

## OPTIMASI KONDISI KRISTALISASI PADA PEMBUATAN FRAKSI KAYA TOKOTRIENOL DARI DISTILAT ASAM LEMAK MINYAK SAWIT

Optimizing Crystallization Conditions for Obtaining Tocotrienol Enriched Fraction from Palm Fatty Acid Distillate

K.G.S. Ahmadi<sup>1</sup>, Teti Estiasih<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Universitas Tribhuwana Tungga Dewi, Jl. Telaga Warna, Tlogomas, Malang;

<sup>2</sup>Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang, 65145

Email: kgs.ahmadi@yahoo.com

### ABSTRAK

Distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) merupakan hasil samping pemurnian minyak sawit secara fisik pada tahapan deodorisasi. Distilat asam lemak minyak sawit merupakan sumber vitamin E yang sangat baik karena terdiri dari 70 % tokotrienol dan 30 % tokoferol. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi proses kristalisasi pelarut suhu untuk memperoleh fraksi kaya tokotrienol dari DALMS menggunakan metode permukaan respon. Faktor-faktor yang diujikan adalah nisbah fraksi tidak tersabunkan : pelarut ( $X_1$ ), suhu kristalisasi ( $X_2$ ), dan waktu kristalisasi ( $X_3$ ). Variabel respon (Y) tokotrienol total dalam fraksi kaya tokotrienol DALMS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DALMS mengandung 0,45 g/100 g atau 4500 ppm. Vitamin E terdiri dari  $\alpha$  tokoferol 33,48 %,  $\alpha$  tokotrienol 17,57 %,  $\delta$  tokotrienol 29,06 %, dan  $\gamma$  tokotrienol 19,89 %. Dibandingkan dengan DALMS, fraksi tidak tersabunkan mengandung lebih rendah asam lemak bebas 95,75 % pada DALMS 7,99 % pada fraksi tidak tersabunkan. Rendemen fraksi tidak tersabunkan dari proses saponifikasi DALMS sebesar 3,75 %. Hubungan nisbah fraksi tidak tersabunkan : pelarut ( $X_1$ ), suhu kristalisasi ( $X_2$ ), dan waktu kristalisasi ( $X_3$ ) terhadap fraksi kaya tokotrienol (Y) mengikuti persamaan kuadrat  $Y = 20,24746 X_1 - 0,28627 X_2 + 0,77099 X_3 + 0,005575 X_1 X_2 + 0,00545833 X_1 X_3 - 0,00213333 X_2 X_3 - 1,72362 X_1^2 - 0,015438 X_2^2 - 0,018297 X_3^2 - 47,44392$ . Kondisi kristalisasi optimum diperoleh pada nisbah fraksi tidak tersabunkan 5,89 : 1, suhu kristalisasi -9,7 °C, dan waktu kristalisasi 22,52 jam. Verifikasi pada kondisi optimum menunjukkan total tokotrienol pada fraksi tidak tersabunkan sebesar 21,813 g/100 g, aktivitas antioksidan 94,07 %, bilangan peroksida 0,86 mek/kg, dan asam lemak bebas 0,0913 %. Komposisi fraksi kaya tokotrienol adalah  $\delta$  tokotrienol 45,84 %,  $\gamma$  tokotrienol 31,55 %, dan  $\alpha$  tokotrienol 22,62 %.

**Kata kunci:** Distilat asam lemak minyak sawit, saponifikasi, fraksi tidak tersabunkan, tokotrienol, kristalisasi

### ABSTRACT

Palm fatty acid distillate (PFAD) is the by product of palm oil processing that produced by deodorization. PFAD is one of vitamin E sources. The excellence of PFAD as the source of vitamin E is that the most of vitamin E in the PFAD is tocotrienol (70 %) and the remaining was tocopherol (30 %). To date, there are limited sources of tocotrienol, therefore it is very important to explore PFAD as the source of tocotrienol. This research was objected to optimize low temperature solvent crystallization to obtain the highest tocotrienol content of PFAD fraction by using Response Surface Methodology. The tested factors were the ratio of solvent to unsaponifiable fraction ( $X_1$ ), crystallization temperature ( $X_2$ ), and time ( $X_3$ ). The optimized response was the total content of tocotrienol in tocotrienol enriched fraction of PFAD. The results showed that PFAD contained vitamin E content of 0.45 g/100 g or 4500 ppm. It was higher than other vitamin E sources. The vitamin E comprised of  $\alpha$  tocopherol of 33.48 %,  $\alpha$  tocotrienol of 17.57 %,  $\delta$  tocotrienol of 29.06 %, and  $\gamma$  tocotrienol of 19.89 %. Compared to PFAD, unsaponifiable fraction contained lower free fatty acid that was 95.75 % in PFAD and 7.99 % in unsaponifiable fraction. The yield of saponification to produce unsaponifiable fraction was 3.75 % (w/w). The relation of the ratio of solvent to unsaponifiable fraction ( $X_1$ ), and crystallization temperature ( $X_2$ ), and time ( $X_3$ ) in preparing fraction enriched with tocotrienol (Y) was explained by quadratic polynomial equation:  $Y = 22,24 - 0,36 X_1 + 0,047 X_2 - 0,64 X_3 + 0,056 X_1 X_2 + 0,065 X_1 X_3 - 0,26 X_2 X_3 - 1,72 X_1^2 - 1,54 X_2^2 - 2,63 X_3^2$  for coded variables or  $Y = 20,24746 X_1 - 0,28627 X_2 + 0,77099 X_3 + 0,005575 X_1 X_2 +$

