

**KAJIAN PERBANDINGAN PELARUT : DISTILAT ASAM LEMAK MINYAK
SAWIT (DALMS) DAN PENGGUNAAN PELARUT DAUR ULANG PADA
PROSES SAPONIFIKASI DALMS UNTUK MEMPEROLEH RENDEMEN
TERTINGGI**

Oleh :

**NISSA CLARA FIRSTA
NIM 176100100111009**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Magister Teknologi Pertanian

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

2021



**KAJIAN PERBANDINGAN PELARUT : DISTILAT ASAM LEMAK MINYAK
SAWIT (DALMS) DAN PENGGUNAAN PELARUT DAUR ULANG PADA
PROSES SAPONIFIKASI DALMS UNTUK MEMPEROLEH RENDEMEN
TERTINGGI**

Oleh :

**NISSA CLARA FIRTA
NIM 176100100111009**

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN



TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Magister Teknologi Pertanian Strata 2 (S2)**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
2021**




TESIS

Kajian Perbandingan Pelarut : Distilat Asam Lemak Minyak Sawit
(DALMS) dan Penggunaan Pelarut Daur Ulang Pada Proses Saponifikasi
DALMS untuk Memperoleh Rendemen Tertinggi

Oleh :
Nissa Clara Firsta

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal 12 Agustus 2021
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,


Erni Sofia Murtini, S.TP., M.P., Ph.D

Ketua


Prof. Dr. Teti Estiasih, S.TP., M.P

Anggota

Anggota

Malang,

Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Brawijaya

Dekan,




Prof. Dr. Ir. Inam Santoso, MP
NIP. 19681005 199512 1 001

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul Tesis : Kajian Perbandingan Pelarut : Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) dan Penggunaan Pelarut Daur Ulang Pada Proses Saponifikasi DALMS Untuk Memperoleh Rendemen Tertinggi

Nama Mahasiswa : Nissa Clara Firsta

NIM : 176100100111009

Jurusan : Magister Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Universitas : Brawijaya

TIM DOSEN PEMBIMBING

1. Pembimbing I : Erni Sofia Murtini, S.TP., M.P., Ph.D

2. Pembimbing II : Prof. Dr. Teti Estiasih, S.TP., M.P., Ph.D

TIM PENGUJI

1. Penguji I : Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, S.TP., M.P

2. Penguji II : Tunjung Mahatmanto, S.TP., M.Si., Ph.D

Tanggal Pengujian : 12 Agustus 2021



PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 10 Oktober 2021

Mahasiswa



Nama : Nissa Clara Firsta
NIM : 176100100111009
PS : Teknologi Hasil Pertanian
PPSFTPUB

NISSA CLARA FIRTA. 176100100111009. Kajian Perbandingan Pelarut : Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) dan Penggunaan Pelarut Daur Ulang Pada Proses Saponifikasi DALMS Untuk Memperoleh Rendemen Tertinggi. Tesis.

Pembimbing : Erni Sofia Murtini, STP., MP., Ph.D. dan Prof. Dr. Teti Estasih, STP., MP

RINGKASAN

Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) merupakan produk samping pemurnian fisik minyak sawit mentah yang terdiri dari asam lemak bebas, gliserida, serta bioaktif multikomponen seperti skualen, karoten, tokoferol dan tokotrienol, serta fitosterol. Bioaktif multikomponen dapat diperoleh dengan saponifikasi DALMS dan ekstraksi fraksi tidak tersabunkan (FTT). Pelarut yang digunakan pada saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS yaitu kombinasi etanol, heksana, dan akuades. Pelarut saponifikasi menggunakan etanol, sedangkan ekstraksi menggunakan heksana dan akuades. Tujuan penelitian adalah menentukan kondisi optimum proses saponifikasi dengan parameter variasi perbandingan pelarut : DALMS (Tahap 1) serta penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang (Tahap 2) dengan respon rendemen FTT. Rendemen tertinggi akan dilakukan analisa bioaktif meliputi Vitamin E (α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol), fitosterol (kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol), karotenoid (α -karoten dan β -karoten) serta skualen.

Penelitian terdiri dari penelitian pendahuluan dan dua tahap penelitian utama. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan interval atas dan bawah perbandingan etanol : DALMS (v/b), heksana : DALMS (v/b) dan akuades : DALMS (v/b) dengan respon rendemen. Hasil penelitian pendahuluan masing-masing pada perlakuan etanol 6:1 (v/b), perlakuan heksana perbandingan 8:1 (v/b), dan perlakuan akuades 12:1 (v/b) menghasilkan rendemen tertinggi, masing-masing (0,51%; 0,67%; 0,21%). Berdasarkan data tersebut, batas bawah dari masing-masing perbandingan pelarut yaitu etanol : DALMS 5:1 (v/b), heksana : DALMS 6:1 (v/b), dan akuades : DALMS 10: 1 (v/b). Batas atas untuk masing-masing pelarut : DALMS yaitu etanol : DALMS 7:1 (v/b), heksana : DALMS 10:1 (v/b), dan akuades : DALMS 14:1 (v/b). Batas bawah dan batas atas yang diperoleh kemudian digunakan pada penelitian tahap 1.

Penelitian tahap 1 bertujuan untuk menentukan titik optimum pelarut : DALMS pada saponifikasi dan ekstraksi menggunakan Rancangan Komposit Pusat Metode Permukaan Respon yang terdiri dari tiga variabel yaitu perbandingan etanol : DALMS (v/b) (X_1), heksana : DALMS (v/b) (X_2) dan akuades : DALMS (v/b) (X_3) dengan respon rendemen. Perlakuan terbaik dilakukan analisa bilangan oksidasi (bilangan peroksida dan p -anisidin) dan senyawa bioaktif meliputi Vitamin E (α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol), fitosterol (kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol), karotenoid (α -karoten dan β -karoten) dan skualen. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan etanol : DALMS (6,5 : 1) (v/b), heksana : DALMS (9,7 : 1) (v/b), dan akuades (12,6 : 1) (v/b) merupakan kombinasi pelarut terbaik dengan rerata rendemen $2,23 \pm 0,11\%$. Optimasi saponifikasi dan ekstraksi berpengaruh terhadap kadar bioaktif rendemen FTT DALMS. Senyawa β -sitosterol, skualen, dan total Vitamin E yang terdiri dari α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol memiliki nilai lebih tinggi saat dilakukan optimasi pelarut dibandingkan sebelum optimasi. Perlakuan optimasi memiliki senyawa stigmasterol dan kampesterol lebih rendah dibandingkan

perlakuan sebelum optimasi. Senyawa α -karoten dan β -karoten tidak dapat terekstrak pada perlakuan setelah optimasi maupun sebelum optimasi. Optimasi pelarut memiliki bilangan peroksida yang lebih tinggi dari perlakuan sebelum optimasi, serta bilangan *p*-Anisidin yang lebih rendah dibandingkan perlakuan sebelum optimasi.

Penelitian tahap 2 bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan nyata penggunaan pelarut baru, pelarut daur ulang, dan kombinasi keduanya pada saponifikasi dan ekstraksi DALMS menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Respon pada tahap ini yaitu rendemen. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) pada $\alpha = 0,05$. Perlakuan dengan rendemen tertinggi dilakukan uji bilangan oksidasi (bilangan peroksida dan *p*-anisidin) dan senyawa bioaktif (meliputi Vitamin E (α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol), fitosterol (kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol), karotenoid (α -karoten dan β -karoten) dan skualen. Penggunaan pelarut daur ulang memiliki nilai rendemen tidak berbeda nyata dibandingkan dengan penggunaan pelarut baru maupun kombinasi pelarut baru : pelarut daur ulang, sehingga FTT yang dihasilkan dari saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut daur ulang dilakukan karakterisasi bilangan oksidasi dan senyawa bioaktif. Bilangan oksidasi pada penggunaan pelarut daur ulang memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan penggunaan pelarut baru, yang ditandai dengan bilangan peroksida dan anisidin yang memiliki nilai lebih tinggi dari penggunaan pelarut baru. Penggunaan pelarut daur ulang memiliki kadar β -sitosterol, kampesterol, dan skualen lebih tinggi dibandingkan pelarut baru. Akan tetapi, penggunaan pelarut daur ulang menghasilkan kadar stigmasterol dan Vitamin E yang terdiri dari α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, serta γ -tokotrienol lebih rendah dibandingkan pelarut baru. Senyawa α -karoten dan β -karoten tidak terdeteksi pada saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut daur ulang.

Kata kunci : DALMS, Saponifikasi, FTT, Rendemen, Rasio pelarut : DALMS, Pelarut Daur Ulang

NISSA CLARA FIRSTA. 176100100111009. Comparative Study of Solvents: Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) and the Use of Recycled Solvents in the PFAD Saponification Process to Obtain the Highest Yield. Thesis.

Supervisor: Erni Sofia Murtini, STP., MP., Ph.D. and Prof. Dr. Teti Estasih, STP., MP

SUMMARY

Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) is a by-product physical purification of crude palm oil consisting of free fatty acids, glycerides, as well as multicomponent bioactive such as squalene, carotene, tocopherols and tocotrienols, and phytosterols. Multicomponent bioactive can be obtained by saponification of PFAD and extraction of the unsaponifiable fraction (USF). The solvent used in the saponification and extraction of an USF is a combination of ethanol, hexane, and aquadest. The saponification solvent used ethanol, while the extraction used hexane and aquadest. The research aimed to determine the optimum conditions for the saponification process with the solvent ratio variation parameter: PFAD (Stage 1) and the use of new solvents and recycled solvents (Stage 2) with the response of USF yield. The highest yields will be analyzed for bioactive including Vitamin E (α -tocopherol, α -tocotrienol, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol), phytosterols (campesterol, β -sitosterol, stigmasterol), carotenoids (α -carotene and β -carotene) and squalene.

The research consisted of preliminary research and two main research stages. Preliminary research was conducted to determine the upper and lower intervals of the ratio of ethanol: PFAD (v/w), hexane: PFAD (v/w), and aquadest: PFAD (v/w) with yield response. The results of the preliminary research on 6:1 (v/w) ethanol treatment, 8:1 (v/w) hexane treatment, and 12:1 (v/w) aquadest treatment resulted in the highest yields, respectively (0.51%; 0.67%; 0.21%). Based on these data, the lower limits of each solvent ratio are ethanol : PFAD 5:1 (v/w), hexane : PFAD 6:1 (v/w), and distilled water : PFAD 10:1 (v/w). The upper limit for each solvent : PFAD is ethanol : PFAD 7:1 (v/w), hexane : PFAD 10:1 (v/w), and distilled water : PFAD 14:1 (v/w). The lower and upper limits obtained are then used in the first stage of research.

Phase 1 research aims to determine the optimum solvent point: PFAD on saponification and extraction using the Central Composite Design Response Surface Method which consists of three variables, namely the ratio of ethanol : PFAD (v/w) (X_1), hexane: PFAD (v/w) (X_2) and aquadest : PFAD (v/w) (X_3) with yield response. The best treatment was analyzed for oxidation number (peroxide number and p-anisidine) and bioactive compounds including Vitamin E (α -tocopherol, α -tocotrienol, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol), phytosterols (campesterol, β -sitosterol, stigmasterol), carotenoids (α -carotene and β -carotene) and squalene. The results showed the use of ethanol : PFAD (6.5 : 1) (v/w), hexane : PFAD (9.7 : 1) (v/w), and distilled water (12.6 : 1) (v/w) is the best solvent combination with an average yield of $2.23 \pm 0.11\%$. Saponification and extraction optimization affect the bioactive content of the USF yield. Compounds of β -sitosterol, squalene, and total Vitamin E consisting of α -tocopherol, α -tocotrienol, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol have higher values during solvent optimization than before optimization. The optimization treatment had lower stigmasterol and campesterol compounds than the pre-optimization treatment. α -carotene and β -carotene compounds could not be detected in the treatment after optimization and before optimization. The solvent

optimization had a higher peroxide value than the pre-optimization treatment and a lower p-anisidine number than the pre-optimization treatment.

Phase 2 research aims to determine whether there are significant differences in the use of new solvents, recycled solvents, and a combination of both in saponification and extraction of DALMS using Completely Randomized Design (CRD). The response at this stage is yield. The data obtained were analyzed using One Way Analysis of Variance (ANOVA) at $\alpha = 0.05$. The treatment with the highest yield was tested for oxidation number (peroxide number and p-anisidine) and bioactive compounds (including Vitamin E (α -tocopherol, α -tocotrienol, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol), phytosterols (campesterol, β -sitosterol, stigmasterol), carotenoids (α -carotene and β -carotene) and squalene. The use of recycled solvents has no significantly different yield value compared to the use of new solvents or combinations of new solvents: recycled solvents, so that the FFT produced from saponification and extraction using recycled solvents. The rework was carried out to characterize the oxidation number and bioactive compounds. The oxidation number in the use of recycled solvents has a higher value than the use of new solvents, which is indicated by the peroxide and anisidine numbers which have higher values than the use of new solvents. The use of recycled solvents has a content of β -sitosterol, campesterol, and squalene are higher than the new solvent. However, the use of recycled solvents resulted in lower levels of stigmasterol and Vitamin E consisting of α -tocopherol, α -tocotrienol, δ -tocotrienol, and γ -tocotrienol lower than the new solvent. α -carotene and β -carotene compounds were not detected in saponification and extraction using recycled solvents.

Keywords : PFAD, Saponification, Unsaponifiable Fraction, Yield, Solvent ratio : PFAD, Recycled Solvent

