorption and desorption of vitamin E from palm fatty acid distillate. *J of Food Lipids* 12(1): 23.
- Cunha SC, Amaral JS, Fernandez JO, Oliviera MBPP. 2006. Quantification of tocopherol and tocotrienols in potugues olive oils using HPLC with three different detection systems. *J Agric Food Chem* 54: 3351-3356.
- Ekonomi dan Bisnis. 2007. Kenaikan pungutan ekspor CPO tak efektif. [31 Oktober 2007].
- Frankel EN. 1998. Lipid Oxidation. The Oily Press. Dundee-Scotland.
- Gapoor A, Hassan WHW, Sulong M. 2002. Phytochemical for nutraceutical from the by product of palm oil refining. *Palm Oil Development* 36: 13-19.
- Goh SH, Gee PT. 1985. Noncarotenoids hydrocarbon in palm oil and palm fatty acid distillate. *J Amer Oil Chem Soc* 63(2): 226-230.
- Hartel RW. 2001. Crystallization in Foods. A Wolters Kluwer Co., USA.
- Heinemann RJB, Xu Z, Godber JS, Lanfer-Marquez UM. 2008. Tocopherols, tocotrienols, and γ oryzanol content in Japonica and Indica subspecies of rice cultivated in Brazil. *Cereal Chem* 85(2): 243-247.
- Hoed VV, Depaemelaere G, Ayala JV. 2006. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. *J Amer Oil Chem Soc* 83(4):315-321.
- Hui YH. 1996. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. *Fifth ed.* (2) John Wiley & Son Inc., New York.
- Ibanez E, Benavides AMH, Senorans AFJ, Reglaro G. 2002. Concentration of sterols and tocopherols from olive oil with supercritical carbon dioxide. *J Amer Oil Chem Soc* 79:1255-1260.
- Kallio H, Yang B, Peippo P, Tahnoven R, Pan R. 2002. Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherol, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (*ssp. Sinensi and mongolica*) of sea buckthorn (*Hippopae 1rhamnoides*). *J Agric Food Chem* 50: 3004-3009.
- Kim OS. 2005. Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E vitamers fraction in rice bran. *J Food Sci* 70(3): 208-213.
- Krishnamurthy R, Kellens M. 1995. Fractionation and Winterization. In Y-H. Hui (ed.). Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products: Processing Technology. 5th ed. (4)A John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Lewis J. 2001. Process for the production of tocotrienol. US Patent 6: 838,104.
- Mitei JC, Ngila SO, Yeboah L, Schmidt WJ. 2009. Profiling of phytosterol, tocopherol, and tocotrienol in selected seed oils from botswana by GC-MS and HPLC. *J Amer Oil Chem Soc* 86(7): 617-625.
- Musalmah M, Nizam MY, Fairuz AH, Aini AHN, Azian AI, Gapor MT, Ngah WWZ. 2005. Comparative effects of palm vitamin E and α tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids* 40: 575-580.
- Nagao T, Hirota Y, Watanabe Y, Kobayashi T, Kishimoto N, Fujita T, Kitano M, Shimada Y. 2004. Recovery of sterol as fatty acid steryl esters from waste material after purification of tocopherols. *Lipids* 39(8): 784-794.

- Nesaretnam K, Ambra R, Selvaduray KR, Radhakrishnan A, Reimann K, Razak G, Virgali F. 2004. Tocotrienol-rich fraction from palm oil affects gene expression in tumor resulting from mcf-7 cell inoculation in athymic mice. *Lipids* 39: 459-467.
- Ng MH, Chao YM, Ma AH, Choah CH, Hashim MA. 2004. Separation vitamin E (tocopherol, tocotrienol, and tococomonoenal) in palm oil. *Lipids* 39: 1031-1035.
- Nielsen MM, Hansen A. 2008. Rapid high-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chem* 85(2): 248-251.
- Pan L, Shao P, Jiang S. 2005. Separation of phytosterol and synthesized vitamin E succinate from rapeseed oil deodorizer distillate. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal* 7. Manuscript FP 04 010. March, 2005.
- Park SR, Kim YH, Park HJ, Lee YS. 2007. Stability of tocopherols and tocotrienols extracted from unsaponifiable fraction of rice bran under various temperature and oxygen condition. <http://www.Cropscience.org.au/icsc2004/-poster/5/1/1/654park.htm>. [8 Maret 2007].
- Pitoyo. 1991. Pemisahan Tokoferol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit. Thesis. Program Pascasarjana – UGM, Yogyakarta.
- Pokorny J, Yanishlieva H, Gordon M. 2001. Antioxidant in Food: Practical Application. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.
- Puah CW, Choo YM, Ma AN, Chuah CH. 2007. The effect of physical refining on palm vitamin E (tocopherol, tocotrienol and tococomonoenal). *American J of App Sci* 4(6): 374-377.
- Qureshi AA, Mo H, Packer L, Peterson DM. 2000. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *J Agric Food Chem* 48: 3130-3140.
- Schroeder MT, Becker EM, Skibsted LH. 2006. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *J Agric Food Chem* 54: 3445-3453.
- Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L. 1993. Structural and dynamic membrane properties of. α . -tocopherol and. α . -tocotrienol: Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochem* 32(40): 10693-10699.
- Wali VB, Sylvester PW. 2007. Synergistic antiproliferative effects of γ gamma tocotrienol and statin treatment on mammary tumor cell. *Lipids* 42(12): 1113-1123.
- Wan J, Ziang W, Jiang B. 2008. Separation of individual tocopherol from soybean distillate by column chromatography. *J Amer Oil Chem Soc* 85: 331-338.
- Watanabe Y, Nagao T, Hirota Y, Kitano M, Shimada Y. 2004. Purification of tocopherols and phytosterols by two-step in situ enzymatic reaction. *J Amer Oil Chem Soc* 81(4): 339-345.
- XuZ, Hua N, Godber JS. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and oryzanol component from rice bran againsts cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine). *J Agric Food Chem* 49: 2077-2081.