$0,00545833 X_1 X_3 - 0,00213333 X_2 X_3 - 1,72362 X_1^2 - 0,015438 X_2^2 - 0,018297 X_3^2 - 47,44392$  for actual variables. The optimum crystallization condition were obtained at the ratio of solvent to unsaponifiable fraction of 5,89 : 1, crystallization temperature of -9,7 °C, and crystallization time of 22,52 hours. The verification of optimum condition showed that the total tocotrienol content of tocotrienol enriched fraction was 21.813 g/100 g, antioxidant activity of 94.07 %, peroxide value of 0.86 mek/kg, and free fatty acid content of 0.0913 %. The composition of tocotrienol enriched fraction was  $\delta$  tocotrienol of 45.84 %,  $\gamma$  tocotrienol of 31.55 %, and  $\alpha$  tocotrienol of 22.62 %.

**Keywords:** Palm fatty acid distillate, saponification, unsaponifiable fraction, tocotrienol, crystallization

## 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 dkk. (2005) menyatakan keunggulan DALMS adalah sebagian besar vitamin E dalam bentuk tokotrienol (70 %) dan sisanya adalah tokoferol (30 %). Tokotrienol merupakan fraksi vitamin E yang mempunyai efek terhadap kesehatan yang lebih baik dari tokoferol yaitu berfungsi sebagai antioksidan yang potensial, antikanker, modulasi imun, menurunkan kolesterol, dan melindungi sel otak dari proses neurodegradatif.

Minyak sawit merupakan sumber tokotrienol yang paling potensial dibandingkan sumber-sumber lain seperti bekatul (Qureshi dkk., 2000), biji anggur (Choi dan Lee, 2009), bekatul beras merah (Jang dan Xu, 2009), minyak zaitun (Cunha dkk., 2006), dan *sea buckthorn berry* (Kallio dkk., 2002). Sejauh ini sumber tokotrienol sangat terbatas, sehingga eksplorasi DALMS sebagai sumber tokotrienol sangat penting dilakukan.

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 dkk., 2004). Fraksi ini mengandung 86 % tokoferol yang ada dalam DALMS, tetapi kadar tokoferol pada fraksi ini masih rendah yaitu 27.909,23  $\mu\text{g/g}$  (Pitoyo, 1991). Pemurnian tokoferol dengan teknik adsorpsi menggunakan zeolit menunjukkan kemurnian tokoferol masih rendah (Ahmadi, 1997). Oleh karena itu perlu dikembangkan teknik lain untuk meningkatkan kadar vitamin E dari fraksi tidak tersabunkan DALMS.

Menurut Gapoor dkk. (2002) fitosterol dapat dipisahkan dari fraksi lain dalam DALMS melalui teknik kristalisasi. Demikian pula 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 (Anonim, 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. Waktu kristalisasi juga sangat menentukan jumlah vitamin E yang diperoleh.

Hasil penelitian Ahmadi (2006) faktor-faktor yang mempengaruhi kristalisasi pelarut suhu rendah adalah nisbah pelarut terhadap bahan yang akan dikristalkan, dan lama kristalisasi. Chen dan Ju (2001) menambahkan bahwa kristalisasi pelarut suhu rendah juga dipengaruhi oleh suhu kristalisasi. Untuk mendapatkan kondisi optimum kristalisasi dan mempertimbangkan interaksi antar faktor yang dikaji, pendekatan metodologi permukaan respon (*Response Surface Methodology*) merupakan pendekatan yang paling tepat, efisien, dan ekonomis.

Pada penelitian ini dilakukan proses optimasi kondisi kristalisasi pelarut suhu rendah untuk mendapatkan fraksi kaya tokotrienol dengan kadar tokotrienol optimum. Faktor yang dikaji pada penelitian ini adalah nisbah pelarut : fraksi tidak tersabunkan, suhu kristalisasi, dan waktu kristalisasi untuk memperoleh fraksi kaya tokotrienol dari DALMS.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah DALMS yang diambil dari industri pengolahan minyak goreng PT Salim Ivomas Pratama Surabaya. Standar vitamin E ( $\alpha$  tokoferol dan  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tokotrienol) dari Sigma Co., heksana, methanol, KOH, etanol, natrium klorida, kloroform, asam asetat, natrium tiosulfat, pati, KI, asam askorbat, HCl, KOH,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (p.a. dari Merck), heksana (teknis), gas nitrogen, kertas saring kasar, dan kertas saring Whatman No.1.

Peralatan yang digunakan meliputi perangkat HPLC (Shimadzu), corong pemisah, *freezer*, inkubator, *rotary evaporator* (Buchi), spektrofotometer (Spectronic), termometer digital, *water bath/oil bath*, peralatan gelas, *hot plate*, dan pengaduk magnet.

**Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini meliputi tahap saponifikasi dan kristalisasi pelarut. DALMS bahan baku penelitian ini dan fraksi tidak tersabunkan dari DLAMS dikarakterisasi meliputi kadar asam lemak bebas, bilangan peroksida, aktivitas antioksidan, kadar tokoferol dan tokotrienol, serta rendemen untuk fraksi tidak tersabunkan.

**Saponifikasi.** Saponifikasi dilakukan pada DALMS untuk memisahkan asam lemak bebas dengan fraksi tidak tersabunkan. DALMS sebanyak 100 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer 2000 ml bertutup karet. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 883 ml dan 5g asam askorbat. Erlenmeyer diberi gas N<sub>2</sub> selama 30 detik dan kemudian ditambahkan 50ml KOH 50% (b/v). Erlenmeyer dipanaskan dalam *waterbath* suhu 65°C selam 32 menit. Setelah pemanasan selesai, erlenmeyer didinginkan dan kemudian campuran reaksi dipindahkan pada corong pemisah. Sebanyak 1500 ml heksana dan 2000 ml akuades ditambahkan dan kemudian dikocok dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan air di bagian bawah mengandung fraksi tersabunkan dan lapisan heksana di bagian atas mengandung fraksi tidak tersabunkan. Heksana dihilangkan dari fraksi tidak tersabunkan dengan menggunakan evaporasi vakum. Fraksi tidak tersabunkan digunakan untuk proses kristalisasi pelarut.

**Kristalisasi pelarut suhu rendah.** Penentuan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan, suhu kristalisasi, dan waktu kristalisasi dilakukan sebagai berikut: 5 g fraksi tidak tersabunkan DALMS dilarutkan dalam pelarut heksana dengan nisbah pelarut: fraksi tidak tersabunkan tergantung perlakuan sesuai Tabel 1. Setelah kristalisasi, fase kristal dipisahkan dari filtrat dengan cara penyaringan. Pelarut dalam filtrat diuapkan dengan rotavapor sampai semua pelarut menguap.

**Rancangan percobaan.** Penentuan kondisi optimum proses kristalisasi pada pembuatan fraksi kaya tokotrienol menggunakan Metode Permukaan Respon. Tiga variabel bebas yang digunakan nisbah pelarut: fraksi tidak tersabunkan (X<sub>1</sub>), suhu kristalisasi (X<sub>2</sub>), dan lama kristalisasi (X<sub>3</sub>). Variabel terikat (Y) atau respon yang dioptimumkan adalah kadar tokotrienol. Rancangan yang digunakan adalah rancangan komposit pusat (Tabel 1).

Nilai  $\alpha$  pada penelitian ini adalah  $2^{k/4}$ , k adalah jumlah variabel bebas yaitu 3 maka nilai  $\alpha = 2^{3/4} = 1,682$ . Untuk mendapatkan ketelitian yang seragam maka ditetapkan banyaknya ulangan pada titik pusat sebanyak 6 kali.

Model permukaan respon ordo kedua untuk penelitian ini (k=3) dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \epsilon$$

Setelah model diperoleh dilakukan keterandalan (uji signifikansi) model dan uji masing-masing masing komponen regresi.

Analisis Metode Permukaan Respon menggunakan software design-expert versi 7.1.6. Stat-Ease Inc.

**Metode analisis.** Metode yang digunakan untuk menganalisis parameter yang dikaji pada penelitian ini meliputi: kadar  $\alpha$  tokoferol dan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  tokotrienol dengan HPLC (Nielsen dan Hansen, 2008), aktivitas antioksidan metode DPPH dan bilangan peroksida metode ferriklorida (Kim, 2005), kadar asam lemak bebas (AOCS, 1989), dan rendemen.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Karakteristik DALMS dan Fraksi Tidak Tersabunkan DALMS**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah distilat asam lemak minyak sawit (DALMS). DALMS merupakan hasil samping proses pemurnian minyak sawit secara fisik (*physical refining*). Komponen utama dalam DALMS adalah asam lemak bebas, dan DALMS mengandung komponen minor yang menguap pada proses deodorisasi. Menurut Hoed dkk. (2006), proses pemurnian secara fisik menyebabkan fitosterol dan tokotrienol teruapkan dan terkonsentrasi dalam distilat *deodorizer*.

DALMS mengandung vitamin E yang cukup tinggi yaitu 0,45 g/100 g atau 4500 ppm atau 4500 mg/kg. Nilai

Tabel 1. Rancangan komposit pusat untuk optimasi kondisi kristalisasi

Variabel bebas	Simbol		Tarf faktor kode				
	Asli	Kode	$-\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Nisbah pelarut : fraksi tidak tersabunkan	X <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>	4,318:1	5:1	6:1	7:1	7,682
Suhu kristalisasi (°C)	X <sub>2</sub>	x <sub>2</sub>	-26,82	-20	-10	0	6,82
Lama kristalisasi (jam)	X <sub>3</sub>	x <sub>3</sub>	3,816	12	24	36	44,184

ini sangat tinggi dibandingkan sumber vitamin E yang lain seperti bekatul (300 ppm) (Xu dkk., 2001), biji-bijian dan berry dengan kisaran 84-318 dan 56-140 ppm (Kallio dkk., 2002), dan minyak zaitun (100-270 ppm) (Cunha dkk., 2006). Menurut Goh dkk. (1985) kandungan vitamin E pada DALMS berkisar antara 150-8500 ppm.