DAFTAR ISI

| | |
|--|-------------|
| RINGKASAN | i |
| SUMMARY | iii |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR TABEL | viii |
| DAFTAR GAMBAR | ix |
| DAFTAR LAMPIRAN | x |
| DAFTAR ISTILAH | xii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Minyak Kelapa Sawit..... | 5 |
| 2.2 Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS)..... | 6 |
| 2.3 Fraksi Tidak Tersabunkan (FTT DALMS)..... | 7 |
| 2.4 Saponifikasi..... | 8 |
| 2.5 Saponifikasi DALMS dengan Alkali..... | 9 |
| 2.6 Bioaktif Multi Komponen Pada Fraksi Tidak Tersabunkan DALMS..... | 10 |
| 2.6.1 Skualen..... | 10 |
| 2.6.2 Vitamin E..... | 12 |
| 2.6.3 Karotenoid..... | 14 |
| 2.6.4 Fitosterol..... | 17 |
| BAB III KERANGKA PENELITIAN | 18 |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... | 18 |
| 3.2 Kerangka Operasional Penelitian..... | 23 |
| 3.3 Hipotesis Penelitian..... | 26 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | 27 |
| 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian..... | 27 |
| 4.2 Bahan dan Alat Penelitian..... | 27 |
| 4.2.1 Bahan Penelitian..... | 27 |
| 4.2.2 Alat Penelitian..... | 28 |
| 4.3 Rancangan Percobaan..... | 28 |
| 4.3.1 Penelitian Pendahuluan..... | 28 |
| 4.3.2 Penelitian Tahap 1..... | 30 |
| 4.3.3 Penelitian Tahap 2..... | 31 |
| 4.4 Pelaksanaan Penelitian..... | 32 |
| 4.4.1 Separasi FTT..... | 32 |
| 4.4.2 Proses Daur Ulang Heksana..... | 32 |
| 4.4.3 Proses Daur Ulang Etanol..... | 33 |
| 4.5 Pengamatan dan Analisa..... | 33 |
| 4.5.1 Pengamatan Penelitian..... | 33 |
| 4.5.2 Analisa Data..... | 33 |
| 4.6 Diagram Alir..... | 34 |
| 4.6.1 Diagram Alir Penelitian Pendahuluan..... | 34 |
| 4.6.1.1 Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Rasio Etanol..... | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6.1.2 Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Rasio Heksana | 35 |
| 4.6.1.3 Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Rasio Akuades | 36 |
| 4.6.2 Penelitian Tahap 1 | 37 |
| 4.6.2 Penelitian Tahap 2 | 38 |
| BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN | 39 |
| 5.1 Karakteristik FTT DALMS Sebelum Optimasi | 39 |
| 5.1.1 Rendemen FTT DALMS | 39 |
| 5.1.2 Tingkat Oksidasi | 39 |
| 5.1.2.1 Bilangan Peroksida | 39 |
| 5.1.2.2 Bilangan <i>p</i> -Anisidin | 40 |
| 5.1.3 Senyawa Bioaktif FTT DALMS | 41 |
| 5.2 Penentuan Batas Minimum dan Maksimum Optimasi FTT DALMS | 44 |
| 5.3 Optimasi Perbandingan Pelarut : DALMS pada Saponifikasi dengan Respon Rendemen | 47 |
| 5.3.1 Pemilihan Model Berdasarkan Jumlah Kuadrat | 50 |
| 5.3.2 Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Statistik | 51 |
| 5.3.3 Analisis Ragam (ANOVA) dari Permukaan Respon untuk Respon Rendemen | 55 |
| 5.3.4 Penentuan Kondisi Optimum Respon Rendemen | 51 |
| 5.3.5 Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol : Sampel, Heksana : Sampel, dan Akuades : Sampel terhadap Rendemen | 57 |
| 5.4 Verifikasi Hasil Optimasi Respon Rendemen | 59 |
| 5.5 Karakteristik FTT DALMS Hasil Verifikasi Optimum | 62 |
| 5.5.1 Tingkat Oksidasi | 62 |
| 5.5.1.1 Bilangan Peroksida | 62 |
| 5.5.1.2 Bilangan <i>p</i> -Anisidin | 63 |
| 5.5.2 Senyawa Bioaktif FTT DALMS Hasil Verifikasi Optimum | 64 |
| 5.6 Perbandingan Pelarut : DALMS Sebelum Optimasi dan Setelah Optimasi | 68 |
| 5.7 Penggunaan Pelarut Daur Ulang Pada Saponifikasi dan Ekstraksi FTT DALMS | 68 |
| 5.7.1 Rendemen FTT DALMS Hasil Optimasi Pelarut pada Penggunaan Pelarut Baru, Pelarut Daur Ulang, dan Kombinasi Keduanya | 69 |
| 5.7.2 Tingkat Oksidasi | 71 |
| 5.7.2.1 Bilangan Peroksida | 71 |
| 5.7.2.2 Bilangan <i>p</i> -Anisidin | 72 |
| 5.7.3 Senyawa Bioaktif FTT DALMS menggunakan Pelarut Daur Ulang | 73 |
| BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN | 78 |
| DAFTAR PUSTAKA | 80 |
| LAMPIRAN | 89 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabel 2.1 | Komposisi Asam Lemak Minyak Sawit..... | 6 |
| Tabel 2.2 | Karakteristik Kimia FTT DALMS | 8 |
| Tabel 2.3 | Sifat Fisiko Kimia Skualen | 12 |
| Tabel 4.1 | Penelitian Pendahuluan Penentuan Perbandingan Etanol yang Menghasilkan Rendemen Tertinggi | 29 |
| Tabel 4.2 | Penelitian Pendahuluan Penentuan Perbandingan Heksana yang Menghasilkan Rendemen Tertinggi | 29 |
| Tabel 4.3 | Penelitian Pendahuluan Penentuan Perbandingan Akuades yang Menghasilkan Rendemen Tertinggi | 29 |
| Tabel 4.4 | Variabel Bebas dan Pengkodean pada Rancangan Komposit Pusat | 30 |
| Tabel 4.5 | Perbandingan Kombinasi Penggunaan Pelarut berdasarkan Kesegaran | 31 |
| Tabel 5.1 | Hasil Analisa Tingkat Oksidasi Distilat Asam Lemak Minyak Sawit | 39 |
| Tabel 5.2 | Kadar Senyawa Bioaktif FTT DALMS Sebelum Optimasi | 42 |
| Tabel 5.3 | Perlakuan Pendahuluan Uji Coba Pelarut Etanol : Sampel..... | 45 |
| Tabel 5.4 | Perlakuan Pendahuluan Uji Coba Pelarut Heksana : Sampel..... | 45 |
| Tabel 5.5 | Perlakuan Pendahuluan Uji Coba Pelarut Akuades : Sampel..... | 46 |
| Tabel 5.6 | Kisaran Nilai Variabel Bebas | 48 |
| Tabel 5.7 | Hasil Respon Perbandingan Pelarut : Sampel pada Saponifikasi menggunakan Program Design Expert 10 | 49 |
| Tabel 5.8 | Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Uraian Jumlah Kuadrat | 50 |
| Tabel 5.9 | Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Secara Statistik..... | 52 |
| Tabel 5.10 | Hasil Analisis Ragam (ANOVA) Model Kuadratik..... | 53 |
| Tabel 5.11 | Ringkasan Statistika Respon Rendemen..... | 55 |
| Tabel 5.12 | Koefisien Regresi Respon Rendemen | 55 |
| Tabel 5.13 | Formulasi Optimum yang disarankan dengan Respon Terprediksi dan Terobservasi..... | 61 |
| Tabel 5.14 | Tingkat Oksidasi FTT DALMS Sebelum dan Setelah Optimasi Perbandingan Pelarut | 62 |
| Tabel 5.15 | Kadar Senyawa Bioaktif FTT DALMS Hasil Verifikasi Optimum..... | 64 |
| Tabel 5.16 | Perbandingan Rasio Pelarut : DALMS yang Digunakan Sebelum dan Sesudah Optimasi..... | 68 |
| Tabel 5.17 | Kadar Rendemen FTT yang Diperoleh pada Uji Coba Penggunaan Pelarut Baru dan Pelarut Daur Ulang..... | 69 |
| Tabel 5.18 | Hasil Analisa Tingkat Oksidasi DALMS | 71 |
| Tabel 5.19 | Kadar Senyawa Bioaktif FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 74 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------------|---|----|
| Gambar 2.1 | Reaksi Saponifikasi Menggunakan KOH | 9 |
| Gambar 2.2 | Struktur Tokoferol dan Tokotrienol | 13 |
| Gambar 2.3 | Struktur Karotenoid | 16 |
| Gambar 3.1 | Diagram Alir Kerangka Konsep Penelitian | 22 |
| Gambar 3.2 | Diagram Alir Kerangka Operasional Penelitian | 26 |
| Gambar 4.1 | Rumus Model Permukaan Respon Ordo Kedua dengan 3 Faktor | 31 |
| Gambar 4.2 | Diagram Alir Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Etanol | 34 |
| Gambar 4.3 | Diagram Alir Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Heksana | 35 |
| Gambar 4.4 | Diagram Alir Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Akuades | 36 |
| Gambar 4.5 | Diagram Alir Saponifikasi dan Ekstraksi DALMS Berdasarkan Titik Optimum DX 11.0 | 37 |
| Gambar 4.6 | Diagram Alir Saponifikasi dan Ekstraksi FTT DALMS Menggunakan Pelarut Baru, Pelarut Daur Ulang, dan Kombinasi Pelarut Baru : Pelarut Daur Ulang | 38 |
| Gambar 5.1 | Persamaan Kode Variabel Optimasi | 55 |
| Gambar 5.2 | Kontur Plot dan Kurva Respon Permukaan (3D) terhadap Rendemen | 58 |
| Gambar 5.3 | Kurva Respon Permukaan (3D) terhadap <i>Desirability</i> Respon | 61 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|------------|
| Lampiran 1 Prosedur Analisa | 89 |
| Lampiran 1.1 Analisa Bilangan Peroksida | 89 |
| Lampiran 1.2 Analisa Bilangan <i>p</i>-Anisidin | 90 |
| Lampiran 1.3.1 Tokoferol dan Tokotrienol | 91 |
| Lampiran 1.3.2 Fitosterol | 91 |
| Lampiran 1.3.3 Kadar α-karoten dan β-karoten | 92 |
| Lampiran 1.3.4 Skualen | 93 |
| Lampiran 2 Rendemen FTT DALMS | 94 |
| Lampiran 2.1 Rendemen FTT DALMS Sebelum Optimasi | 94 |
| Lampiran 2.2 Rendemen FTT DALMS Berdasarkan Rancangan Perlakuan Aplikasi Design Expert 11.0 | 94 |
| Lampiran 2.3 Rendemen FTT DALMS Verifikasi <i>Design Expert (DX 11.0)</i> | 95 |
| Lampiran 2.4 Rendemen FTT DALMS Menggunakan Pelarut Baru, Kombinasi Pelarut Baru : Daur Ulang, dan Pelarut Daur Ulang .. | 96 |
| Lampiran 3 Bilangan Peroksida FTT DALMS | 97 |
| Lampiran 3.1 Kurva Standar Bilangan Peroksida | 97 |
| Lampiran 3.2 Bilangan Peroksida FTT DALMS Sebelum Optimasi | 97 |
| Lampiran 3.3 Bilangan Peroksida FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi..... | 97 |
| Lampiran 3.4 Bilangan Peroksida FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang..... | 98 |
| Lampiran 4 Bilangan Anisidin FTT DALMS | 91 |
| Lampiran 4.1 Bilangan Anisidin FTT DALMS Sebelum Optimasi | 98 |
| Lampiran 4.2 Bilangan Anisidin FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi..... | 98 |
| Lampiran 4.3 Bilangan Anisidin FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang..... | 98 |
| Lampiran 5 Analisa Kadar Vitamin E dengan HPLC | 99 |
| Lampiran 5.1 Standar α-Tokoferol | 99 |
| Lampiran 5.2 Standar δ-Tokotrienol | 99 |
| Lampiran 5.3 Standar γ-Tokotrienol | 100 |
| Lampiran 5.4 Standar α-Tokotrienol | 101 |
| Lampiran 5.5 Kadar Vitamin E FTT DALMS Sebelum Optimasi | 102 |
| Lampiran 5.6 Kadar Vitamin E FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 104 |
| Lampiran 5.7 Kadar Vitamin E FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang | 105 |
| Lampiran 5.8 Kadar δ-Tokotrienol pada FTT DALMS | 106 |
| Lampiran 5.9 Kadar γ-Tokotrienol pada FTT DALMS | 106 |
| Lampiran 5.10 Kadar α-Tokotrienol pada FTT DALMS | 107 |
| Lampiran 5.11 Kadar α-Tokoferol pada FTT DALMS | 107 |
| Lampiran 6 Analisa Kadar Fitosterol dengan HPLC | 108 |
| Lampiran 6.1 Standar β-Sitosterol | 108 |
| Lampiran 6.2 Standar Stigmasterol | 109 |
| Lampiran 6.3 Standar Kampesterol | 109 |
| Lampiran 6.4 Kadar Fitosterol FTT DALMS Sebelum Optimasi | 110 |
| Lampiran 6.5 Kadar Fitosterol FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 112 |
| Lampiran 6.6 Kadar Fitosterol FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang | 113 |



Lampiran 6.8 Kadar β -sitosterol pada FTT DALMS 114

Lampiran 6.9 Kadar Kampesterol pada FTT DALMS 115

Lampiran 7 Analisa Kadar Karoten dengan HPLC 116

Lampiran 7.1 Standar α -Karoten 116

Lampiran 7.2 Standar β -Karoten 116

Lampiran 7.3 Kadar Karoten FTT DALMS Sebelum Optimasi 117

Lampiran 7.4 Kadar Karoten FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi 117

Lampiran 7.5 Kadar Karoten FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang 118

Lampiran 7.6 Kadar α -Karoten pada FTT DALMS 119

Lampiran 7.7 Kadar β -Karoten pada FTT DALMS 119

Lampiran 8 Analisa Kadar Skualen dengan HPLC 120

Lampiran 8.1 Standar Skualen 120

Lampiran 8.2 Kadar Skualen FTT DALMS Sebelum Optimasi 121

Lampiran 8.3 Kadar Skualen FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi 122

Lampiran 8.4 Kadar Skualen FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang 123

Lampiran 8.5 Kadar Skualen pada FTT DALMS 124

Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian 125



DAFTAR ISTILAH

| | | |
|--|---|---|
| Bilangan anisidin | : | Bilangan yang menghitung jumlah aldehid dalam minyak dan merupakan produk oksidasi sekunder |
| Bilangan peroksida | : | Bilangan yang menunjukkan ketengikan minyak goreng akibat proses oksidasi serta hidrolisis |
| Bioaktif multi komponen | : | Berbagai jenis senyawa bioaktif yang terkandung dalam suatu bahan |
| Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) | : | Produk samping penyulingan minyak sawit yang diperoleh dari proses deodorisasi, deasidifikasi, dan decolorisasi. Berwarna putih, kuning pucat, ataupun cokelat pucat. |
| Ekstraksi | : | Pemisahan suatu zat berdasarkan kelarutannya. Senyawa nonpolar larut pada pelarut nonpolar, begitupun sebaliknya |
| Fraksi Tidak Tersabunkan (FTT) | : | Bagian dari DALMS yang tidak terurai oleh reaksi saponifikasi. Memiliki jumlah yang sangat sedikit (2-5%) |
| Pelarut baru | : | Pelarut baru yang belum pernah dipakai sekalipun dan masih segar |
| Pelarut daur ulang | : | Pelarut bekas sekali pakai yang telah digunakan untuk saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS, lalu didestilasi dan digunakan ulang untuk saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS |
| Rasio pelarut | : | Volume perbandingan pelarut : DALMS yang digunakan pada saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS |
| Rendemen FTT | : | Persentase FTT yang dihasilkan per berat DALMS yang disaponifikasi |
| Saponifikasi | : | Reaksi hidrolisis antara lemak dan alkali sehingga menghasilkan produksi garam asam lemak rantai panjang dan pelepasan gliserol |

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kelapa sawit merupakan salah satu komoditas hasil perkebunan yang berperan penting dalam perekonomian Indonesia. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Perkebunan, luas perkebunan kelapa sawit sejak tahun 2017 mengalami peningkatan. Pada tahun 2020, prediksi luas perkebunan kelapa sawit mencapai 14,99 juta hektar dengan produksi *Crude Palm Oil* (CPO) sebesar 49.117.260 ton (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2019).

Pada proses pengolahan minyak goreng berbahan baku CPO, dilakukan beberapa tahap pemurnian yang salah satunya bertujuan untuk menghilangkan senyawa volatil dan asam lemak bebas sehingga menghasilkan distilat asam lemak minyak sawit (DALMS). DALMS merupakan produk samping penyulingan minyak sawit yang diperoleh dari proses deodorisasi (Ahmadi *et al.*, 2013). Menurut Latifah dan Estiasih (2016), jumlah DALMS yaitu 3,36% dari CPO, dengan produksi CPO 2.573.173 ton dihasilkan DALMS sebesar 102.927 ton. DALMS mengandung komponen utama asam lemak bebas (72,7-92,6%) (Cheah *et al.*, 2010) dan komponen fitokimia seperti tokoferol dan tokotrienol (0,7-1%) (Liu *et al.*, 2008), skualen (0,8%), dan sterol (0,4%) (Top *et al.*, 2010). Komponen bioaktif tersebut terakumulasi dalam fraksi tidak tersabunkan, yang dapat dihasilkan melalui saponifikasi.

Proses saponifikasi dan ekstraksi FTT pada DALMS dimulai dengan mereaksikan DALMS dengan basa KOH dan asam askorbat menggunakan pelarut alkohol pada suhu dan waktu tertentu. Pada proses ini homogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* dapat membantu mempercepat reaksi saponifikasi (Ayoola *et al.*, 2016; Kumar dan Krishna, 2014). Ekstraksi FTT dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair, menggunakan pelarut non polar. Pelarut yang dapat digunakan antara lain heksan, petroleum eter, atau iso-oktan (Kumar dan Krishna, 2014), (Cantrill *et al.*, 2008). Pemisahan sabun yang terbentuk antara fraksi tersabunkan dan fraksi tidak tersabunkan dilakukan dengan menambahkan akuades. Sabun yang dihasilkan dari reaksi katalis kalium dan minyak memiliki tekstur yang lunak sehingga mudah larutan dalam air (Olabanji *et al.*, 2012). Fraksi tidak tersabunkan yang masih mengandung pelarut non polar kemudian dilakukan evaporasi guna menghilangkan pelarut, sehingga akan dihasilkan FTT bebas pelarut.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Estiasih (2013), pelarut yang digunakan sebagai fasilitator pada saponifikasi yaitu etanol, sedangkan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi FTT yaitu heksana. Penambahan akuades selama proses ekstraksi dilakukan untuk membantu memisahkan sabun dan komponen polar pada produk hasil saponifikasi. Senyawa polar dan sabun akan larut pada akuades, dan FTT yang mengandung senyawa bioaktif multikomponen akan terlarut pada heksana karena FTT bersifat non polar dan cenderung larut pada heksana. Penggunaan pelarut pada saponifikasi dan ekstraksi menurut penelitian Ulfa (2016) dan Susantiyo (2016) memiliki perbandingan pelarut : DALMS masing-masing yaitu etanol : DALMS sebesar 8:1, heksana : DALMS 15:1, dan akuades : DALMS sebesar 20:1.

Rendemen yang dihasilkan melalui proses saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS dipengaruhi oleh perbandingan pelarut : DALMS (v/b) dan kesegaran pelarut yang digunakan. Rasio pelarut tersebut perlu dioptimalkan. Diharapkan dengan melakukan optimasi rasio pelarut : DALMS, volume penggunaan pelarut dapat berkurang. Perbandingan pelarut : DALMS yang tepat perlu untuk diketahui sehingga dapat dihasilkan rendemen FTT yang tinggi dengan jumlah pelarut yang lebih rendah. Penggunaan pelarut berlebih memiliki beberapa kelemahan, diantaranya dapat memberikan kontribusi terhadap pencemaran lingkungan serta nilai produksi FTT akan meningkat dan menjadi tidak ekonomis.

Limbah pelarut etanol dan heksana pada ekstraksi FTT perlu penanganan khusus karena sifatnya yang tidak ramah lingkungan. Heksana merupakan salah satu produk penyulingan dari minyak bumi dan tidak dapat terbarukan. Daur ulang pelarut etanol dan heksana yang akan digunakan pada ekstraksi FTT DALMS mengandung senyawa bioaktif multikomponen diharapkan mampu menjadi solusi dalam permasalahan tersebut.

Penggunaan pelarut daur ulang diharapkan mampu mengurangi penggunaan pelarut baru sehingga dapat berkontribusi dalam mengurangi pencemaran lingkungan. Selain itu, diharapkan penggunaan pelarut daur ulang dapat menekan biaya produksi FTT. Pelarut daur ulang pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol dan heksana bekas sekali pakai saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS yang dilakukan destilasi.

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan proses optimasi dengan metode permukaan respon pada pelarut etanol yang berperan sebagai fasilitator saponifikasi, serta pelarut heksana dan akuades yang berperan pada proses

ekstraksi FTT. Faktor yang dikaji yaitu rasio pelarut : DALMS (v/b) optimal pada saponifikasi dan ekstraksi untuk menghasilkan rendemen tertinggi. Rasio pelarut : DALMS (v/b) optimal kemudian dilakukan uji coba menggunakan pelarut daur ulang untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang pada saponifikasi dalam menghasilkan rendemen FTT dengan jumlah maksimal.

1.2 Perumusan Masalah

1. Berapa rasio pelarut : DALMS yang optimal pada saponifikasi dan ekstraksi DALMS untuk menghasilkan rendemen FTT tertinggi?
2. Bagaimana pengaruh kondisi optimal saponifikasi dan ekstraksi DALMS yang ditinjau dari rasio pelarut : DALMS terhadap bilangan oksidasi dan kadar senyawa bioaktif multikomponen FTT DALMS?
3. Bagaimana pengaruh kondisi optimal saponifikasi dan ekstraksi DALMS kombinasi etanol baru : heksana baru, etanol baru : heksana daur ulang, etanol daur ulang : heksana baru, serta heksana daur ulang : daur ulang dalam menghasilkan rendemen FTT DALMS?
4. Bagaimana pengaruh kondisi optimal saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut daur ulang terhadap bilangan oksidasi dan kadar senyawa bioaktif multikomponen FTT DALMS?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan rasio pelarut : DALMS yang optimal pada saponifikasi dan ekstraksi dalam menghasilkan rendemen FTT tertinggi.
2. Menganalisis kondisi optimal saponifikasi dan ekstraksi DALMS terhadap bilangan oksidasi dan kadar senyawa bioaktif multi komponen.
3. Menganalisis kondisi optimal saponifikasi dan ekstraksi DALMS menggunakan kombinasi etanol baru : heksana baru, etanol baru : heksana daur ulang, etanol daur ulang : heksana baru, serta heksana daur ulang : daur ulang dalam menghasilkan rendemen FTT DALMS.
4. Menganalisis kondisi optimal saponifikasi dan ekstraksi menggunakan kombinasi etanol daur ulang : heksana daur ulang terhadap bilangan oksidasi dan kadar senyawa bioaktif multikomponen FTT DALMS.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Peningkatan manfaat hasil samping pemurnian minyak sawit (DALMS).
2. Mengetahui rasio pelarut : DALMS optimum pada saponifikasi dan ekstraksi

FTT DALMS dalam menghasilkan rendemen maksimum.

3. Informasi bagi khalayak umum dan industri mengenai penggunaan pelarut daur ulang dalam menghasilkan FTT DALMS mengandung senyawa bioaktif multi komponen, sehingga diharapkan dapat mengurangi penggunaan pelarut dan mengurangi limbah lingkungan



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit merupakan salah satu sumber bahan baku terbarukan, diantaranya dimanfaatkan dalam industri makanan, oleokimia, dan biofuel. Minyak kelapa sawit diekstrak dari mesocarp buah sawit yang sudah matang. Lima negara produsen minyak sawit terbanyak diantaranya Indonesia, Malaysia, Thailand, Kolombia dan Nigeria. Kelapa sawit menghasilkan produksi minyak tertinggi per satuan luas lahan, diperkirakan 58,431 juta metrik ton per tahun. Satu hektar perkebunan kelapa sawit mampu menghasilkan minyak hingga 10 kali lebih banyak dari minyak nabati lain yang berasal biji-bijian. Buah sawit menghasilkan dua jenis minyak: *Crude Palm Oil* (CPO) yang diekstrak dari mesocarp dan *Palm Kernel Oil* (PKO) dari kernel bagian dalam (Mba *et al.*, 2015).

Minyak kelapa sawit menjadi salah satu komoditas nabati dengan produktivitas dan manfaat yang tinggi pada bidang industri. Beberapa faktor pendukung yang menjadikannya sebagai komoditas potensial yaitu : harga murah, stabil terhadap oksidasi, komposisi asam lemak dan, stabil pada suhu kamar (Kumar dan Krishna, 2014).

Minyak kelapa sawit berbentuk semi-padat pada suhu ruang (20–30 ° C). Komponen utama minyak sawit terdiri dari campuran gliserida dengan titik leleh rendah dan titik leleh tinggi yang berbentuk minyak cair. Karakteristik semi-solid pada minyak sawit mampu membuatnya menjadi komoditas yang dapat dengan mudah dimodifikasi pada berbagai proses sehingga penggunaan komersialnya menjadi lebih luas. Beberapa proses modifikasi yang dapat dilakukan yaitu : hidrogenasi, interesterifikasi (kimia dan enzimatik) atau fraksinasi (fraksi kering, pelarut dan deterjen). Proses hidrogenasi akan membentuk asam lemak trans yang memiliki dampak negatif pada kesehatan. Proses interesterifikasi dilakukan menggunakan enzim atau bahan kimia untuk memodifikasi campuran minyak. Proses fraksinasi melibatkan kristalisasi selektif dan filtrasi yang didasarkan pada perbedaan dalam titik leleh triasil gliserol. Metode Fraksinasi kering adalah metode paling sederhana dan termurah untuk pemisahan, dikarenakan tidak ada penggunaan bahan kimia dan tidak mengurangi jumlah minyak (Kumar dan Krishna, 2014).

Tabel 2.1 Komposisi Asam Lemak Minyak Sawit

| Asam Lemak | Kadar (%) |
|-------------------------------------|-----------|
| Asam Lemak Jenuh | |
| Palmitat (C16:0) | 44.3 |
| Stearat (C18:0) | 4.6 |
| Miristat (C14:0) | 1.0 |
| Asam Lemak Tak Jenuh Tunggal | |
| Oleat (C18:1) | 38.7 |
| Asam Lemak Tak Jenuh Ganda | |
| Linoleat (C18:2) | 10.5 |
| Lain-lain | 0.9 |

Sumber : (Mukherjee dan Mitra, 2009)

Sebuah studi yang membandingkan kelapa sawit, kedelai, minyak kacang dan lemak babi menunjukkan bahwa minyak sawit mampu meningkatkan level kolesterol baik dan mengurangi kadar kolesterol jahat dalam darah. Penggunaan minyak sawit dalam makanan diklaim aman dan tidak akan meningkatkan risiko penyakit stroke (Mukherjee dan Mitra, 2009).

2.2 Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS)

DALMS merupakan produk sampingan dari penyulingan fisik minyak kelapa sawit dan merupakan salah satu sumber skualen. Sekitar 3,66 ton DALMS diproduksi untuk setiap 100 ton minyak sawit mentah (Chu *et al.*, 2004). Keberagaman komposisi DALMS tergantung pada kualitas CPO sebagai bahan baku, jenis deodorizer dan parameter pengolahan seperti volume uap yang digunakan pada buah yang telah dikupas, proses vakum, suhu dan waktu penghilangan bau. Jumlah DALMS yang dihasilkan tidak tergantung pada jenis minyak tetapi tergantung dari jumlah asam lemak bebas (ALB) pada minyak yang digunakan dalam proses penghilangan bau. Jumlah DALMS yang diperoleh dari pengolahan kelapa sawit yaitu sekitar 4% (Tufail *et al.*, 2016).

DALMS dihasilkan dari proses pemurnian fisik pada minyak kelapa sawit. Komponen utama yang terdapat pada DALMS serta jumlah fraksi tidak tersabunkan dinyatakan dalam satuan % (w/w). Banyaknya senyawa bioaktif pada DALMS tergantung oleh jumlah fraksi tidak tersabunkan yang dihasilkan (Tufail *et al.*, 2016).

DALMS mengandung 72,7-92,6% asam lemak bebas, dengan komponen fraksi tidak tersabunkan dalam jumlah yang kecil, yaitu 1-2,5% dan sisanya merupakan minyak netral. Pengolahan minyak sawit modern secara konsisten menghasilkan DALMS memiliki nilai asam lemak bebas lebih tinggi dari 88%, dan

minyak kelapa sawit juga mengandung komponen minor non-gliserida yang memberikan manfaat kesehatan, beberapa di antaranya disuling bersama dengan asam lemak bebas sebagai fraksi tidak tersabunkan (FTT). (Sampaio *et al.*, 2017).

Fraksi tidak tersabunkan pada DALMS telah dipertimbangkan sebagai sumber potensial phytochemical yang sangat berharga. Vitamin E, fitosterol, dan skualen, serta pengaruh positif terhadap kesehatan telah banyak dilakukan penelitian sebelumnya. Tokotrienol yang terdapat pada DALMS saat ini diproduksi secara komersial. Profil vitamin E pada DALMS yang berasal dari Malaysia yaitu 10,3% dari berat DALMS merupakan α -tokoferol, 18,7% merupakan α -tokotrienol, 49,8% berat DALMS merupakan γ -tokotrienol, dan 14,6% berat δ -tokotrienol (Tay *et al.*, 2009). Beberapa sampel DALMS memiliki sebanyak 0,5% vitamin E, 0,4% fitosterol, dan 0,8% skualen tergantung pada bahan baku dan kondisi pemrosesan. Langkah awal dalam ekstraksi fitokimia dari DALMS adalah konversi asam lemak menjadi metil ester, yaitu, biodiesel. Metil ester kemudian didistilasi dalam evaporator jalur pendek di mana fitokimia terkonsentrasi pada residu. Residu diproses lebih lanjut untuk menghasilkan fitokimia dengan nilai tambah tinggi (Cheah *et al.*, 2010).

2.3 Fraksi Tidak Tersabunkan (FTT) DALMS

FTT merupakan bagian dari lemak yang tidak bereaksi dan tidak terpecah saat saponifikasi. Pada DALMS FTT memiliki persentase sebesar 1,86 - 2,87% (Faizah *et al.*, 2020). FTT mengandung karbohidrat, fosfolipid, vitamin *liposoluble*, pigmen, karoten, vitamin E, fitosterol dan polifenol yang merupakan senyawa bioaktif dan dapat berperan sebagai antioksidan alami dalam minyak. (Guergouri *et al.*, 2017).

Tabel 2.2 Karakteristik Kimia FTT DALMS

| Karakteristik | Jumlah |
|----------------------------|--------------------------|
| Asam Lemak Bebas (%) | 7,99 ^a |
| Peroksida (meq/kg) | 0,22 ^a |
| Aktivitas antioksidan (%) | 81,51 ^a |
| Vitamin E (g/100g) | 12,09 ^a |
| Alfa tokoferol (g/100g) | 4,05 ^a |
| Alfa tokotrienol (g/100g) | 2,12 ^a |
| Delta tokotrienol (g/100g) | 3,51 ^a |
| Gamma tokotrienol (g/100g) | 2,41 ^a |
| Fitosterol (g/100g) | 2,47 ^b |
| Beta sitosterol | 0,86 ^b |
| Sitosterol | 0,77 ^b |
| Kampesterol | 0,84 ^b |
| Skualen | 2,85 ^b |
| Rendemen (%) | 1,86 – 2,87 ^c |

Sumber : ^a Ahmadi dan Estiasih, 2010

^b Hapsari, 2020

^c Faizah *et al.*, 2020

Asam lemak bebas pada FTT merupakan residu asam lemak yang tidak dapat tersabunkan saat saponifikasi. Keberadaan asam lemak bebas pada FTT tidak diinginkan karena dapat menjadi indikator proses saponifikasi tidak sempurna. Semakin tinggi asam lemak bebas pada FTT menunjukkan saponifikasi yang tidak sempurna (Estiasih, *et al.*, 2015). Secara fisik, FTT DALMS memiliki warna kuning jernih hingga kecoklatan tergantung dengan bahan baku DALMS yang digunakan, memiliki aroma khas DALMS, beku pada suhu 4°C, pada suhu ruang memiliki tekstur cair dan kental.

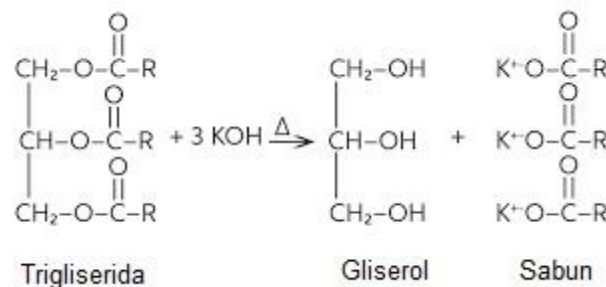
Hasil penelitian menunjukkan bahwa FTT DALMS dengan dosis 1000 mg/kg per hari berpengaruh nyata terhadap penurunan total kolesterol darah (Estiasih *et al.*, 2014). Selain itu, fraksi tak tersabunkan juga mengandung karotenoid yang dapat diaplikasikan sebagai pewarna makanan. Bagian dari karotenoid, (β -cryptoxanthin) memiliki efek stimulasi pada pembentukan tulang dan peran homeostatis dalam pembentukan tulang sehingga dapat mencegah osteoporosis, terutama pada wanita pasca menopause (Eggersdorfer dan Wyss, 2018).

2.4 Saponifikasi

Saponifikasi merupakan reaksi hidrolisis asam lemak akibat adanya reaksi dengan basa kuat, sehingga menghasilkan asam lemak bebas, gliserol, dan sabun. Basa pada reaksi saponifikasi berperan sebagai katalisator. Basa kuat yang digunakan umumnya adalah NaOH, KOH, K₂CO₃ (Vieira *et al.*, 2015). Basa akan dilarutkan dengan methanol dan etanol yang berperan sebagai media pelarut

saponifikasi (Nagappan *et al.*, 2018). Katalis dasar seperti KOH dan NaOH digunakan karena harganya yang relatif murah dan penggunaannya yang mudah (Singh *et al.*, 2006). Basa kuat akan bereaksi langsung dengan ester dan trigliserida sehingga akan menghasilkan asam lemak bebas, gliserol, dan sabun.

Penggunaan KOH dalam saponifikasi memiliki efek yang lebih kuat dan lebih cepat terhadap asam lemak dibandingkan dengan penggunaan katalis basa NaOH (Eze *et al.*, 2015; Mendow *et al.*, 2011). Penggunaan jenis basa dapat mempengaruhi karakteristik sabun yang dihasilkan. Sabun yang dihasilkan oleh reaksi asam lemak dengan NaOH akan menghasilkan tekstur yang padat, sedangkan sabun yang dihasilkan dengan mereaksikan KOH akan menghasilkan tekstur yang lunak (Kurnianto *et al.*, 2019). Reaksi saponifikasi dapat diamati pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.1 Reaksi Saponifikasi menggunakan KOH

Berdasarkan **Gambar 2.3** dapat dilihat bahwa trigliserida bereaksi dengan basa yaitu KOH membentuk campuran potasium karboksilat dan gliserol. Pada persamaannya, sabun adalah garam terdiri dari campuran karboksilat anion dan kation univalen. Campuran anion terbentuk karena setiap molekul trigliserida berisi berbagai residu asam lemak dan karena lemak atau minyak itu sendiri khususnya adalah campuran molekul. Sabun kalium lebih larut dari sabun natrium dan mudah menghasilkan busa (Saini *et al.*, 2018).

2.5 Saponifikasi DALS dengan Alkali

Saponifikasi merupakan reaksi hidrolisis antara lemak dan alkali sehingga menghasilkan produksi garam asam lemak rantai panjang dan pelepasan gliserol (Battimelli *et al.*, 2010). Saponifikasi minyak merupakan reaksi antara KOH dan etanol yang bereaksi dengan minyak untuk membentuk gliserol dan asam lemak.

Pembentukan asam lemak dan gliserol dari minyak penting bagi industri oleokimia. Gliserin dan asam lemak banyak digunakan sebagai bahan baku dalam industri makanan, kosmetik, farmasi, produksi sabun, deterjen sintetis, dan beberapa produk lainnya (Serri *et al.*, 2008). Reaksi saponifikasi menggunakan alkali telah dilakukan lebih dari 2000 tahun yang lalu. Reaksi ini menghasilkan asam lemak, dimana asam lemak tersebut digunakan untuk industri oleokimia. Minyak dan lemak digunakan sebagai bahan baku utama dalam saponifikasi, serta menghasilkan gliserol sebagai produk sampingan yang memiliki nilai tambah (Salimon *et al.*, 2012). Reaksi saponifikasi dapat terjadi dengan katalis oleh asam, basa, maupun dengan enzim lipase, dan tanpa menggunakan katalis sehingga murni terjadi reaksi antara lemak dan air dengan suhu dan tekanan tertentu (Rukmini dan Raharjo, 2010).

Penelitian terdahulu telah menggunakan beberapa metode untuk saponifikasi seperti saponifikasi enzimatik menggunakan lipase dari *Aspergillus niger*, *Rhizopus javanicus*, dan *Penicillium solitum*, *C. rugosa*, dan air subkritis (Salimon *et al.*, 2012). Sabun diproduksi oleh saponifikasi alkali dari minyak dan lemak, dan proses ini disebut dengan saponifikasi. Sabun pada proses saponifikasi terbentuk karena adanya netralisasi asam lemak yang dihasilkan oleh pemecahan lemak. Saponifikasi dengan alkali lebih disukai pada asam lemak yang sensitif terhadap panas (Salimon *et al.*, 2012).

Saponifikasi umumnya dilakukan menggunakan basa KOH dan NaOH (Toomey dan McGraw, 2007; Vieira *et al.*, 2015). Reaksi saponifikasi berlangsung pada sistem etanol-basa. Saat ini, peneliti umumnya menggunakan kalium hidroksida sebagai katalisator hidrolisis ester. Keunggulan penggunaan kalium hidroksida sebagai katalisator yaitu menghasilkan reaksi satu arah sehingga memperkecil asam lemak bebas dan gliserol untuk terikat kembali, selain itu produk yang dihasilkan lebih mudah dipisahkan.

2.6. Bioaktif Multikomponen pada Fraksi Tidak Tersabunkan DALMS

2.6.1 Skualen

Skualen merupakan hidrokarbon dari jenis triterpena, yang mengandung enam unit isoprena dan memiliki rasa hambar. Sumber skualen terbanyak di alam dapat ditemukan pada minyak hati ikan hiu (sekitar 60% berat hati) (Spanova, 2011). Skualen merupakan minyak tidak berwarna yang diekstraksi dari fase semi-padat dengan bau dan rasa yang samar. Selain itu, skualen memiliki kepadatan

rendah dan lebih ringan daripada air dengan gravitasi spesifik 0,9 (Norhidayah, 2012). Pada manusia, skualen terdapat dalam sebum sekitar 13%. Sumber nabati skualen terdapat di minyak zaitun, minyak kelapa sawit, minyak gandum, minyak bayam, dan minyak dedak padi (Spanova, 2011). Skualen disintesis oleh tumbuhan, hewan, bakteri, dan jamur sebagai prekursor untuk sintesis metabolit sekunder seperti sterol, hormon, atau vitamin. Selain itu, skualen merupakan sumber karbon dalam fermentasi aerob dan anaerob mikroorganisme (Lozano *et al.*, 2018).


Pada kehidupan sehari-hari skualen umumnya digunakan untuk bahan tambahan kosmetik, yang berfungsi sebagai pelembab alami dan berperan dalam biosintesis kolesterol. Pada bahan pangan skualen berperan sebagai inhibitor oksidasi sehingga dapat menjaga stabilitas minyak sayur (Moreda dan Cert, 2001).

Skualen memiliki banyak fungsi fisiologis, seperti promosi aktivitas SOD *in vivo*, peningkatan respons imun, dan aktivitas anti-penuaan, anti-kelelahan, dan anti-tumor. Sifat-sifat ini banyak diaplikasikan dalam kedokteran, makanan, kosmetik, dan teknik kimia (Xiao *et al.*, 2016).

Ekstraksi skualen pada awalnya diperoleh dengan mengekstrak minyak hati ikan hiu, akan tetapi karena issue perlindungan lingkungan dan kehidupan laut maka digunakan alternatif sumber skualen dari tumbuhan (Moreda dan Cert, 2001), meskipun jumlahnya tidak melimpah dan komposisinya yang kompleks (Xiao *et al.*, 2016). Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) mengandung skualen dalam jumlah tinggi hingga 1,03% (b/b) lebih banyak daripada minyak nabati umum lainnya (Liu *et al.*, 2008). Metode yang umum digunakan untuk isolasi dan purifikasi skualen diantaranya ekstraksi cairan superkritis (Gaca, 2013), destilasi molekuler (Rodr *et al.*, 2007), dan kromatografi kolom (Gunawan, 2008).