Tabel 2. Karakteristik DALMS

No.	Karakteristik	Besaran
1.	Kadar asam lemak bebas (%)	95,75
2.	Bilangan peroksida (mek/kg)	0,27
3.	Kadar vitamin E (g/100g)	0,45
4.	$\alpha$ tokoferol (g/100g)	0,15
5.	$\alpha$ tokotrienol (g/100g)	0,08
6.	$\delta$ tokotrienol (g/100g)	0,13
7.	$\gamma$ tokotrienol (g/100g)	0,09
8.	Total tokotrienol (g/100g)	0,30

Komposisi vitamin E dari DALMS adalah  $\alpha$  tokoferol 33,48 %,  $\alpha$  tokotrienol 17,57 %,  $\delta$  tokotrienol 29,06 %, dan  $\gamma$  tokotrienol 19,89 %. Tokotrienol merupakan komponen terbesar vitamin E DALMS yang jumlahnya mencapai 66,52 %, dan sisanya adalah tokoferol dalam bentuk  $\alpha$  tokoferol sebanyak 33,48 %. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu Musalmah dkk. (2005) yang menyatakan bahwa keunggulan DALMS adalah sebagian besar vitamin E dalam bentuk tokotrienol (70 %) dan sisanya adalah tokoferol (30%).

Menurut Puah dkk. (2007), komposisi vitamin E minyak sawit selama proses pemurnian adalah  $\alpha$  tokoferol (14-17 %),  $\alpha$  tokotrienol (22-24 %),  $\gamma$  tokotrienol (49-53 %),  $\delta$  tokotrienol (6-7 %) dan  $\alpha$  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 phytol yang diduga menyebabkan tokotrienol lebih labil terhadap panas dibandingkan tokoferol.

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 3.

Tabel 3. Karakteristik fraksi tidak tersabunkan DALMS

No.	Karakteristik	Besaran
1.	Kadar asam lemak bebas (%)	7,99
2.	Bilangan peroksida (mek/kg)	0,22
3.	Aktivitas antioksidan (%)	81,51
4.	Kadar total vitamin E (g/100 g)	12,087
5.	a tokoferol (g/100 g)	4,047
6.	a tokotrienol (g/100 g)	2,124
7.	d tokotrienol (g/100 g)	3,512
8.	g tokotrienol (g/100 g)	2,404
9.	Total tokotrienol (g/100 g)	8,040
10.	Rendemen (%)	3,75

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 2 dan 3). Proses saponifikasi menghasilkan fraksi tidak tersabunkan. Menurut Mitei dkk. (2009), komponen terbesar dari fraksi tidak tersabunkan adalah fitosterol dan vitamin E. Tokotrienol mempunyai kadar yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol. Peningkatan kadar vitamin E fraksi tidak tersabunkan dari DALMS adalah 26,86 kali, yaitu dari 0,45 g/100 g pada DALMS menjadi 12,87 g/100 g pada fraksi tidak tersabunkan DALMS.

Aktivitas antioksidan fraksi tidak tersabunkan cukup tinggi yaitu 81,51 %. Hal ini menunjukkan fraksi tidak tersabunkan dari DALMS mengandung antioksidan yang cukup tinggi. DALMS mengandung asam lemak bebas, aldehida dan keton, pigmen karotenoid terdegradasi, sterol, hidrokarbon, tokoferol, dan tokotrienol (Hui, 1992). Komponen lain dalam DALMS adalah komponen hasil degradasi seperti alkena (dari asam lemak atau gliserida), hidrokarbon aromatis (dari karoten), dan hidrokarbon diterpena (dari tokotrienol) Proses saponifikasi menghasilkan fraksi tidak tersabunkan yang terdiri dari aldehida dan keton, karotenoid, sterol, hidrokarbon, tokoferol dan tokotrienol. Menurut Hodgson (1995), proses penyabunan menyebabkan asam lemak dan gliserida tersabunkan. Komponen lain yang tidak tersabunkan adalah vitamin E, lilin, hidrokarbon, dan sterol. Sterol dalam minyak sawit terdiri dari kampesterol, stigmasterol, dan  $\beta$  sitosterol. Menurut Bradford dan Awad (2007), sterol dari minyak sawit bersifat sebagai antikanker.

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 %. Ini menunjukkan bahwa saponifikasi yang dilakukan sudah optimum karena dapat menghasilkan rendemen yang maksimum akan tetapi kadar asam lemak bebas masih cukup tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan jumlah KOH yang dibutuhkan masih kurang sehingga masih ada asam lemak bebas yang tidak tersaponifikasi. Akan tetapi, saponifikasi telah cukup mendapatkan fraksi tidak tersabunkan untuk diproses menjadi konsentrat vitamin E.

**Optimasi Kondisi Kristalisasi untuk Menghasilkan Fraksi Kaya Tokotrienol dari DALMS**

Rancangan percobaan merupakan pendekatan sistematis yang memungkinkan sejumlah variabel dipelajari secara simultan. Rancangan percobaan yang baik dapat menghemat waktu dan biaya. Penelitian satu faktor-satu waktu tidak mencerminkan perubahan yang sebenarnya karena mengabaikan interaksi antar faktor yang terjadi secara simultan. Jika banyak faktor dan interaksinya mempengaruhi respon yang dikaji, RSM merupakan alat yang tepat untuk mengoptimalkan proses (Wanasundara dan Shahidi, 1999). Banyak penelitian optimasi yang telah menerapkan RSM termasuk proses kristalisasi urea (Wanasundara dan Sahidi, 1999; Liu dkk., 2006; Wu dkk., 2007). Optimasi dengan RSM lebih cepat dan lebih ekonomis dalam mengumpulkan data dibandingkan eksperimen satu variabel-satu waktu atau

rancangan faktorial (Liu dkk., 2006).

Menurut Wanasundara dan Shahidi (1999), rancangan komposit pusat merupakan metode yang tepat untuk menentukan model polinomial yang sesuai untuk menganalisis respon permukaan dari kombinasi multifaktor. Rancangan komposit pusat merupakan alat yang efektif untuk menurunkan jumlah kombinasi tanpa mengurangi validitas hasil (Montgomery, 2001).

Optimasi kondisi kristalisasi untuk menghasilkan fraksi kaya tokotrienol dilakukan dengan mengoptimalkan variabel yang mempengaruhi proses kristalisasi. Variabel kristalisasi yang dioptimumkan adalah nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan DALMS, suhu kristalisasi, dan lama kristalisasi. Variabel respon yang dimaksimalkan adalah kandungan tokotrienol yang dihasilkan dari proses kristalisasi. Tabel 4 menyajikan hasil analisis respon kadar tokotrienol dalam fraksi kaya tokotrienol yang diperoleh.

Metode permukaan respon digunakan untuk menentukan model yang sesuai. Model yang dievaluasi mencakup linear, 2FI (interaksi), kuadratik, atau kubik. Menurut Chen dkk. (2005), analisis model digunakan untuk menentukan model yang sesuai dalam metode permukaan respon.

Proses pemilihan model dilakukan berdasarkan: uraian jumlah kuadrat (JK) dari urutan model (*sequential model sum of square*), uji simpangan model (*lack of fit test*), dan ringkasan model secara statistik (*model summary statistics*).

Tabel 4. Hasil analisis respon kadar tokotrienol setelah kristalisasi

No.	Variabel bebas asli			Variabel bebas kode			Tokotrienol (g/100 g)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> (°C)	X <sub>3</sub> (jam)	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	
1.	5:1	-20	12	-1	-1	-1	18,315
2.	5:1	-20	36	-1	-1	1	18,281
3.	5:1	0	12	-1	1	-1	19,136
4.	5:1	0	36	-1	1	1	17,409
5.	7:1	-20	12	1	-1	-1	17,390
6.	7:1	-20	36	1	-1	1	16,949
7.	7:1	0	12	1	1	-1	17,765
8.	7:1	0	36	1	1	1	16,969
9.	6:1	-10	24	0	0	0	20,256
10.	6:1	-10	24	0	0	0	21,995
11.	6:1	-10	24	0	0	0	22,584
12.	6:1	-10	24	0	0	0	23,029
13.	6:1	-10	24	0	0	0	24,475
14.	6:1	-10	24	0	0	0	21,788
15.	4,318:1	-10	24	-1,682	0	0	15,580
16.	7,682:1	-10	24	1,682	0	0	15,070
17.	6:1	-26,820	24	0	-1,682	0	15,743
18.	6:1	6,820	24	0	1,682	0	15,924
19.	6:1	-10	3,816	0	0	-1,682	14,447
20.	6:1	-10	44,184	0	0	1,682	11,049

Hasil analisis menggunakan rancangan permukaan respon untuk menentukan model hubungan variabel bebas dengan variabel respon menggunakan software *Design Expert 7.1.6*.

Pemilihan model berdasarkan *sequential model sum of square* menunjukkan bahwa model yang signifikan adalah model kuadratik sedangkan kubik, model linear, dan 2FI (interaksi) tidak signifikan. Signifikansi ini dilihat dari nilai P (Prob>F) kurang dari 5 % (P<5 %). Menurut Chen dkk. (2005), model dengan nilai P (P>F) kurang dari 0,05 dinyatakan sebagai signifikan. Model yang dipilih adalah model polinomial dengan ordo tertinggi. Berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan *Design Expert* maka model yang terpilih adalah model kuadratik.

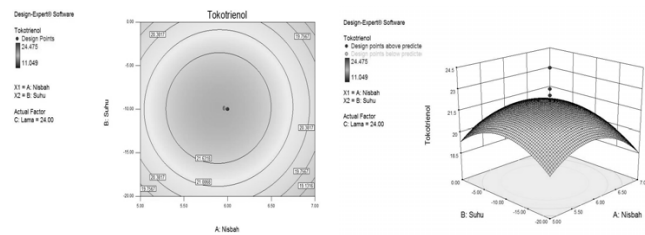
Persamaan kuadratik dalam variabel asli yang diperoleh adalah:

$$Y = 20,24746 X_1 - 0,28627 X_2 + 0,77099 X_3 + 0,005575 X_1 X_2 + 0,00545833 X_1 X_3 - 0,00213333 X_2 X_3 - 1,72362 X_1^2 - 0,015438 X_2^2 - 0,018297 X_3^2 - 47,44392$$

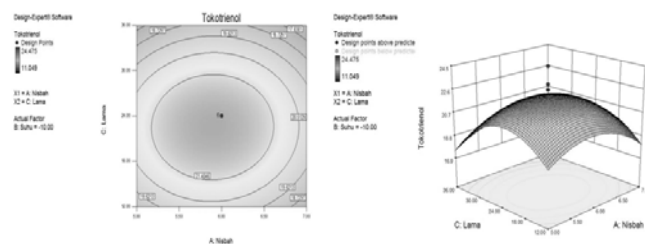
dengan  $X_1$  = nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan,  $X_2$  = suhu kristalisasi (°C),  $X_3$  = lama kristalisasi (jam).