Sifat fisiko kimia skualen disajikan pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2.3 Sifat Fisiko Kimia Skualen

| | |
|----------------------------------|--|
| Chemical Abstract Service Number | 111-02-4 ^b |
| Nama lain | C ₃₀ H ₅₀ , 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheptane ^a |
| Berat molekul | 410.7 ^a |
| Struktur |  |
| Kenampakan | Tidak berwarna, tidak berbau, tidak berasa ^a |
| Titik leleh | -75°C ^a |
| Kelarutan dalam air | 0.124 mg/L ^a |
| log P | 10.67 ^c , 6.97 ^a , 9.65 ^a |
| Viskositas | ~11 cP ^a |
| Tegangan permukaan | ~32 mN/m ^a |
| Massa jenis | 0.858 g/ml ^c |

Sumber : ^a Naziri dan Tsimidou, 2013

^b Sánchez-quesada *et al.*, 2018

^c Spanova dan Daum, 2011

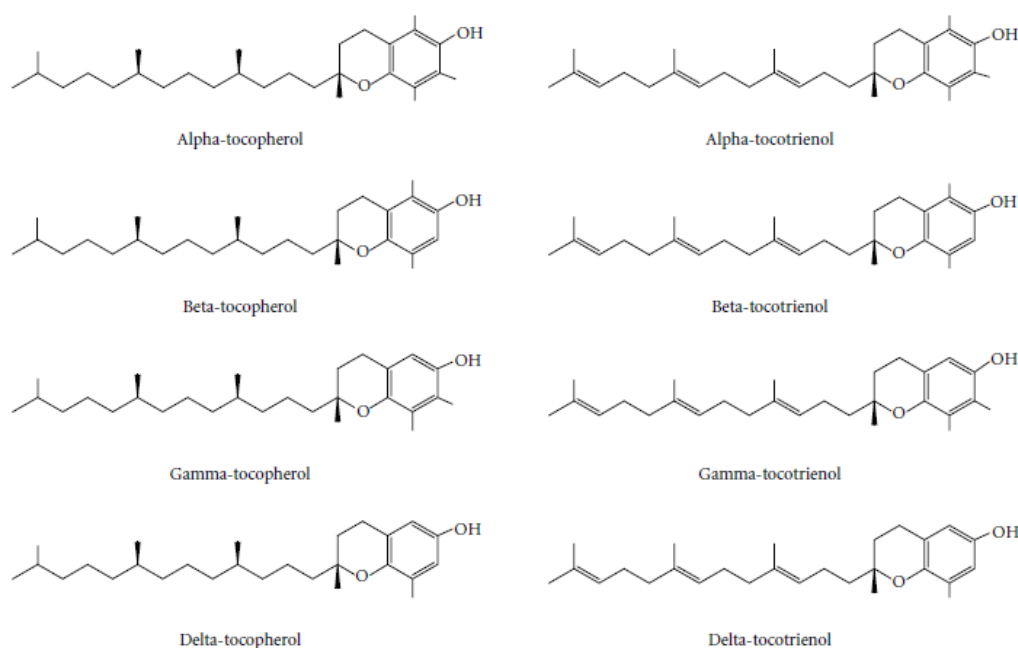
^d Fox, 2009

2.6.2 Vitamin E

Komoditas pangan yang memiliki konsentrasi vitamin E tertinggi terdapat pada minyak nabati, salah satunya pada minyak sawit (Vicente *et al.*, 2011). Pada CPO, vitamin E tersusun atas 74,4% tokotrienol dan 25,6% tokoferol dari berat. CPO merupakan minyak nabati yang memiliki nilai tokotrienol tinggi, selain itu komoditas nabati lain seperti dedak padi dan minyak jagung juga memiliki nilai tokotrienol yang tinggi.

Selama proses deodorisasi dan distilasi uap pada proses pemurnian FFA, sekitar 15-57% dari tokotrienol dan tokoferol dikeluarkan dari minyak sawit (Goh *et al.*, 1985). Sebagian besar tokoferol dan tokotrienol tidak hilang tetapi terakumulasi dalam distilat asam lemak sawit. Tingkat tokoferol dan tokotrienol dalam distilat mencapai 0,4-0,8% dengan komposisi terbesar yaitu tokotrienol sekitar 70% (Liu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2018). Oleh karena itu produk sampingan ini merupakan sumber potensial untuk *recovery* senyawa berharga ini.

Tokoferol dan tokotrienol masing-masing memiliki empat isoform yang berbeda yaitu alfa (α), beta (β), gamma (γ), dan delta (δ) (Singh *et al.*, 2018). Beberapa penelitian *in vitro* dan *in vivo* telah menemukan bahwa tokotrienol memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang lebih kuat, dan secara *in vivo* telah dibuktikan sebagai agen antikanker yang lebih efektif daripada tokoferol. Hal ini dapat terjadi karena tokotrienol memiliki rantai samping tak jenuh yang dapat lebih mudah berinteraksi ke dalam sel (Han *et al.*, 2004). Struktur tokoferol dan tokotrienol tersaji pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.2 Struktur Tokoferol dan Tokotrienol, Sumber : (Ligand *et al.*, 2012)

Vitamin E terdiri dari campuran tokoferol dan tokotrienol disintesis oleh tanaman dari asam homogenestik (Rimbach, 2010). Zat-zat ini hadir dalam delapan homolog yang berbeda; yaitu, α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol, α -tokotrienol, β -tokotrienol, γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol (Syairah *et al.*, 2018). Keempat jenis tokoferol ini memiliki 16 rantai samping karbon isoprenoid jenuh, sementara itu tokotrienol memiliki rantai isoprenoid serupa, mengandung tiga ikatan rangkap (rantai samping tidak jenuh). Penamaan tokotrienol didasarkan dari letak dan jumlah gugus metil pada cincin fenol. Homolog α , β , γ , dan δ masing-masing mengandung tiga, dua, dua dan satu gugus metil. Perbedaan struktur dan isomer menentukan aktivitas biologis, dengan α -homolog memiliki aktifitas biologis tertinggi (Rimbach *et al.*, 2002).

Perbedaan antara tokoferol dan tokotrienol adalah adanya tiga ikatan rangkap pada posisi 3', 7', dan 11' pada rantai samping yang terakhir. Keberadaan tiga kiral pusat bertanggung jawab atas keberadaan delapan stereoisomer untuk setiap tokoferol, sementara setiap tokotrienol hanya memiliki dua stereoisomer karena kurangnya pusat kiral pada rantai samping. Stabilitas tokoferol dan

tokotrienol dipengaruhi oleh keberadaannya pada suatu bahan dan makanan dari komposisi asam lemak dan fraksi lipid yang berbeda (Hin *et al.*, 2009), cara penyimpanan dan prosedur pengolahan bahan baku untuk pangan (Shahidi *et al.*, 2016).

Vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan pemecah rantai dilaporkan dapat melindungi membran seluler terhadap ROS (*Radical Oxygen Scavenging*), misalnya dengan mempertahankan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dari auto-oksidasi. Antioksidan seperti vitamin E telah dilaporkan efisien, dan penggunaannya dalam gangguan reproduksi dan kehamilan telah menjadi subjek yang signifikan dalam uji klinis (Syairah *et al.*, 2018).

Fraksi minyak kelapa yang diperkaya tokotrienol memiliki efek anti-hiperglikemia dengan meningkatkan pemanfaatan glukosa tubuh dan sensitivitas insulin dari tikus diabetes. Bahan makanan yang memiliki tokoferol tinggi mampu menstimulasi penurunan berat badan, intervensi diet, serta bermanfaat dalam pencegahan dan manajemen diabetes (Shahidi *et al.*, 2016).

Penggunaan suplemen vitamin E dan asupan makanan tinggi vitamin E berpengaruh pada peningkatan fungsi paru-paru (Hanson *et al.*, 2016; Hoskins *et al.*, 2012). Pada tikus yang terpapar asap rokok 2 bulan, γ -tokotrienol memperbaiki penebalan epitel bronkial dan penghancuran kantung alveolar di paru-paru, dan meningkatkan fungsi paru-paru. Dibandingkan dengan prednisolon, γ -tokotrienol menunjukkan kemanjuran anti-oksidatif yang lebih baik, dan perlindungan terhadap emfisema dan fungsi paru-paru. Selain itu, γ -tokotrienol mampu menipiskan lesi emfisematosa dan meningkatkan fungsi paru-paru pada penderita penyakit paru kronis. γ -Tokotrienol mungkin memiliki potensi terapeutik untuk pengobatan COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) (Yong *et al.*, 2017).

2.6.3 Karotenoid

Karotenoid merupakan kelompok pigmen isoprenoid yang umum ditemukan dan disintesis oleh organisme fotosintetik (termasuk tanaman), beberapa bakteri dan jamur non-fotosintesis (Moran dan Jarvik, 2012). Karotenoid mampu membentuk warna kuning, oranye, dan merah yang mempengaruhi pigmen pada tumbuhan dan tersebar luas di alam (Sugawara *et al.*, 2009). Senyawa ini terdapat pada lebih dari 700 spesies dan mempengaruhi pigmen pada spesies tersebut.

Sebagian besar karotenoid dapat ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, terutama pada bagian daun, bunga dan buah-buahan. Binatang tidak mampu

memproduksi karotenoid sehingga karotenoid pada hewan diperoleh dari sumber-sumber tersebut. Karotenoid secara struktural dibagi menjadi dua kelompok utama:

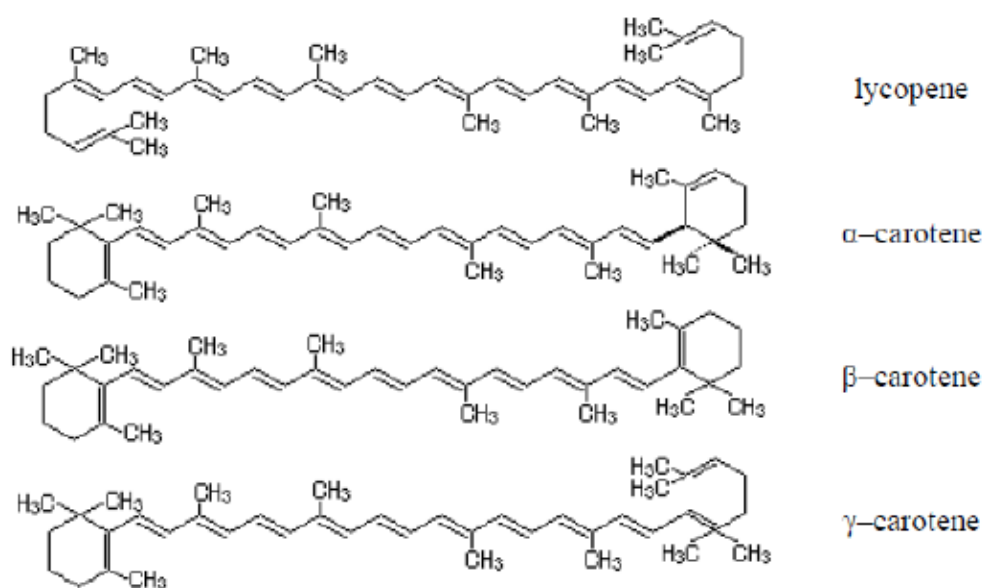
1. Pertama, karoten (α -karoten, β -karoten, dan lycopene), yang merupakan kelompok hidrokarbon dan kedua,
2. xantofil (lutein, zeaxanthin, fucoxanthin dan astaxanthin) (Pérez-Rodríguez, 2009). Struktur kimia karoten (misalnya, likopen dan β -karoten), dan xantofil (misalnya, lutein, β -criptoxanthin, zeaxanthin, astaxanthin dan fucoxanthin) (Jaswir *et al.*, 2011)

Minyak sawit kasar merupakan komoditas nabati yang memiliki kadar karotenoid tertinggi (sekitar 15 kali lebih banyak dibandingkan wortel). Tubuh manusia mensintesis karoten sebagai Vitamin A. Karotenoid juga meningkatkan fungsi kekebalan tubuh pada berbagai mekanisme, serta dapat ditingkatkan kesehatan jantung. Karoten juga berperan penting secara biologis dengan bertindak sebagai antioksidan, melindungi sel dan jaringan dari kerusakan akibat radikal bebas. Paparan radikal bebas yang memicu oksidasi pada tubuh manusia diantaranya polutan asap rokok, polusi industri, stress, diet tidak seimbang, pestisida dan residu insektisida dalam makanan dan air, serta pengaruh lingkungan negatif lainnya (Mukherjee dan Mitra, 2009).

Karakter karotenoid yang rentan terhadap oksidasi menyebabkan karotenoid rentan terhadap paparan panas berlebih, cahaya, asam, dan waktu ekstraksi yang lama. Jenis karoten dengan jumlah tertinggi pada kelapa sawit yaitu α -karoten dan β -karoten. Keduanya bersifat hidrofobik, umumnya diekstraksi secara konvensional menggunakan pelarut organik diantaranya dengan pelarut non-polar, seperti heksana, petroleum eter atau tetrahidrofur (THF) (Mukherjee dan Mitra, 2009).

Metode yang umumnya digunakan untuk ekstraksi karotenoid dari bahan alami dapat diklasifikasikan pada lima kategori utama: i) ekstraksi cair atmosfer dengan Soxhlet, maserasi, gelombang mikro (*Microwave Assisted Extraction* dan *Ultrasonic Assisted Extraction*); ii) ekstraksi pelarut yang dipercepat (*Accelerated Solvent Extraction*), ataupun ekstraksi cair bertekanan (*Pressurized Liquid Extraction*); iii) Ekstraksi berbantuan medan listrik (*Pulsed Electric Field*); iv) ekstraksi cairan superkritis (*Supercritical Fluid Extraction*), yang sering didasarkan pada penggunaan CO₂ superkritis (SCCO₂) sebagai pelarut, dengan penggunaan minimal pelarut co-organik seperti etanol; dan v) ekstraksi dengan bantuan enzim (*Enzyme Assisted Extraction*) (Saini dan Keum, 2018).

Karotenoid berkontribusi dalam membentuk warna oranye-merah yang khas pada minyak kelapa sawit, serta memberikan peran dalam stabilitas dan nilai gizi minyak kelapa sawit. Peran karotenoid sebagai antioksidan dan tingginya komposisi asam lemak *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) akan memicu stabilitas oksidatif pada minyak kelapa sawit (Chiu *et al.*, 2009). Kandungan karotenoid tertinggi pada minyak kelapa sawit yaitu α - dan β -karoten (400–3500 mg/kg) yang merupakan lebih dari 80% dari total karoten dalam minyak kelapa sawit.



Gambar 2.3 Struktur Karotenoid (Butnariu, 2016)

Aplikasi utama karoten adalah sebagai pewarna makanan dan obat-obatan. Karoten dapat bertindak sebagai sumber provitamin A atau sebagai antioksidan yang dapat mencegah perkembangan penyakit seperti kulit kasar, kelemahan selaput lendir, dan kanker. Karotenoid dapat melindungi tubuh terhadap jenis kanker tertentu dengan membatasi pertumbuhan sel yang tidak normal. Selain itu, karotenoid dapat mencegah penyakit jantung dengan menghalangi formasi dan oksidasi lipoprotein densitas rendah (Eggersdorfer *et al.*, 2018). Pada penelitian Kasperczyk *et al.*, (2014), penambahan beta karoten dapat menurunkan logam timbal pada darah pekerja tambang, serta peningkatan level glutation pada pemberian beta karoten, dimana glutation berfungsi sebagai antioksidan alami.

2.3.4 Fitosterol

Fitosterol merupakan senyawa yang memiliki struktur dan fungsi yang menyerupai kolesterol, dan ditemukan pada tanaman. Terdapat lebih dari 200 jenis fitosterol dan konsentrasi fitosterol tertinggi ditemukan pada komoditas minyak nabati, polong-polongan dan kacang-kacangan (Rawal *et al.*, 2015).

Fitosterol merupakan analog kolesterol yang dikelompokkan sebagai lipid fungsional. Senyawa ini ditemukan secara eksklusif pada tanaman, terutama dalam fraksi minyak dan lemak tumbuhan. Saat ini, fitosterol komersial merupakan produk sampingan dari penyulingan minyak sayur industri pulp kayu. Fitosterol atau sterol tumbuhan memiliki efek hipokolesterolemia pada tubuh (Leong *et al.*, 2011).

Fitosterol secara struktural mirip dengan kolesterol, terjadi secara alami dalam makanan yang berasal dari tumbuhan, dan mengurangi kolesterol penyerapan dan kolesterol LDL plasma. Karena efek kesehatan yang berpotensi bermanfaat ini, maka *US National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* merekomendasikan penambahan fitosterol 2,0 g / hari pada diet orang dewasa untuk mengurangi kolesterol LDL dan resiko penyakit jantung koroner (Lin *et al.*, 2011)

Komponen utama dari fitosterol sawit adalah beta-sitosterol, campesterol dan stigmasterol (Estiasih dan Ahmadi, 2018). Fitokimia seperti fitosterol (0,6%) adalah terkandung dalam PFAD dan ini dapat diisolasi pada bentuk terkonsentrasi untuk aplikasi dalam nutraceuticals dan makanan fungsional (Estiasih dan Ahmadi, 2018).

Komponen lipid fungsional seperti fitosterol memiliki aktivitas antioksidan dan senyawa ini berfungsi sebagai agen terapi dalam mencegah penyakit kardiovaskular dan kanker. Selain itu, fitosterol dapat menurunkan kolesterol total dan efek anti-karsinogenik pada studi hewan dan manusia. β -Sitosterol, salah satu jenis fitosterol diaplikasikan sebagai suplemen kesehatan yang berfungsi sebagai profilaksis dan terapeutik untuk berbagai penyakit fisik seperti arteriosklerosis, kanker prostat jinak, dan kanker usus besar (Nyam *et al.*, 2009)

BAB III KERANGKA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian

DALMS merupakan produk sampingan dari pemurnian fisik produk minyak sawit mentah dan terdiri dari asam lemak bebas (81,7%), gliserida (14,4%), skualen (0,8%), vitamin E (0,5%), sterol (0,4%) dan zat lain (2,2%). DALMS digunakan dalam industri pakan ternak dan sabun cuci serta bahan baku untuk industri oleokimia (Top, 2010). Bioaktif multikomponen pada DALMS diperoleh dengan mengekstrak fraksi tidak tersabunkan (FTT), dan menghilangkan fraksi tersabunkan pada komponen DALMS. Tahap ini dapat dilakukan dengan saponifikasi.

Saponifikasi pada minyak merupakan reaksi yang terjadi pada sistem KOH-etanol dengan minyak untuk membentuk gliserol dan asam lemak. Produksi asam lemak dan gliserol pada minyak berperan penting terutama pada industri oleokimia. Keduanya banyak digunakan sebagai bahan baku dalam makanan, industri farmasi, produksi sabun, deterjen sintetis, dan kosmetik. Saponifikasi lemak umumnya dilakukan di laboratorium dengan destilasi balik minyak dan lemak dengan katalis yang berbeda. Reaksi saponifikasi dapat dikatalis oleh asam, basa, atau enzim lipase, selain itu reaksi ini juga dapat terjadi tanpa katalis dengan suhu dan tekanan tertentu. Sumber enzim lipase yang digunakan dalam saponifikasi minyak diantaranya dari *Aspergillus niger*, *Rhizopus javanicus*, dan *Penicillium solitum* (Salimon *et al.*, 2012).

Pembentukan sabun diperoleh dari proses saponifikasi alkali dengan minyak dan lemak. Saponifikasi menggunakan alkali lebih direkomendasikan pada lemak yang sensitif terhadap panas. Penggunaan kalium hidroksida berperan sebagai pengkatalis dalam hidrolisis ester. Penggunaan KOH sebagai katalis memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu menghasilkan reaksi saponifikasi yang irreversibel serta hasil dari saponifikasi lebih mudah untuk dipisahkan (Pinto dan Lanças, 2006). Beberapa faktor yang mempengaruhi saponifikasi yaitu konsentrasi KOH, etanol, suhu reaksi, dan waktu reaksi (Salimon *et al.*, 2012).

Proses saponifikasi dan ekstraksi FTT pada DALMS dimulai dengan mereaksikan DALMS dengan alkohol, basa KOH, dan asam askorbat pada suhu dan waktu tertentu. Pada proses ini homogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* dapat membantu mempercepat reaksi saponifikasi (Ayoola *et al.*, 2016; Kumar dan

Krishna, 2014). Jenis alkohol yang umumnya digunakan pada tahap saponifikasi pada umumnya yaitu etanol dan metanol.

Gugus alkil pada asam lemak mengandung atom karbon dan hidrogen yang disusun dalam satu rantai. Saat KOH dan lemak pada DALMS bereaksi, akan menghasilkan gliserol dan sabun. Pada gliserol dari hasil saponifikasi terikat oleh tiga asam lemak yang disebut trigliserida. Asam lemak terdiri dari rantai karbon yang panjang diakhiri dengan gugus asam karboksilat. Trigliserida disebut lemak jika berbentuk padat pada suhu kamar dan disebut minyak apabila trigliserida berbentuk cair pada suhu kamar. Trigliserida bereaksi dengan kalium hidroksida. Ikatan antara atom karbon gliserol dan atom oksigen asam karboksilat akan rusak, sehingga atom oksigen mengambil atom kalium dari kalium hidroksida sehingga rantai asam lemak larut dalam air. Garam kalium dari asam lemak disebut sabun. Kelompok hidroksida (OH) dari kalium hidroksida melekat pada molekul gliserol. Sabun (RCOOK) mempunyai bagian yang bersifat hidrofil (-COO-) dan bagian yang bersifat hidrofob (R- atau alkil). Bagian karboksil akan menuju air dan menghasilkan buih, sedangkan alkil (R-) menjauhi air dan membelah molekul menjadi partikel yang lebih kecil sehingga air mudah membentuk emulsi. Air adalah senyawa polar dan DALMS merupakan senyawa non polar. Sehingga keduanya sukar bercampur, oleh karena itu emulsinya mudah pecah. Hasil dari reaksi penyabunan ini selain sabun, yaitu gliserol. Gliserol inilah yang menyebabkan sabun bersifat licin.

Tahap ekstraksi diperlukan setelah dilakukan saponifikasi. FTT diperoleh dengan melakukan ekstraksi, metode yang digunakan yaitu ekstraksi cair-cair, dengan menggunakan pelarut non polar, antara lain heksan, petroleum eter, atau iso oktan (Kumar dan Krishna, 2014; Cantrill *et al.*, 2008). Pemisahan sabun yang terbentuk antara fraksi tersabunkan dan fraksi tidak tersabunkan dilakukan dengan menambahkan akuades pada tahap ekstraksi. Akuades mampu melarutkan fraksi tersabunkan yang terbentuk pada proses saponifikasi sehingga fraksi tersabunkan dan fraksi tidak tersabunkan akan semakin terpisah. Sabun yang dihasilkan dari reaksi katalis kalium dan minyak memiliki tekstur yang lunak sehingga mudah larut dalam air (Olabanji *et al.*, 2012). Fraksi tidak tersabunkan yang masih mengandung pelarut non polar kemudian dilakukan evaporasi guna menghilangkan pelarut, sehingga akan dihasilkan FTT bebas pelarut. Rendemen fraksi tidak tersabunkan bebas pelarut yang dihasilkan pada tahap saponifikasi

DALMS berkisar antara 1,0–2,5% (Ahmed *et al.*, 2018; Cheah *et al.*, 2010; Top, 2010; Tay *et al.*, 2009).

Pada tahap saponifikasi DALMS diperlukan etanol sebagai fasilitator reaksi antara KOH, asam askorbat dan lemak sehingga lemak akan terhidrolisis menjadi asam lemak dan gliserol. Peran etanol sebagai pereaksi digunakan untuk melarutkan lemak pada DALMS, KOH, dan asam askorbat yang memiliki tingkat kepolaran berbeda. KOH dan asam askorbat bersifat polar karena memiliki gugus (OH) dan lemak pada DALMS bersifat non polar karena memiliki atom karbon dan hidrogen (CH+). Penggunaan alkohol dapat mempermudah lemak untuk bercampur dan bereaksi dengan KOH dan asam askorbat.

Penggunaan pelarut etanol yang bersifat polar dilakukan untuk melarutkan fraksi tersabunkan dan trigliserida pada DALMS. Semakin banyak jumlah pelarut dengan jumlah bahan yang sama maka perbedaan konsentrasi antara bahan dengan pelarut akan semakin besar. Dalam hal ini pelarut akan lebih mudah masuk ke dalam bahan yang mempunyai konsentrasi yang lebih rendah dan proses pelarutan asam lemak akan berjalan lebih cepat dibandingkan dengan jumlah pelarut yang lebih sedikit. Akibatnya akan semakin banyak trigliserida yang dapat terlarut bersama dengan alkohol sehingga rendemen meningkat.

Heksana digunakan untuk melarutkan FTT selama proses penyabunan. Akuades sebagai pelarut pada proses penyabunan digunakan untuk melarutkan fraksi tersabunkan dan asam lemak bebas pada DALMS. Akuades akan bekerja secara sinergis dengan etanol dalam membentuk fraksi sabun. Fraksi sabun yang terlarut oleh air dan etanol akan terbentuk di lapisan bawah, membentuk cairan keruh keputihan dan akan terbentuk buih di antara fraksi tersabunkan dan fraksi tidak tersabunkan.

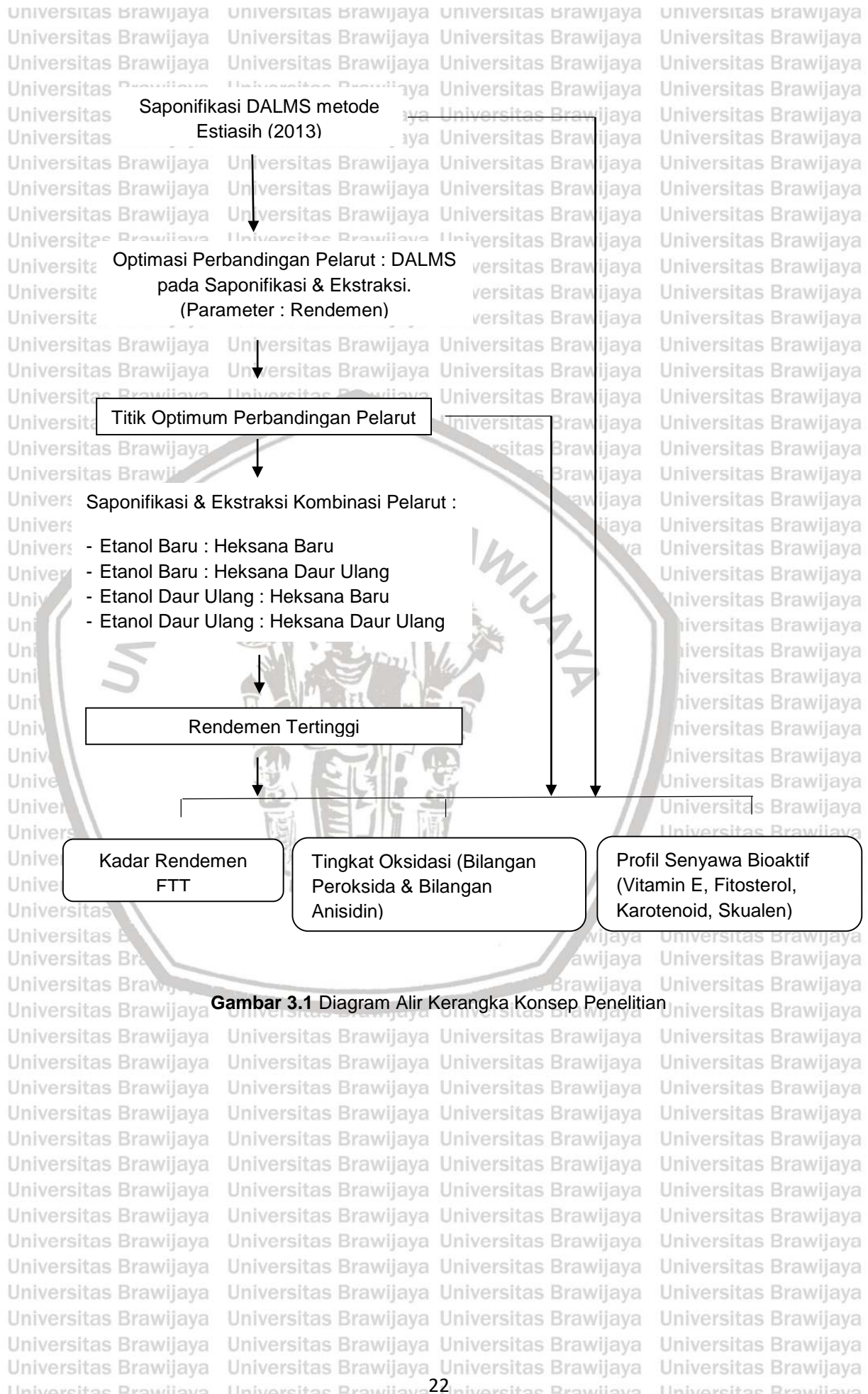
Peningkatan efisiensi ekstraksi kadar FTT dapat dilakukan dengan mencari variasi perbandingan pelarut yang paling optimal sehingga dapat diperoleh nilai FTT tertinggi. Pelarut digunakan untuk memisahkan fraksi tersabun dan fraksi tidak tersabunkan pada DALMS. Fraksi tersabunkan akan larut pada pelarut polar dan membentuk buih pada reaksi homogenisasi, sedangkan FTT akan larut pada pelarut non polar. Pelarut yang digunakan pada proses saponifikasi yaitu etanol, heksana, dan aquades. Ketiga pelarut tersebut memiliki takaran yang berbeda-beda pada saat penggunaan.

Efektivitas pelarut pada proses saponifikasi DALMS sangat dipengaruhi oleh jumlah pelarut yang digunakan. Pemberian rasio perbandingan pelarut yang

terlalu sedikit jika dibandingkan dengan bahan baku menyebabkan reaksi hidrolisis lemak kurang maksimal, sehingga pemisahan antara fraksi tersabunkan dan FTT tidak berjalan optimal. Hal ini menyebabkan pemilihan rasio jumlah perbandingan pelarut menjadi faktor yang sangat kritis. Penggunaan pelarut baru dan daur ulang juga merupakan hal yang kritis sebab berpengaruh pada efektivitas reaksi saponifikasi.

Pelarut daur ulang merupakan pelarut bekas pakai proses saponifikasi dan ekstraksi FTT yang nantinya akan digunakan ulang untuk saponifikasi dan ekstraksi FTT. Pada penelitian ini pelarut yang akan didaur ulang yaitu etanol dan heksana. Etanol dan heksana merupakan pelarut yang memerlukan perlakuan khusus sebelum dibuang agar dapat terdegradasi di lingkungan. Penggunaan etanol dan heksana daur ulang diharapkan dapat mengurangi pencemaran lingkungan. Disisi lain, heksana merupakan pelarut non polar yang terbuat dari sumber daya alam yang tidak terbarukan yaitu minyak bumi. Penggunaan heksana daur ulang diharapkan dapat mengurangi pemakaian sumber daya alam tak terbarukan. Penggunaan pelarut daur ulang pada saponifikasi dan ekstraksi FTT diharapkan dapat menghasilkan proses yang lebih ramah lingkungan. Daur ulang pelarut dilakukan dengan memisahkan pelarut dan senyawa yang terlarut berdasarkan titik didihnya. Pada penelitian ini, pelarut daur ulang yang digunakan adalah pelarut bekas pakai untuk satu kali saponifikasi dan ekstraksi.

Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan dua tahap penelitian. Tahap pertama akan dilakukan proses optimasi saponifikasi DALMS dengan metode permukaan respon dengan faktor yang dikaji adalah rasio sampel dan jumlah pelarut. Pada penelitian tahap dua, penggunaan heksan dan etanol hasil daur ulang pada tahap pertama diuji cobakan pada perlakuan terbaik yang dihasilkan di tahap pertama. Rancangan yang digunakan pada penelitian tahap dua berupa Rancangan Acak Lengkap. Adapun parameter yang diamati yaitu : Rendemen, bilangan peroksida, bilangan anisidin, kadar bioaktif (vitamin E, skualen, fitosterol, dan karoten).



Saponifikasi DALMS metode Estiasih (2013)

Optimasi Perbandingan Pelarut : DALMS pada Saponifikasi & Ekstraksi. (Parameter : Rendemen)

Titik Optimum Perbandingan Pelarut

Saponifikasi & Ekstraksi Kombinasi Pelarut :

- Etanol Baru : Heksana Baru
- Etanol Baru : Heksana Daur Ulang
- Etanol Daur Ulang : Heksana Baru
- Etanol Daur Ulang : Heksana Daur Ulang

Rendemen Tertinggi

Kadar Rendemen FTT

Tingkat Oksidasi (Bilangan Peroksida & Bilangan Anisidin)

Profil Senyawa Bioaktif (Vitamin E, Fitosterol, Karotenoid, Skualen)

Gambar 3.1 Diagram Alir Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Kerangka Operasional Penelitian

DALMS merupakan produk samping dari pemurnian fisik produk minyak sawit mentah dan terdiri dari asam lemak bebas (81,7%), gliserida (14,4%), skualen (0,8%), vitamin E (0,5%), sterol (0,4%) dan zat lain (2,2%). DALMS digunakan dalam industri pakan ternak dan sabun cuci serta bahan baku untuk industri oleokimia (Top, 2010). Bioaktif multikomponen pada DALMS diperoleh dengan mengekstrak fraksi tidak tersabunkan (FTT), dan menghilangkan fraksi tersabunkan pada komponen DALMS. Tahap ini dapat dilakukan dengan saponifikasi.

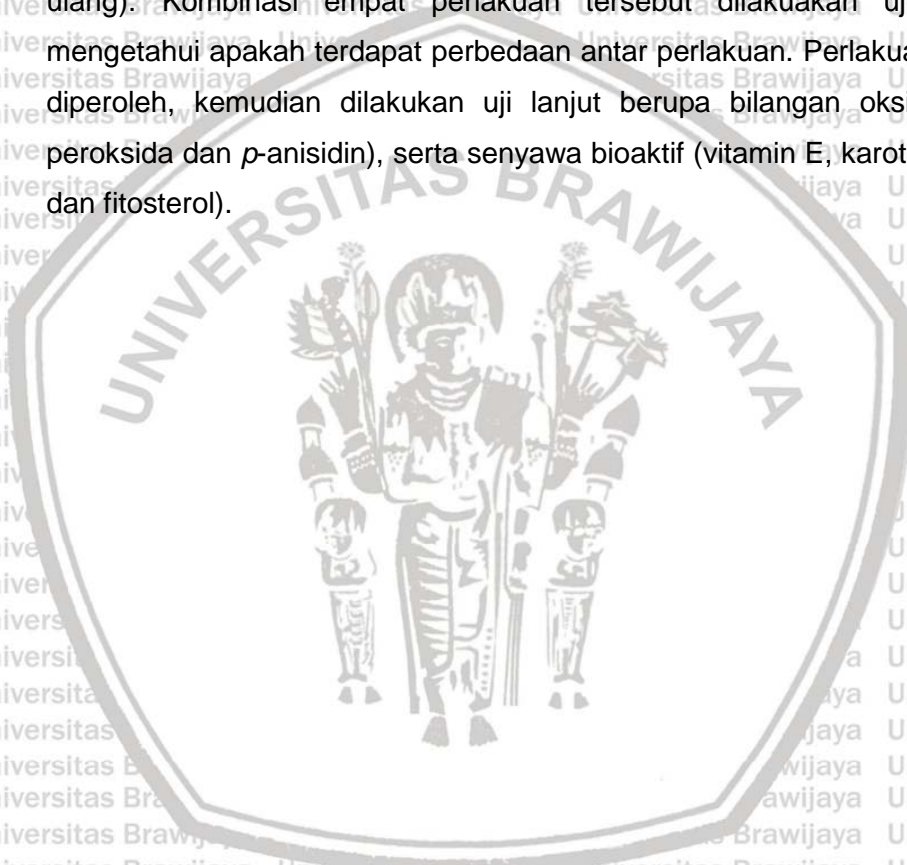
Proses saponifikasi dan ekstraksi FTT pada DALMS dimulai dengan mereaksikan DALMS dengan alkohol, basa KOH, dan asam askorbat pada suhu dan waktu tertentu. Pada proses ini homogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* dapat membantu mempercepat reaksi saponifikasi (Ayoola *et al.*, 2016; Kumar dan Krishna, 2014). Proses saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS menggunakan 3 pelarut yaitu alkohol, heksana, dan akuades. Jenis alkohol yang digunakan pada saponifikasi yaitu etanol dan metanol. Heksana dan akuades digunakan untuk mengekstraksi FTT DALMS. Ekstraksi dilakukan dengan metode cair-cair, dimana FTT yang bersifat nonpolar akan terlarut dengan pelarut nonpolar.

Saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS memerlukan banyak pelarut. Menurut Estiasih (2013), rasio pelarut : DALMS yang diperlukan yaitu etanol : DALMS (8:1), heksana : DALMS (15:1) dan akuades : DALMS (20:1). Penggunaan pelarut pada saponifikasi dan ekstraksi menggunakan terlalu banyak pelarut. Limbah pelarut saponifikasi dan ekstraksi memerlukan pengolahan khusus karena sifatnya yang cenderung nonpolar. Selain itu, heksana merupakan pelarut yang berasal dari minyak bumi sehingga berasal dari sumber daya alam tak terbarukan dan penggunaannya perlu diminimalisir.