Uji signifikansi (uji F) terhadap model menunjukkan bahwa model yang digunakan signifikan, artinya model yang digunakan dapat menjelaskan hubungan variabel bebas dengan variabel respon. Model hubungan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan, suhu kristalisasi, dan lama kristalisasi dengan kadar tokotrienol dapat pada kondisi optimum digambarkan dalam bentuk grafis seperti pada Gambar 1.

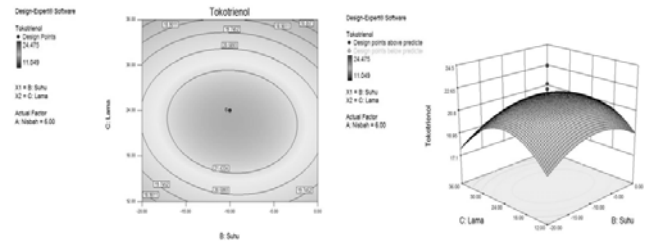
A



B



C



Gambar 1. Grafik permukaan respon: A. Pada titik tengah lama kristalisasi 24 jam; B. Pada titik tengah suhu -10 °C; C. Pada titik tengah nisbah 6:1

### Permukaan Respon dan Kondisi Optimum

Permukaan respon dari hubungan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan, suhu, dan lama kristalisasi terhadap jumlah fraksi kaya tokotrienol berbentuk maksimum dapat dilihat dari tanda minus (-) pada koefisien  $X_1^2$ ,  $X_2^2$ , dan  $X_3^2$ . Titik optimum dicapai pada nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5,89 : 1. Suhu kristalisasi -9,7 °C, dan lam kristalisasi 22,52 jam dengan fraksi kaya tokotrienol yang diperoleh sebesar 22,30 g/100 g.

Rasio pelarut : fraksi tidak tersabunkan merupakan parameter yang mempengaruhi viskositas larutan. Viskositas larutan pada proses kristalisasi pelarut mempengaruhi transfer massa dan transfer panas. Larutan yang encer akan mudah mentransfer massa dan panas/energy yang diambil dari bahan. Akan tetapi, jika viskositas terlalu encer akan menyulitkan proses rekovery fraksi yang tidak mengkristal. Peningkatan terjadi sampai rasio pelarut:fraksi tidak tersabunkan 5,89 : 1, peningkatan rasio lebih lanjut mengakibatkan penurunan fraksi kaya tokotrienol. Krishnamurthy dan Kellens (1995) menyatakan bahwa kemampuan sistem untuk memulai pembentukan inti kristal berbanding terbalik dengan besarnya viskositas. Pada rasio 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.

Viskositas sistem yang rendah pada rasio 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 tokotrienol ikut mengkristal sehingga kadarnya dalam fraksi kaya tokotrienol menurun.

Penggunaan teknik kristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan fraksi kaya tokotrienol didasarkan pada perbedaan titik beku antara masing-masing fraksi tidak tersabunkan dalam DALMS. 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 dkk. (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. Suhu 0°C masih terlalu tinggi sehingga 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 (-20 °C) menyebabkan pembentukan inti Kristal 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.

Lama kristalisasi merupakan faktor yang mempengaruhi pembentukan kristal. Pembentukan akan terus berlangsung sampai dicapai kesetimbangan. Kristal akan terus berkembang setelah intinya terbentuk dan selama sistem masih berada dalam kondisi lewat jenuh atau lewat dingin serta molekul-molekulnya masih memiliki mobilitas yang mencukupi untuk bergerak menuju antar muka kristal dan ke dalam kisi-kisinya (Hartel, 2001).

Seluruh proses kristalisasi dapat dibagi menjadi dua bagian yaitu nukleasi atau pembentukan inti dan pertumbuhan. Ketika inti kristal sudah terbentuk, kristal kemudian tumbuh (Gosh dan Bandyopadhyay, 2005). Beberapa faktor yang mempengaruhi kristalisasi adalah kecepatan pendinginan, suhu pendinginan, dan kondisi lewat jenuh sistem (Martini dan Anon, 2000; Martini dan Anon, 2003). Kesempurnaan pembentukan tercapai pada lama kristalisasi 22,52 jam.

### Verifikasi Kondisi Optimum

Verikasi pada kondisi optimum perlu dilakukan untuk mengetahui karakteristik setelah dilakukan kristalisasi. Kristalisasi fraksi tidak tersabunkan DALMS dilakukan pada kondisi optimum yaitu nisbah pelarut : fraksi tidak

tersabunkan 5,89 : 1, suhu kristalisasi -9,7 °C, dan lama kristalisasi 22,52 jam dengan kadar tokotrienol dalam fraksi kaya tokotrienol 22,297 g/100 g. Hasil pengamatan parameter pada kondisi optimum aktual disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Karakteristik konsentrat fraksi kaya tokotrienol pada kondisi optimum

Karakteristik	Besaran
Kadar tokotrienol (g/100 g)	21,813
Komposisi tokotrienol	
• δ tokotrienol (%)	45,835
• γ tokotrienol (%)	31,550
• α tokotrienol (%)	22,615
Aktivitas antioksidan (%)	94,07
Bilangan peroksida (mek/kg)	0,86
Asam lemak bebas (%)	0,0913

Kadar tokotrienol dalam fraksi kaya tokotrienol yang diperoleh pada kondisi optimum secara faktual sebesar 21,813 g/100 g sementara berdasarkan perhitungan sebesar 22,297 g/100 g, terdapat selisih 0,484 g/100 g. Bila dibandingkan dengan fraksi tidak tersabunkan maka terjadi pengayaan sebesar 1,805 kali. Peningkatan pengayaan ini karena pada kondisi optimum laju pembentukan kristal berjalan optimum yang merupakan senyawa pengotor (*impurities*) pada fraksi tidak tersabunkan DALMS. Komposisi tokotrienol dari konsentrat fraksi kaya tokotrienol terdiri dari 45,835 % δ tokotrienol, 31,550 % γ tokotrienol, dan 22,615 % α tokotrienol. Menurut Puah dkk. (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 %).

Rossi dkk. (2001) sebelumnya menyatakan bahwa total tokoferol dalam minyak sawit kasar adalah 1000 mg/kg, dengan γ tokotrienol sebagai komponen tokol utama diikuti oleh α tokoferol, α tokotrienol dan δ tokotrienol. Kadar tokoferol meningkat setelah pemucatan dengan asam. Perlakuan pemucatan dan pemurnian secara fisik mengubah proporsi komponen vitamin E, yaitu meningkatkan kadar α tokotrienol dalam minyak sawit murni. Selama proses pemurnian alkali vitamin E teruapkan dan kadarnya dalam minyak sawit murni menurun menjadi 356-630 mg/kg.

Aktivitas antioksidan pada fraksi kaya tokotrienol fraksi kaya tokotrienol tinggi, yaitu sebesar 94,07 %. Aktivitas antioksidan yang tinggi ini berhubungan kadar fraksi kaya tokotrienol yang tinggi. Tokotrienol bersama-sama tokoferol pada fraksi kaya tokotrienol bersifat sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan pada fraksi tidak tersabunkan sebesar 81,51 % sedangkan konsentrat yang dihasilkan setelah

kristalisasi pada kondisi optimum meningkat menjadi 94,07 %. Peningkatan aktivitas antioksidan ini disebabkan karena meningkatnya kemurnian setelah melalui proses kristalisasi.

## KESIMPULAN

Hubungan nisbah pelarut:fraksi tidak tersabunkan ( $X_1$ ), suhu kristalisasi ( $X_2$ ), dan lama kristalisasi ( $X_3$ ) untuk menghasilkan fraksi kaya tokotrienol (Y) dapat dijelaskan melalui persamaan:  $Y = 20,24746 X_1 - 0,28627 X_2 + 0,77099 X_3 + 0,005575 X_1 X_2 + 0,00545833 X_1 X_3 - 0,00213333 X_2 X_3 - 1,72362 X_1^2 - 0,015438 X_2^2 - 0,018297 X_3^2 - 47,44392$ . Kondisi kristalisasi optimum tercapai pada nisbah pelarut: fraksi tidak tersabunkan 5,89 : 1, suhu -9,7 °C, dan lama kristalisasi 22,52 jam. Verifikasi pada kondisi optimum diperoleh kadar vitamin E dalam fraksi tidak tersabunkan sebesar 21,813 g/100 g, aktivitas antioksidan 94,07 %, bilangan peroksida 0,86 mek/kg, dan asam lemak bebas 0,0913 %.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DP2M Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch IV tahun 2009 dengan kontrak Nomor: 644/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, tanggal 30 Juli 2009.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, K. (1997). *Aktivasi Zeolit Alam dan Penggunaannya untuk Pemurnian Tokoferol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit*. Thesis. Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ahmadi, K. (2006). Optimasi kristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan minyak kaya asam lemak  $\omega$ -3 dari hasil samping pengalengan ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *Agritek* **14**: 580-593.
- Anonim (2007). *Tocotrienol*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tocotrienol>. [13 Januari 2007].
- AOCS. (1989). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemistry Society*. 4<sup>th</sup> ed. Broadmaker Drive, Champaign, Illinois.
- Bradford, D. dan Awad, A.B. (2007). Phytosterol as anticancer dietary component: Evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition* **130**: 2127-2130.
- Chen, T.C. dan Ju, Y.H. (2001). Polyunsaturated fatty acids concentrates from borage and linseed oil fatty acids.

*Journal of the American Oil Chemical Society* **78**: 485-488.