Diperlukan optimasi pelarut : DALMS untuk menghasilkan proses saponifikasi dan ekstraksi. Optimasi diharapkan mampu menghasilkan rendemen DALMS tinggi dengan penggunaan pelarut yang lebih sedikit, sehingga mampu menekan biaya produksi FTT DALMS. Optimasi dilakukan dengan mencari batas atas dan batas bawah dari masing-masing pelarut, kemudian data yang diperoleh dimasukkan pada aplikasi *Design Expert 11.0* dan akan diperoleh satu titik optimum etanol : DALMS, heksana : DALMS, dan akuades DALMS. Hasil optimasi

kemudian dilakukan analisa rendemen, bilangan oksidasi (bilangan peroksida dan p -anisidin), serta senyawa bioaktif (vitamin E, karotenoid, skualen, dan fitosterol).

Upaya meminimalisir penggunaan pelarut dapat pula dilakukan dengan melakukan saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS menggunakan pelarut daur ulang. Etanol dan heksana bekas sekali pakai saponifikasi dan ekstraksi dilakukan destilasi sehingga dihasilkan etanol daur ulang dan heksana daur ulang. Pelarut daur ulang digunakan untuk saponifikasi dan ekstraksi, dengan kombinasi perlakuan sebagai berikut : (Etanol baru : heksana baru), (Etanol baru : heksana daur ulang), (Etanol daur ulang : heksana baru), (Etanol daur ulang : heksana daur ulang). Kombinasi empat perlakuan tersebut dilakukan uji lanjut untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar perlakuan. Perlakuan terbaik yang diperoleh, kemudian dilakukan uji lanjut berupa bilangan oksidasi (bilangan peroksida dan p -anisidin), serta senyawa bioaktif (vitamin E, karotenoid, skualen, dan fitosterol).



Produksi,
optimasi, dan
karakterisasi

DALMS

Saponifikasi

Perbedaan rasio pelarut : DALMS

Etanol (E) :
DALMS (D)

- E : D (4 : 1) v/b
- E : D (5 : 1) v/b
- E : D (6 : 1) v/b
- E : D (7 : 1) v/b
- E : D (8 : 1) v/b

Heksana (H) :
DALMS (D)

- H : D (6 : 6) v/b
- H : D (8 : 8) v/b
- H : D (10 : 1) v/b
- H : D (12 : 1) v/b
- H : D (14 : 1) v/b

Akuades (A) :
DALMS (D)

- A : D (10 : 1) v/b
- A : D (12 : 1) v/b
- A : D (14 : 1) v/b
- A : D (16 : 1) v/b
- A : D (20 : 1) v/b

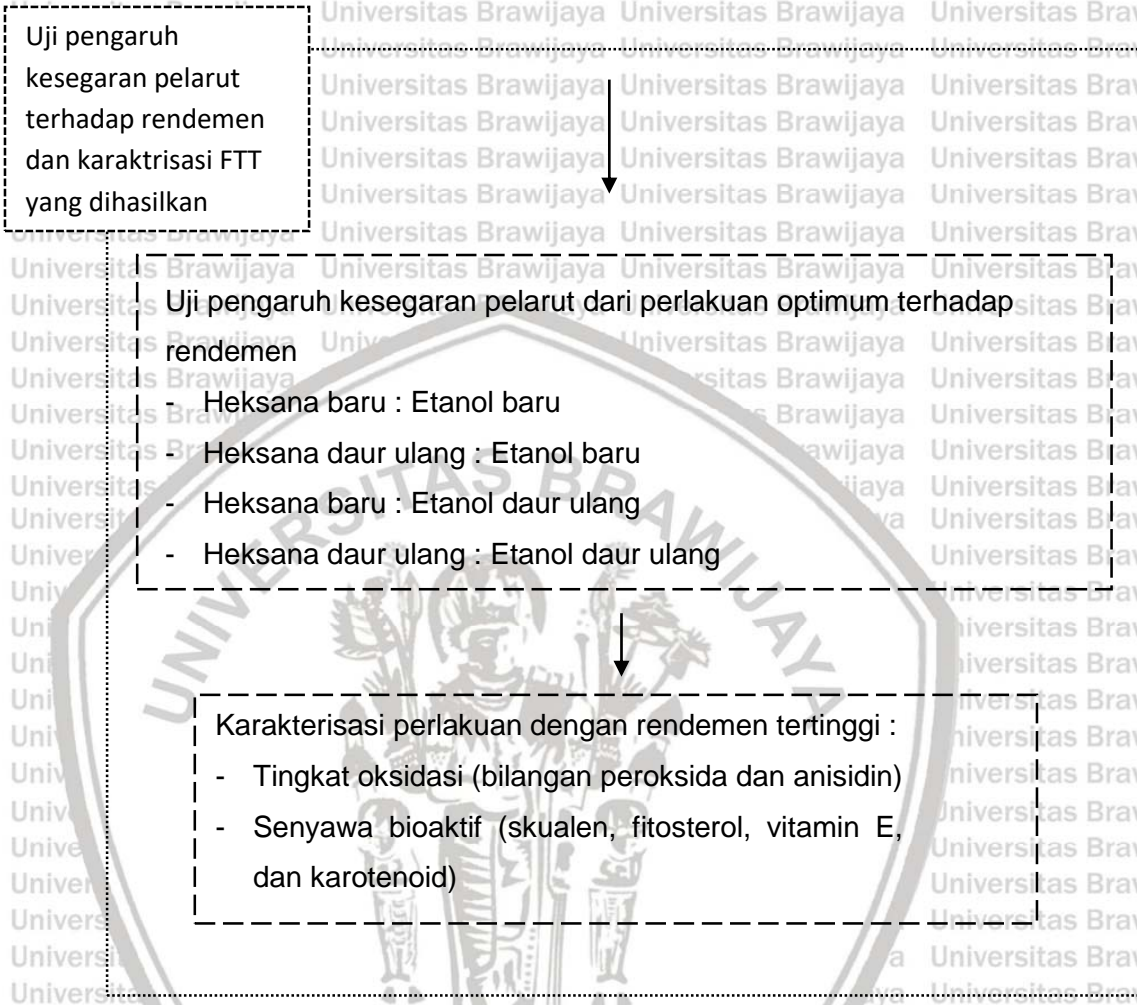
Dilakukan analisa rendemen

Diperoleh batas bawah dan batas atas untuk analisa rancangan komposit pusat metode permukaan respon dari masing-masing jenis pelarut

Dilakukan optimasi rendemen, sehingga dihasilkan satu titik optimum

Karakterisasi perlakuan optimum :

- Tingkat oksidasi (bilangan peroksida dan anisidin)
- Senyawa bioaktif (skualen, fitosterol, vitamin E, dan karotenoid)



Gambar 3.2 Diagram Alir Kerangka Operasional Penelitian

3.3 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Diduga rasio pelarut : DALMS tertinggi merupakan titik optimum saponifikasi dan ekstraksi, sehingga dapat menghasilkan rendemen tertinggi..
2. Diduga penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang yang digunakan pada proses saponifikasi dan ekstraksi akan berpengaruh terhadap rendemen, bilangan oksidasi (peroksida dan *p-anisidin*), dan senyawa bioaktif (skualen, fitosterol, vitamin E, dan karotenoid).

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang untuk analisa karakteristik DALMS. Penelitian dilaksanakan dari bulan Oktober 2018 - Juli 2019.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) yang diambil dari industri pengolahan CPO PT. Salim Ivomas Pratama di Surabaya.

Bahan kimia yang digunakan untuk proses saponifikasi DALMS diperoleh dari CV. Makmur Sejati dan Toko Kimia Panadia, Malang. Bahan kimia dengan kemurnian teknis adalah heksana, KOH, etanol 96% (Brataco Chemica), asam askorbat, gas nitrogen dan akuades.

Bahan kimia yang digunakan untuk analisa kadar asam lemak bebas diperoleh dari CV. Makmur Sejati, Malang. Bahan analisa dengan kemurnian p.a (*pro analysis*) adalah NaOH dan etanol (Merck), kecuali bahan kimia yaitu indikator *phenolphthalein*.

Bahan kimia yang digunakan untuk analisa bilangan peroksida diperoleh dari Toko Sari Kimia Raya, Malang. Bahan analisa dengan kemurnian p.a adalah benzene, metanol, H₂O₂, amonium tiosianat, ferro sulfat, HCl 37%, FeCl₃·6H₂O dan HCl 10 N (Merck) sedangkan bahan analisa dengan kemurnian teknis adalah akuades.

Bahan kimia yang digunakan untuk analisa bilangan anisidin diperoleh dari Toko Kimia Raya, Malang. Bahan analisa dengan kemurnian p.a adalah asam asetat glasial, *iso-octane* (Merck), reagen *p*-anisidin, kecuali bahan dengan kemurnian teknis yaitu akuades.

Bahan kimia yang digunakan untuk analisa senyawa bioaktif dengan HPLC (tokoferol, tokotrienol, fitosterol, skualen, dan karoten) dengan kemurnian p.a adalah etanol, metanol, aquabides, heksana, diklorometan, asetonitril (HPLC *grade*). Standar yang digunakan adalah standar tokotrienol (α , δ , γ -tokotrienol) "Sigma Aldrich", standar tokoferol (α -tokoferol), fitosterol (β -sitosterol,

Stigmasterol, Kampesterol), karoten (α -karoten dan β -karoten) skualen “Sigma Aldrich”.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk proses saponifikasi DALMS meliputi timbangan analitik “Denver Instrument M. 310”; corong pemisah, *freezer* “GEA”, *refrigerator* “Sharp”, *rotary vacuum evaporator* “Buchi Rotarovorator R-200”, *thermometer*, *shaker water bath* “Memmert”, labu ukur 500 ml (Pyrex), *hotplate*, gelas beaker 250 ml (Pyrex), Erlenmeyer 250 ml (Pyrex), spatula, *aluminium foil*, tisu, kertas label dan wadah plastik.

Alat yang digunakan untuk analisa bilangan peroksida dan anisidin adalah bola hisap, tisu, kertas label, gelas beaker 100 ml (Pyrex), pipet volume 1 ml dan 10 ml (HG), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung kayu dan Spektrofotometer 20D Plus “LaboMed”.

Alat yang digunakan untuk analisa HPLC adalah botol *cell*, suntik injeksi, penyaring vakum, kertas saring dan seperangkat alat HPLC “Shimadzu LC-20AT kolom ODS 250x4,6 mm, kecepatan aliran 1 mL/menit, detektor UV SPD-20A”.

4.3. Rancangan Percobaan

4.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan batas atas dan batas bawah pada perbandingan etanol, heksana, dan akuades berdasarkan nilai rendemen tertinggi yang dihasilkan. Pada penelitian yang sebelumnya telah dilaksanakan oleh Estiasih (2014), masing-masing perbandingan penggunaan etanol : DALMS sebesar 8:1, heksana : DALMS sebesar 15:1, dan akuades : DALMS sebesar 20:1.

Penelitian pendahuluan diawali dengan menentukan variasi perbandingan etanol untuk saponifikasi, sedangkan perbandingan heksana dan akuades untuk ekstraksi menggunakan metode Estiasih (2014). Begitupula dengan penentuan variasi perbandingan heksana dan akuades. Variasi perbandingan pelarut : DALMS yang diuji berdasarkan pada tabel berikut :

Tabel 4.1 Penelitian Pendahuluan Penentuan Perbandingan Etanol yang Menghasilkan Rendemen Tertinggi

| Etanol:DALMS | Heksana:DALMS ^a | Akuades:DALMS ^a |
|--------------|----------------------------|----------------------------|
| 4:1 | 15:1 | 20:1 |
| 5:1 | 15:1 | 20:1 |
| 6:1 | 15:1 | 20:1 |
| 7:1 | 15:1 | 20:1 |
| 8:1 | 15:1 | 20:1 |

Sumber : a. Estiasih (2014)

Tabel 4.2 Penelitian Pendahuluan Penentuan Perbandingan Heksana yang Menghasilkan Rendemen Tertinggi

| Etanol:DALMS ^a | Heksana:DALMS | Akuades:DALMS ^a |
|---------------------------|---------------|----------------------------|
| 8:1 | 6:1 | 20:1 |
| 8:1 | 8:1 | 20:1 |
| 8:1 | 10:1 | 20:1 |
| 8:1 | 12:1 | 20:1 |
| 8:1 | 14:1 | 20:1 |

Sumber : a. Estiasih (2014)

Tabel 4.3 Penelitian Pendahuluan Penentuan Perbandingan Akuades yang Menghasilkan Rendemen Tertinggi

| Etanol:DALMS ^a | Heksana:DALMS ^a | Akuades:DALMS |
|---------------------------|----------------------------|---------------|
| 8:1 | 15:1 | 10:1 |
| 8:1 | 15:1 | 12:1 |
| 8:1 | 15:1 | 14:1 |
| 8:1 | 15:1 | 16:1 |
| 8:1 | 15:1 | 20:1 |

Sumber : a. Estiasih (2014)

Pada penelitian pendahuluan diperoleh nilai rendemen tertinggi pada perbandingan etanol : DALMS (6:1), heksana : DALMS (8:1), dan akuades : DALMS (12:1). Perbandingan pelarut : DALMS yang menghasilkan rendemen tertinggi pada penelitian pendahuluan kemudian dijadikan sebagai titik tengah. Sehingga dapat ditarik batas atas dan batas bawah pada masing-masing penggunaan pelarut yaitu etanol : DALMS dengan batas atas 7:1 dan 5:1 sebagai batas bawah. Pada perbandingan heksana : DALMS dengan batas atas 10:1 dan 6:1 sebagai batas bawah, sedangkan pada perbandingan akuades : DALMS memiliki batas atas 14:1 dan 10:1 sebagai batas bawah. Masing-masing batas atas dan batas bawah yang diperoleh pada penelitian pendahuluan kemudian dilanjutkan pada penelitian tahap 1.

4.3.2 Penelitian Tahap 1

Metode penelitian tahap 1 disusun dan dirancang dengan Rancangan Komposit Pusat Metode Permukaan Respon yang terdiri dari tiga variabel yaitu Volume Etanol (X_1), Volume Heksan (X_2), dan Volume akuades (X_3). Respon yang dioptimasi dari fraksi tidak tersabunkan adalah rendemen. Rendemen optimum yang diperoleh dari optimasi pelarut kemudian dilakukan analisa bilangan peroksida, bilangan anisidin, kadar bioaktif meliputi : vitamin E, skualen, fitosterol, ko-enzim Q-10, dan karoten.

Kombinasi dari perlakuan (X_1 , X_2 , dan X_3) dapat dilihat pada Tabel 4.1 sesuai dengan rancangan komposit pusat ordo kedua untuk tiga faktor dan dilakukan dua kali ulangan. Taraf dari tiap variabel yang menghasilkan lima titik respon yang menjadi daerah percobaan penelitian utama dikode dengan interval (+1,628; +1; 0; -1; -1,682). Kode 0 digunakan untuk mengkode taraf variabel yang diduga optimum, sedangkan kode +1,628; +1 dan -1,682; -1 digunakan untuk mengkode daerah percobaan sebelum dan sesudah titik yang diduga optimum. Analisa data dilakukan dengan program *Design Expert* 11.0

Tabel 4.4 Variabel Bebas dan Pengkodean pada Rancangan Komposit Pusat

| No | Variabel Sebenarnya | | | Variabel Terkode | | |
|-----|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------|--------|--------|
| | Rasio Etanol : Sampel | Rasio Heksana : Sampel | Rasio Akuades : Sampel | X_1 | X_2 | X_3 |
| 1. | 5:1 | 6:1 | 10:1 | -1 | -1 | -1 |
| 2. | 5:1 | 6:1 | 14:1 | -1 | -1 | +1 |
| 3. | 5:1 | 10:1 | 10:1 | -1 | +1 | -1 |
| 4. | 5:1 | 10:1 | 14:1 | -1 | +1 | +1 |
| 5. | 7:1 | 6:1 | 10:1 | +1 | -1 | -1 |
| 6. | 7:1 | 6:1 | 14:1 | +1 | -1 | +1 |
| 7. | 7:1 | 10:1 | 10:1 | +1 | +1 | -1 |
| 8. | 7:1 | 10:1 | 14:1 | +1 | +1 | +1 |
| 9. | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 0 | 0 | 0 |
| 10. | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 0 | 0 | 0 |
| 11. | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 0 | 0 | 0 |
| 12. | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 0 | 0 | 0 |
| 13. | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 0 | 0 | 0 |
| 14. | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 0 | 0 | 0 |
| 15. | 4,318:1 | 8:1 | 12:1 | -1,682 | 0 | 0 |
| 16. | 7,682:1 | 8:1 | 12:1 | +1,682 | 0 | 0 |
| 17. | 6:1 | 4,636:1 | 12:1 | 0 | -1,682 | 0 |
| 18. | 6:1 | 11,364:1 | 12:1 | 0 | +1,682 | 0 |
| 19. | 6:1 | 8:1 | 8,636:1 | 0 | 0 | -1,682 |
| 20. | 6:1 | 8:1 | 15,364:1 | 0 | 0 | +1,682 |

Keterangan:

Variabel X_1 = Perbandingan etanol dan DALMS = 5:1, 6:1, 7:1

Variabel X_2 = Perbandingan heksan dan DALMS = 8:1, 9:1, 10:1

Variabel X_3 = Perbandingan akuades dan DALMS = 10:1, 12:1, 14:1

Model permukaan respon ordo kedua menggunakan 3 faktor untuk penelitian ini dapat di rumuskan sebagai berikut:

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

Gambar 4.1 Rumus Model Permukaan Respon Ordo Kedua dengan 3 Faktor

Hasil Rancangan Komposit Pusat Metode Permukaan Respon akan didapatkan satu perlakuan terbaik, dari kombinasi tiga jenis pelarut yang digunakan. Perlakuan terbaik yang diperoleh akan dilakukan uji karakterisasi, lalu dilanjutkan pengujian tahap kedua.

4.3.3 Penelitian Tahap 2

Penelitian tahap 2 bertujuan untuk mengetahui efektivitas penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang. Parameter penelitian tahap 2 yaitu rendemen yang dihasilkan saat saponifikasi. Analisa lanjut dilakukan dengan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Kombinasi jenis pelarut yang digunakan berjumlah empat perlakuan, dengan lima kali ulangan. Sehingga diperoleh 20 satuan percobaan.

Tabel 4.5 Perbandingan Kombinasi Penggunaan Pelarut berdasarkan Kesegaran

| Perbandingan Kombinasi Pelarut Berdasarkan Kesegaran | |
|--|--|
| Rasio sampel : | Heksana baru : Etanol baru |
| pelarut hasil : | Heksana daur ulang : Etanol baru |
| optimasi : | Heksana baru : Etanol daur ulang |
| | Heksana daur ulang : Etanol daur ulang |

Sampel yang pada penelitian tahap dua, selanjutnya dilakukan analisa rendemen. Kemudian dilakukan analisa menggunakan *One Way- Analysis of Variance (one way-ANNOVA)* pada $\alpha = 0,05$ sehingga akan diperoleh perlakuan terbaik. Perlakuan terbaik pada tahap 2 kemudian diukur tingkat oksidasi (bilangan peroksida dan bilangan anisidin), dan senyawa bioaktif (skualen, fitosterol, vitamin E, karotenoid).

4.4. Pelaksanaan Penelitian

4.4.1 Separasi FTT

Pada tahap ini dilakukan saponifikasi pada DALMS agar dapat dilakukan separasi FTT dan fraksi tersabunkan. Tahapan proses saponifikasi adalah sebagai berikut :

1. Bahan utama berupa DALMS ditimbang sebanyak 10 gram, lalu dimasukkan ke erlenmayer 250 ml. Erlenmayer ditutup dengan aluminium foil.
2. Asam askorbat ditimbang sebesar 0,5 gram. Disiapkan etanol 65 ml, dan dibuat larutan KOH 50%. Kemudian 5 ml KOH 50%, asam askorbat, dan etanol dimasukkan dalam erlenmayer.
3. Dilakukan homogenisasi dan pemanasan menggunakan *shaker waterbath* dengan kecepatan maksimum pada suhu 65°C selama 32 menit.
4. Dilakukan pendinginan larutan, kemudian dipindahkan ke corong pisah dan dilakukan pengocokan lambat.
5. Selanjutnya dilakukan pendiaman hingga terbentuk 2 lapis. Lapisan atas mengandung fraksi tidak tersabunkan (FTT), sedangkan lapisan bawah mengandung fraksi tersabunkan (FT).
6. Kemudian dilakukan pemisahan, sehingga diperoleh FTT yang masih terlarut dalam heksan.
7. FTT terlarut pada heksan dilakukan separasi dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 45°C dengan tekanan 200 mbar
8. Dihasilkan FTT bebas pelarut.
9. FTT bebas pelarut kemudian dilakukan analisa kadar rendemen dan karakterisasi.

4.4.2 Proses Daur Ulang Heksana

1. FTT terlarut pada heksana dituangkan pada labu *rotary evaporator*
2. Rangkaian alat *rotary evaporator* disiapkan
3. Suhu *water bath* diatur 45°C dengan tekanan 200 mbar

4. Heksana daur ulang akan tertampung dalam labu hasil destilasi
5. Proses dihentikan ketika FTT pada labu *rotary evaporator* sudah pekat
6. Heksana daur ulang disimpan pada wadah tertutup rapat

4.4.3 Proses Daur Ulang Etanol

1. FT diletakkan pada labu destilasi
2. Rangkaian destilasi yang terdiri dari elektrotermal, termometer, kondensor, tabung penghubung, dan labu hasil destilasi dirangkai.
3. Elektrotermal dinyalakan, dan suhu labu destilasi dikondisikan pada suhu 80 °C hingga etanol menguap dan terkondensasi pada labu hasil destilasi.
4. Destilasi dihentikan jika sudah tidak ada etanol yang terkondensasi pada labu hasil destilasi.

4.5 Pengamatan dan Analisa

4.5.1 Pengamatan Penelitian

DALMS sebagai bahan baku dikarakterisasi awal meliputi:

1. Rendemen FTT (Hasnaeni *et al.*, 2019)
2. Bilangan peroksida (ISO 3976, 2006; Mehta *et al.*, 2015)
3. Bilangan anisidin (Paquot, 1979)
4. Kadar Tokoferol dan Tokotrienol dengan HPLC (Nielsen dan Hansen, 2008)
5. Kadar Fitosterol dengan HPLC (Khatoun *et al.*, 2010)
6. Kadar Skualen dengan HPLC (Mendez *et al.*, 2003)
7. Kadar Beta-Karoten dengan HPLC (Nells dan Leenheer, 1983)

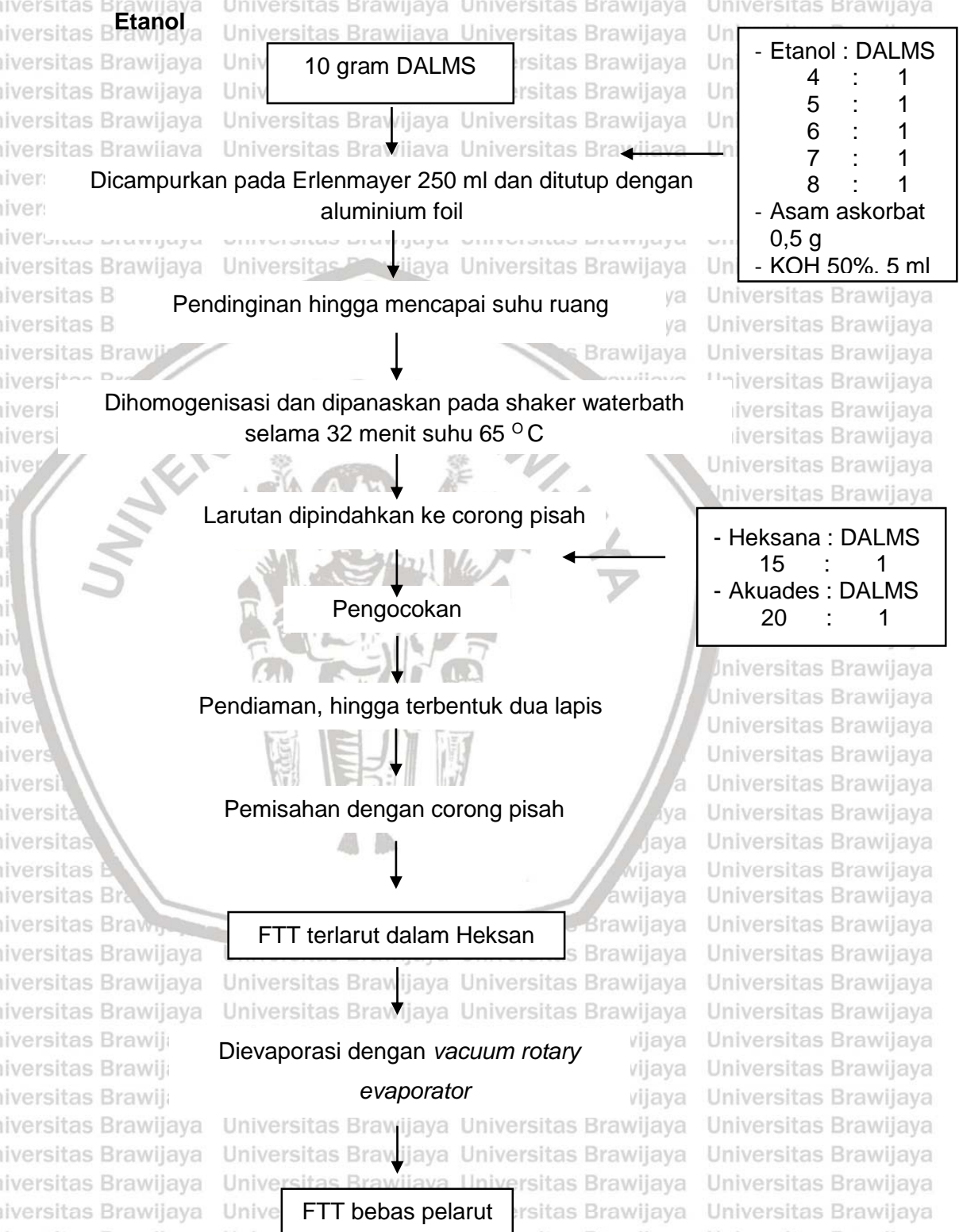
4.5.2. Analisa Data

Data hasil karakterisasi FTT diperoleh dari berbagai kombinasi perlakuan perbandingan sampel : pelarut, dilakukan optimasi menggunakan metode Rancangan Komposit Pusat Metode Permukaan Respon untuk menemukan perlakuan terbaik yang paling optimum. Optimasi FTT dilakukan menggunakan software *Design Expert* 11.0. Hasil optimasi FTT kemudian dilakukan uji lanjut untuk mengetahui efektifitas penyabunan menggunakan kombinasi pelarut baru dan pelarut daur ulang yang telah digunakan untuk satu kali uji. Uji lanjut pada FTT dilakukan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) sehingga diperoleh perlakuan terbaik dari kombinasi penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang pada pelarut etanol dan heksan.

4.6 Diagram Alir

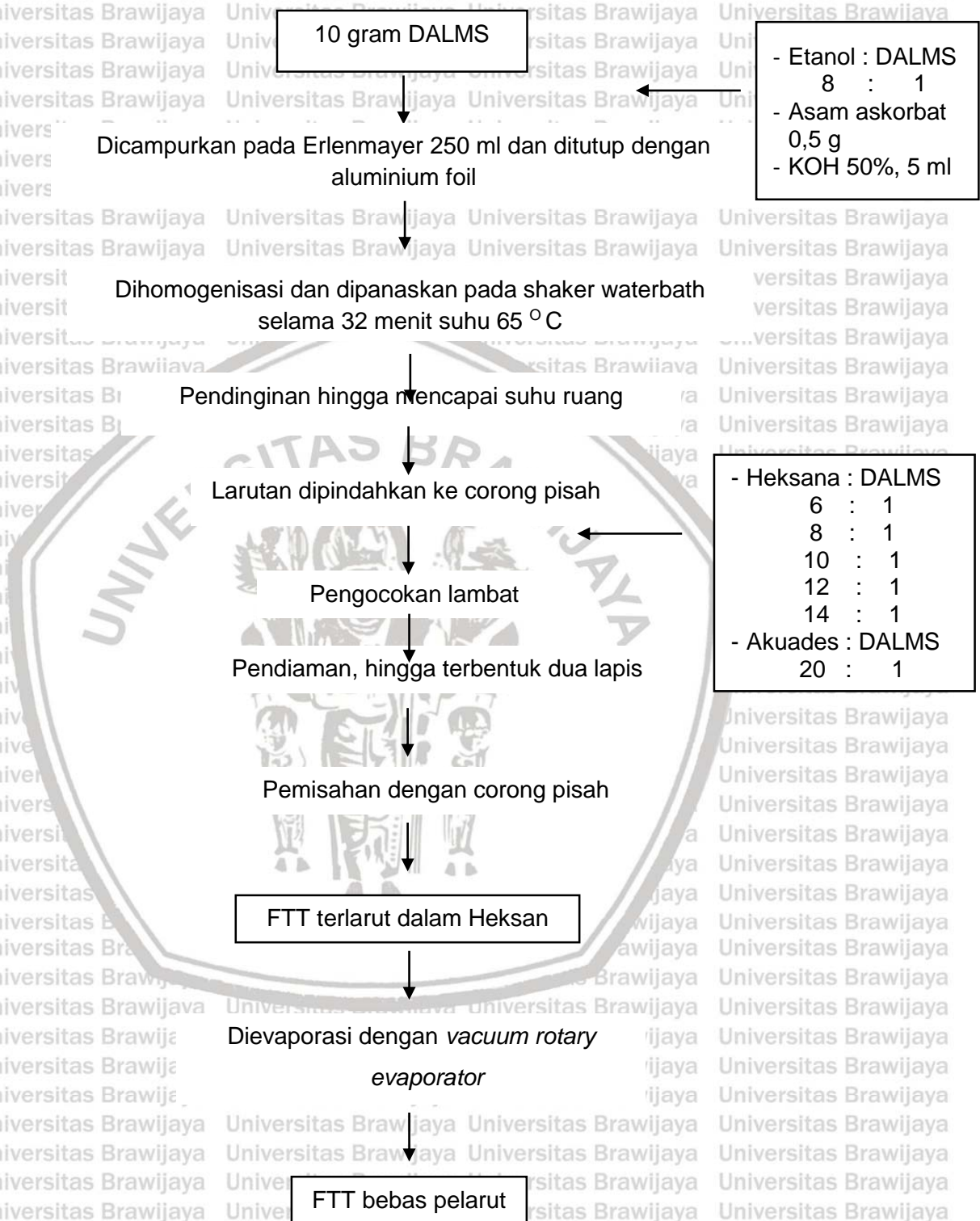
4.6.1 Diagram Alir Penelitian Pendahuluan

4.6.1.1 Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Etanol



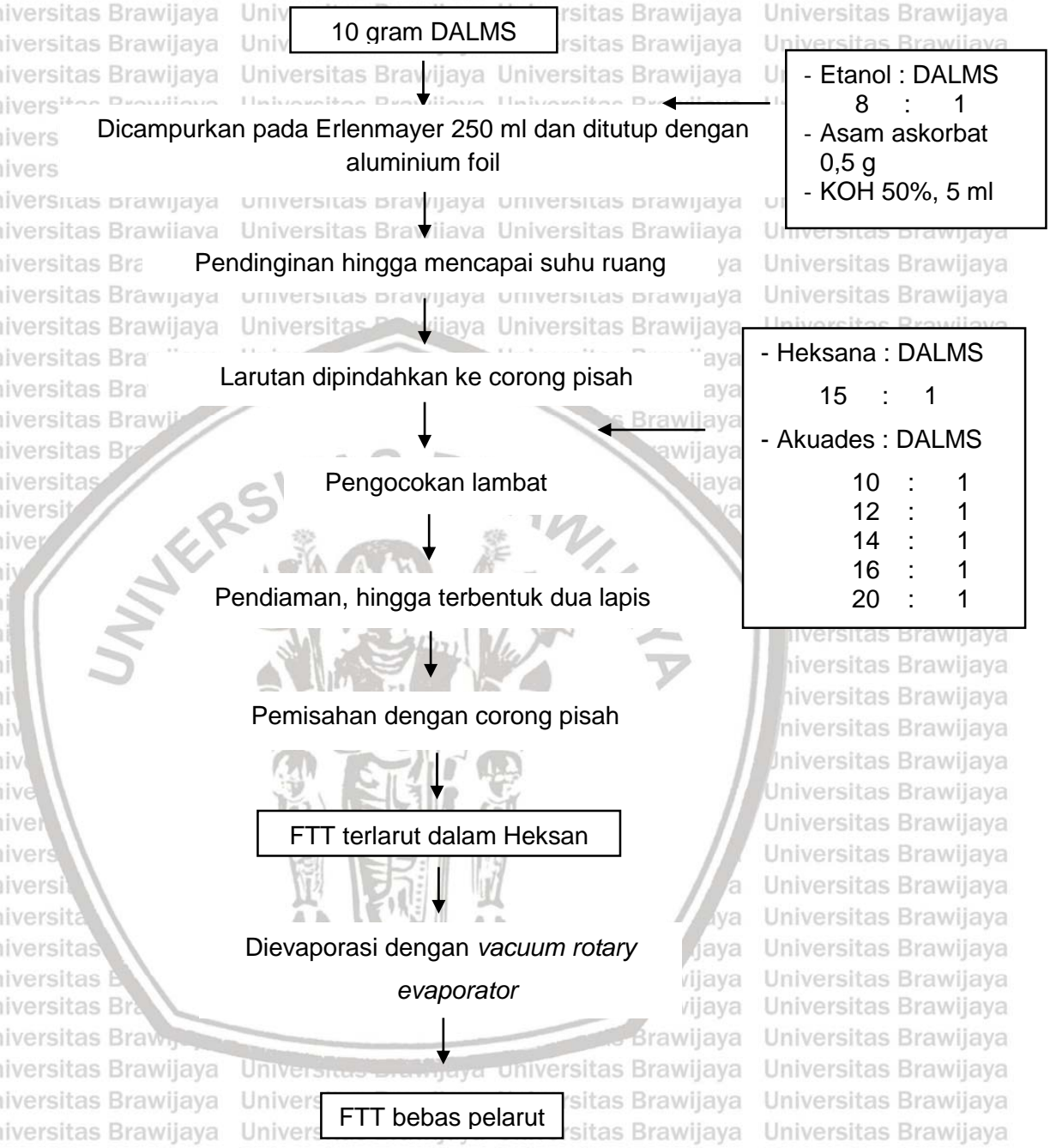
Gambar 4.2 Diagram Alir Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Etanol

4.6.1.2 Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Heksana



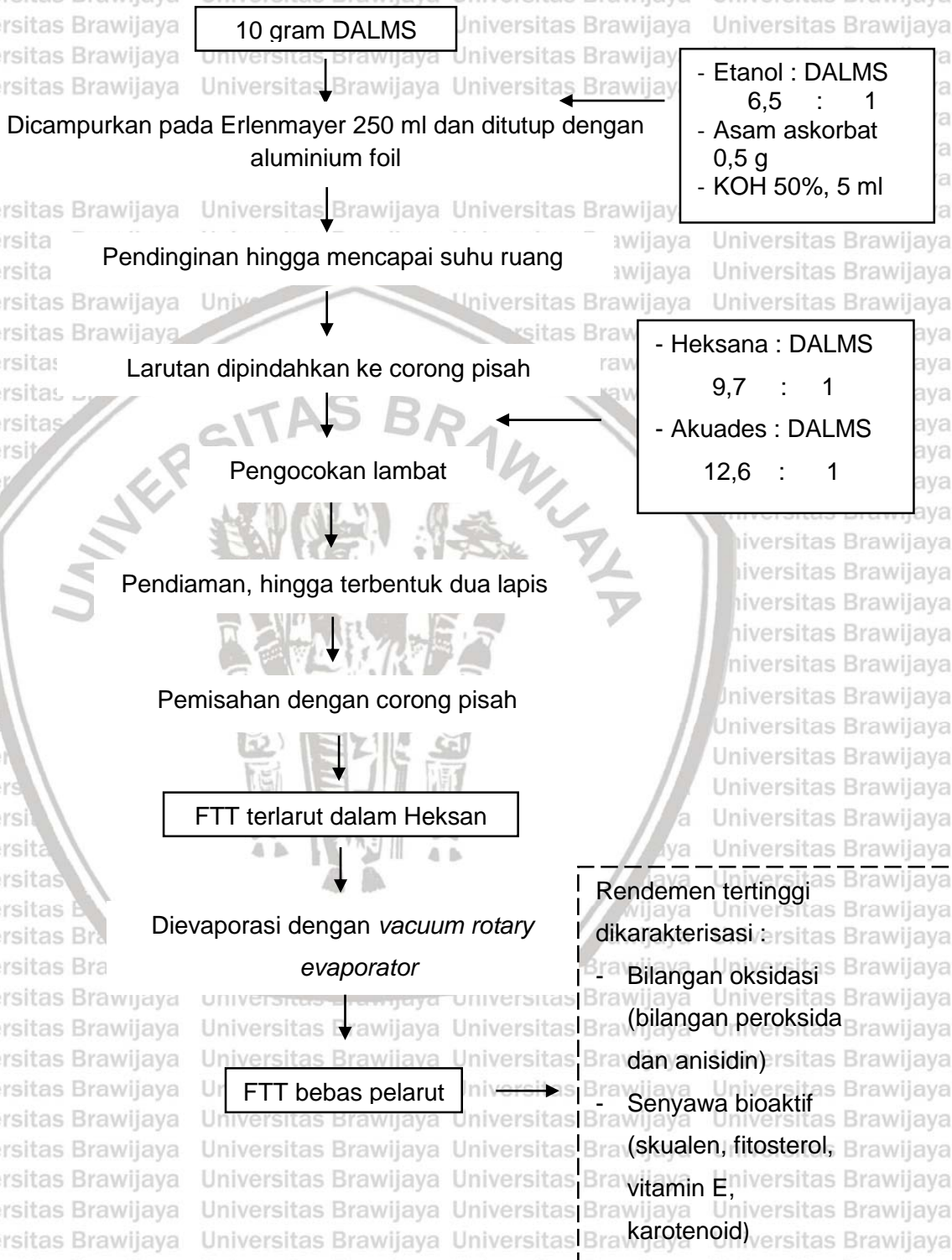
Gambar 4.3 Diagram Alir Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Heksana