- Chen, K.N, Chen, M.J., Liu, J.R., Lin, C.W. dan Chiu, H.Y. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science* **68**: 2717-2723.
- Choi, Y. dan Lee, J. (2009). Antioxidant dan antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry* **114**: 1386-1390.
- Cunha, S.C., Amaral, J.S., Fernandes, J.O. dan Oliveira, M.B.P. P. (2006). Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **54**: 3351-3356.
- Ekonomi dan Bisnis (2007). Kenaikan pungutan ekspor CPO tak efektif. Tanggal 31 Oktober 2007.
- Gapoor, A., Hassan W.H.W. dan Sulong, M. (2002). Phytochemical for nutraceutical from the by product of palm oil refining. *Palm Oil Development* **36**: 13-19.
- Gosh, M. dan Bandyopadhyay, S. (2005). Studies on crystal growth of rice bran wax in a hexane medium. *Journal of American Oil Chemical Society* **82**: 229-231.
- Goh, S.H., Choo, Y.M. dan Ong, S.H. (1985). Minor constituent of palm oil. *Journal of the American Oil Chemical Society* **62**: 237-240.
- Hartel, R.W. (2001). *Crystallization in Foods*. A Wolters Kluwer Co., USA.
- Heinemann, R.J.B., Xu, Z., Godber, J.S. dan Lanfer-Marquez, U.M. (2008). Tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$  oryzanol content in Japonica and Indica subspecies of rice cultivated in Brazil. *Cereal Chemistry* **85**: 243-247.
- Hodgson, A.S. (1995). Refining and bleaching. Dalam: Hui, Y.H. (ed.). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, hal 157-212. Fifth edn. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Hoed, V.V., Depaemelaere, G. dan Ayala, J.V. (2006). Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemical Society* **83**: 315-321.
- Hui, Y.H. (1992). *Encyclopedia of Food Science and Technology*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Hui, Y.H. (1996). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 5<sup>th</sup> edn. Vo. 2. John Wiley & Son Inc., New York.
- Jang, S. dan Xu, Z. (2009). Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **57**: 858-862.



- Kallio, H., Yang, B. dan Peippo, P. (2002). Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50**: 6136-6142.
- Kim, O.S. (2005). Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E vitamin fraction in rice bran. *Journal of Food Science* **70**: 208-213.
- Krishnamurthy, R. dan Kellens, M. (1995). Fractionation and winterization. Dalam: Hui, Y.H. (ed.). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 5<sup>th</sup> ed. Vol. 4. A John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Lewis, J. (2001). *Process for the Production of Tocotrienol*. US Patent 6,838,104.
- Liu, S., Zhang, C., Hong, P. dan Ji, H. (2006). Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: Optimization of process parameters. *Journal of Food Engineering* **73**: 203-209.
- Martini, S. dan Anon, M.C. (2000). Determination of wax concentration in sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemical Society* **77**: 1087-1092.
- Martini, S. dan Anon, M.C. (2003). Crystallization of sunflower oil waxes. *Journal of the American Oil Chemical Society* **80**: 525-532.
- Mitei, J., Ngila, C., Yeboah, S.O., Wessjohann, L. dan Schmidt, J. (2009). Profiling of phytosterol, tocopherol, and tocotrienol in selected seed oils from Botswana by GC-MS and HPLC. *Journal of the American Oil Chemical Society* **86** : 617-625.
- Montgomery, D.C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*. 5<sup>th</sup> edn. John Wiley & Sons, Singapore.
- Musalmah, M., Nizam, M.Y., Fairuz, A.H., Aini, A.H.N., Azian, A.I., Gapor, M.T. dan Wan-Ngah, W.Z. (2005). Comparative effects of palm vitamin E and  $\alpha$  tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids* **40**: 575-580.
- Nielsen, M.M. dan Hansen, A. (2008). Rapid high-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chemistry* **85**: 248-251.
- Pitoyo, (1991). *Pemisahan Tokoferol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit*. Thesis. Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Puah, C.W., Choo, Y.M., Ma, A.N. dan Chuah, C.H. (2007). The effect of physical refining on palm vitamin E (tocopherol, tocotrienol and tocotrienol). *American Journal of Applied Sciences* **4**: 374-377.
- Qureshi, A.A., Mo, H., Packer, L. dan Peterson, D.M. (2000). Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**: 3130-3140.
- Rossi, M., Giazzana, M., Alamprese, C. dan Stanga, F. (2001). The effect of bleaching and physical refining on color and minor components of palm oil. *Journal of the American Oil Chemical Society* **78**: 1051-1055.
- Wanasundara, U.N. dan Sahidi, F. (1999). Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal bubbler oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions. *Food Chemistry* **65**: 41-49.
- Watanabe, Y., Nagao, T., Hirota, Y. Kitano, M. dan Shimada, Y. (2004). Purification of tocopherols and phytosterols by two-step in situ enzymatic reaction. *Journal of the American Oil Chemical Society* **81**: 339-345.
- Wu, Y., Cui, S.W., Tang, J. dan Gu, X. (2007). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterulia seeds by response surface methodology. *Food Chemistry* **105**: 1599-1605.
- Xu, Z., Hua, N. dan Godber, J.S. (2001). Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienol and  $\gamma$ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropiomidine) dihydrochloride. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **49**: 2077-2081.