4.6.1.3 Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Akuades



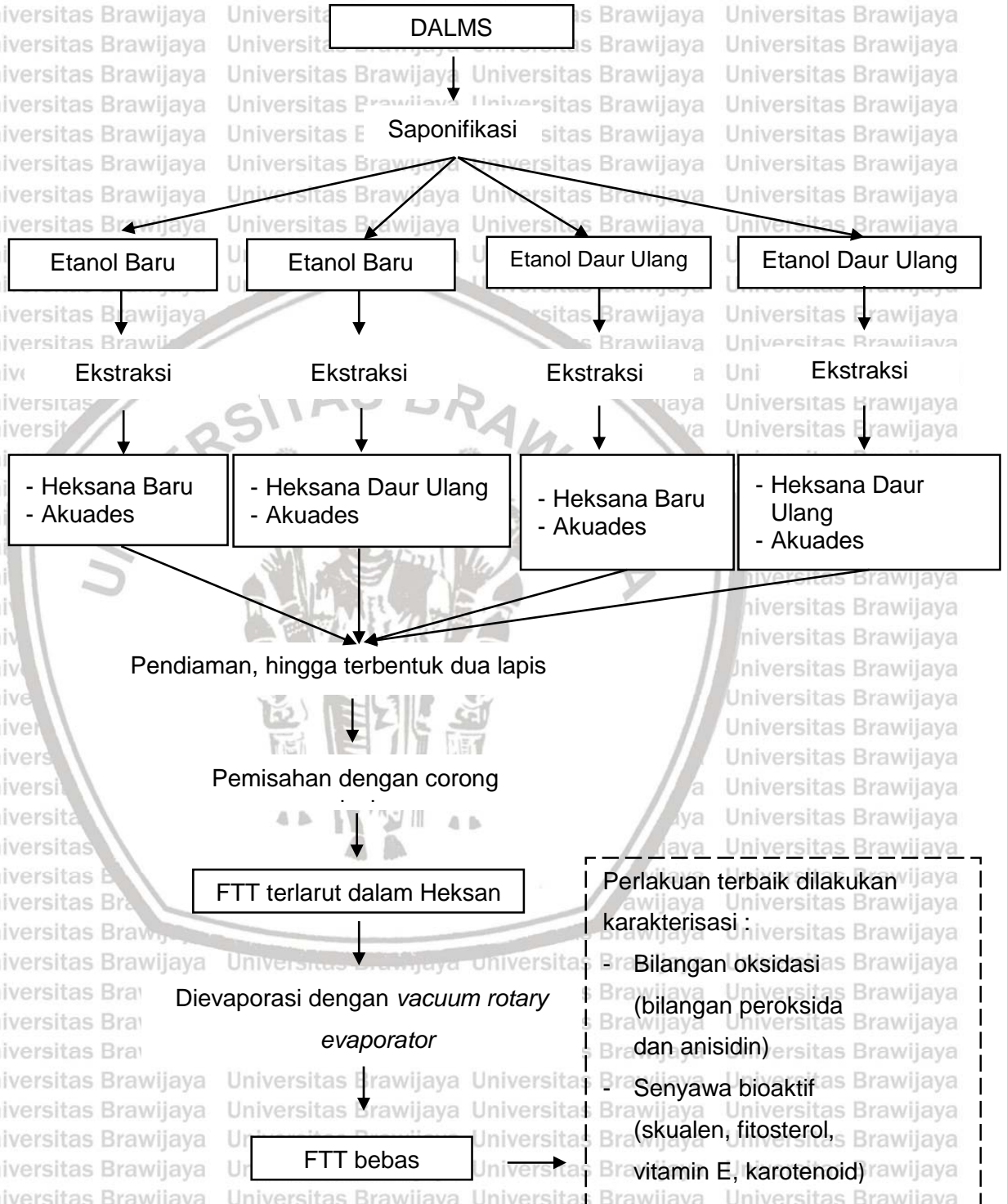
Gambar 4.4 Diagram Alir Saponifikasi DALMS dan Perlakuan Variasi Perbandingan Pelarut Akuades

4.6.2 Penelitian Tahap 1
Saponifikasi dan Ekstraksi DALMS Berdasarkan Titik Optimum
Expert 11.0



Gambar 4.5 Diagram Alir Saponifikasi dan Ekstraksi DALMS Berdasarkan Titik Optimum DX 11.0

4.6.3 Penelitian Tahap 2
Saponifikasi dan Ekstraksi FTT DALMS Menggunakan Pelarut Baru, Pelarut Daur Ulang, dan Kombinasi Pelarut Baru : Pelarut Daur Ulang



Gambar 4.6 Diagram Alir Saponifikasi dan Ekstraksi FTT DALMS Menggunakan Pelarut Baru, Pelarut Daur Ulang, dan Kombinasi Pelarut Baru : Pelarut Daur Ulang

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Karakteristik FTT DALMS Sebelum Optimasi

5.1.1 Rendemen FTT DALMS Sebelum Optimasi

Rendemen fraksi tidak tersabunkan DALMS menggunakan perbandingan pelarut sebelum optimasi memiliki kadar yang rendah, yaitu $2,37 \pm 0,10 \%$ (Lampiran 2).

FTT DALMS sebelum optimasi dilakukan dengan metode Estiasih (2014), yaitu melakukan saponifikasi dan ekstraksi dengan perbandingan etanol : DALMS (8:1), heksana : DALMS (15:1), dan akuades : DALMS (20:1). Kadar fraksi tidak tersabunkan yang didapat pada penelitian ini sesuai dengan Top (2010), yang menyatakan bahwa kadar fraksi tidak tersabunkan pada DALMS berkisar antara 1,5-3,4%. Menurut Estiasih *et al.*, (2015) dan Wulansari *et al.*, (2019) FTT DALMS memiliki kadar yang sedikit, berkisar antara 2-8%.

FTT merupakan bagian lemak yang tidak dapat bereaksi dan tidak terpecah saat bereaksi dengan KOH saat saponifikasi. FTT mengandung karbohidrat, fosfolipid, vitamin liposoluble, pigmen, karoten, vitamin E, fitosterol dan polifenol yang merupakan senyawa bioaktif dan dapat berperan sebagai antioksidan alami dalam minyak (Guergouri *et al.*, 2017).

5.1.2 Tingkat Oksidasi

DALMS memiliki kandungan senyawa yang mudah teroksidasi. Pengujian tingkat oksidasi dilakukan dengan menghitung bilangan peroksida dan *p-anisidin* FTT DALMS. Berikut merupakan hasil analisa tingkat oksidasi FTT DALMS sebelum dilakukan optimasi pelarut yang terdapat pada **Tabel 5.2**

Tabel 5.1 Hasil Analisa Tingkat Oksidasi FTT DALMS Sebelum Optimasi

| Karakteristik | FTT DALMS' | Literatur |
|-----------------------------|------------|---------------------------------------|
| Bilangan Peroksida (mek/kg) | 9,60±0,11 | 1-17 ^a , 1-9 ^b |
| Bilangan <i>p</i> -Anisidin | 14,26±0,11 | 6,91 ^c , 6-31 ^b |

Sumber: a.Chang *et al.*, 2016, b. Estiasih dan Ahmadi, 2018, c. Ahmadi *et al.*, 2018

5.1.2.1 Bilangan Peroksida

Pada perhitungan bilangan peroksida FTT DALMS, yang diperoleh dengan menggunakan metode (Estiasih *et al.*, 2014) sebelum optimasi pelarut, memiliki

kadar yang cukup tinggi, yaitu $9,60 \pm 0,11$ mek/Kg. Menurut Chang et al., (2016) kadar peroksida pada DALMS berkisar antara 1-17 mek/kg sedangkan menurut Estiasih dan Ahmadi (2018), bilangan peroksida berkisar 1-9 mek/kg. Bilangan peroksida ini juga lebih rendah dibandingkan DALMS pada penelitian Puspitasari (2013) dengan bilangan peroksida 11,89 mek/kg.

Perhitungan bilangan peroksida dilakukan berdasarkan persamaan $y=0,0648x+0,1443$ dengan $R^2=0,9938$ sehingga persamaan ini bersifat linier dan dapat digunakan. Perhitungan matematis kurva standar dijelaskan pada **Lampiran**

3. Perbedaan bilangan peroksida pada DALMS dapat disebabkan oleh perbedaan komposisi CPO, dimana diketahui sebelumnya bahwa DALMS merupakan hasil samping pengolahan minyak goreng berbahan baku CPO. Selain itu, tahapan proses pemurnian CPO seperti *degumming*, *bleaching* dan deodorisasi dapat berpengaruh pada nilai bilangan peroksida DALMS.

Tingkat oksidasi yang tinggi dapat menyebabkan nilai bilangan peroksida yang tinggi. Jumlah asam lemak tak jenuh tinggi pada DALMS dapat mempercepat reaksi oksidasi yang kemudian memicu peningkatan nilai bilangan peroksida. DALMS mengandung asam lemak tak jenuh 48% dan 52% asam lemak jenuh (Jumaah et al., 2019). Hal ini menunjukkan tingginya kadar asam lemak tak jenuh yang dapat memicu reaksi oksidasi lebih cepat sehingga nilai peroksida pada bahan baku DALMS meningkat. Reaksi oksidasi pada DALMS dapat terjadi dengan spontan maupun adanya reaksi dengan oksigen, cahaya, panas, dan logam.

Tahapan proses pengolahan minyak goreng diantaranya yaitu tahap pemurnian, meliputi *degumming*, *bleaching* dan deodorisasi. Ketiga tahapan tersebut membutuhkan panas. Panas yang diperlukan selama proses pemurnian ini dapat meningkatkan reaksi oksidasi sehingga bilangan peroksida yang dihasilkan tinggi. Yustinah (2009) juga menambahkan bahwa reaksi oksidasi dipercepat cahaya ultraviolet, panas, dan logam. Reaksi oksidasi pada ikatan rangkap asam lemak bebas dapat memicu terbentuknya peroksida.

5.1.2.2 Bilangan *p*-Anisidin

Berdasarkan **Tabel 5.2** diketahui bahwa bilangan *p*-Anisidin FTT DALMS, yang diperoleh dengan menggunakan metode (Estiasih et al., 2014) sebelum optimasi pelarut memiliki kadar yang rendah, yaitu $14,26 \pm 0,11$. Kadar *p*-anisidin yang diperoleh sesuai dengan literatur Estiasih dan Ahmadi (2018) yang

menyebutkan bahwa kadar bilangan *p*-Anisidin pada FTT DALMS berkisar antara 6-31. Bilangan *p*-Anisidin pada FTT DALMS menunjukkan jumlah senyawa aldehid yang terukur pada sampel karena adanya reaksi ikatan karbonil aldehida pada gugus amina *p*-anisidin (Ansorena, 2012). Terbentuknya senyawa aldehid pada FTT-DALMS dimulai dengan adanya oksidasi primer pada DALMS akibat reaksi dengan udara, cahaya, maupun logam sehingga akan terbentuk hidroperoksida sebagai hasil oksidasi primer. Hidroperoksida bersifat tidak stabil sehingga akan berubah menjadi persenyawaan alkohol, aldehid, dan hidrokarbon yang ketiganya merupakan produk dari oksidasi sekunder.

DALMS mengandung asam lemak seperti asam lemak laurat, miristat, palmitat, arakidat, behenat, lignokerat, protein kasar, abu, aldehid, keton dan bahan-bahan lain hasil dekomposisi peroksida dan pigmen (Weisbjerg *et al.*, 2020). Unsur-unsur lainnya adalah trigliserida, digliserida, monogliserida, asam lemak tak jenuh seperti asam oleat dan asam linoleat serta senyawa pengotor (Laosiripojana, 2011). Keberadaan oksigen, logam, panas, dan radiasi cahaya pada lingkungan yang bereaksi dengan komponen senyawa pada DALMS, seperti asam lemak bebas, dapat memicu oksidasi dan terbentuknya radikal bebas. Perubahan DALMS yang teroksidasi dapat dilihat secara fisik seperti adanya perubahan warna menjadi kecoklatan, dan munculnya aroma tengik. Tingkat oksidasi minyak dapat ditunjukkan dengan keberadaan aldehid dan gugus karbonil, yang keduanya merupakan hasil oksidasi primer dan sekunder dari minyak. Adanya aldehid dan beberapa gugus karbonil dapat menimbulkan aroma tengik pada DALMS.

5.1.3 Senyawa Bioaktif FTT DALMS Sebelum Optimasi

DALMS mengandung senyawa bioaktif seperti vitamin E, fitosterol dan skualen. Vitamin E yang terdapat pada DALMS meliputi tokoferol dan tokotrienol. Komponen fitosterol yang terdapat pada DALMS meliputi β -sitosterol, kampesterol, dan stigmasterol. Ekstraksi senyawa bioaktif pada DALMS dapat dilakukan lebih optimal dengan melakukan tahap saponifikasi dan ekstraksi DALMS sehingga dapat diperoleh FTT DALMS yang kaya akan senyawa bioaktif.

FTT DALMS diperoleh dengan melakukan saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut etanol, heksana, dan akuades dengan perbandingan masing-masing 8 : 15 : 20. Pengamatan kadar senyawa bioaktif pada FTT DALMS tercantum dalam **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Kadar Senyawa Bioaktif FTT DALMS Sebelum Optimasi

| Senyawa Bioaktif | FTT DALMS Sebelum Optimasi | | Literatur FTT DALMS | | Literatur DALMS | |
|-------------------|----------------------------|-----------|---|-----------------------------|------------------------|-------------------|
| | ppm | % relatif | ppm | % relatif | ppm | % relatif |
| Kadar Vitamin E | 12.948,11 | 1,29 | 7.662-19.600 ^{abeg} | 0,76 - 1,96 ^{abeg} | 195,60 ^g | 0,02 ^g |
| α-tokoferol | 3187,84 | 0,32 | 644,11-3145,8 ^{eg} | 0,06-0,31 ^{eg} | 37,81 ^g | - |
| α-tokotrienol | 3818,35 | 0,38 | 1.860,54-6.546 ^{eg} | 0,19-0,65 ^{eg} | 35,81 ^g | - |
| δ-tokotrienol | 2930,46 | 0,29 | 4.853,78-4429,6 ^{eg} | 0,49-0,44 ^{eg} | 4,54 ^g | - |
| γ-tokotrienol | 3011,46 | 0,30 | 609,61-5.478,2 ^{eg} | 0,06-0,55 ^{eg} | 117,44 ^g | - |
| Total Tokotrienol | 9.760,27 | 0,98 | - | - | 157,79 ^g | - |
| Total Fitosterol | 20.323,40 | 2,03 | 5.500 ^a , 7.476,56 ^c , 300-620 ^b , 88.378 ^f | 0,03 - 8,84 ^{abcf} | 7.476,56 ^g | 0,75 ^g |
| β-sitosterol | 6.050,89 | 0,60 | 3.913,37 ^e | 0,39 ^e | 3.9133,23 ^g | 0,39 ^g |
| Stigmasterol | 11.709,49 | 1,17 | 1.774,66 ^e | 0,18 ^e | 1.774,66 ^g | 0,18 ^g |
| Kampesterol | 2.563,03 | 0,26 | 1.788,53 ^e | 0,18 ^e | 1.788,53 ^g | 0,18 ^g |
| α-karoten | td | td | - | - | - | - |
| β-karoten | td | td | - | - | - | - |
| Kadar Skualen | 17.525,53 | 1,75 | 21.018 - 132.100 ^{df} | 2,10 - 13,21 ^{df} | 2.373,27 ^g | 0,24 ^g |

Keterangan : **td** : tidak terdeteksi

Sumber : a.Estiasih *et al.*, (2014), b.Chang *et al.*, (2016), c.Wulansari *et al.*, (2019), d.Naz dan Farah, (2012), e. Puspitasari (2013), f. Balqis (2015), g. Estiasih *et al.*, (2014)

Pengamatan kadar vitamin E pada penelitian ini meliputi tokoferol dan tokotrienol. Senyawa yang diukur pada tokoferol yaitu α-tokoferol, dan senyawa yang diukur pada tokotrienol meliputi α-tokotrienol, δ-tokotrienol, dan γ-tokotrienol.

Hasil analisa **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa FTT DALMS pada saponifikasi dan ekstraksi dengan perbandingan volume pelarut etanol : heksana : akuades (8 : 15 : 20) mengandung vitamin E sebesar 12.948,11 ppm yang terdiri dari tokoferol (α-tokoferol) sebesar 3.187,84 ppm dan tokotrienol sebesar 9.760,27 ppm. Nilai tokotrienol tersebut terdiri dari α-tokotrienol 3.187,84 ppm, δ-tokotrienol 2.930,46 ppm, dan γ-tokotrienol 3.011,46 ppm.

Nilai vitamin E, yang meliputi α-tokotrienol, δ-tokotrienol, dan γ-tokotrienol pada FTT DALMS memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Chang *et al.*, (2016), Estiasih *et al.*, (2014), Puspitasari (2013), dan Rhitmayanti (2014) yaitu vitamin E pada FTT DALMS berkisar antara 7.662 – 19.600 ppm. FTT DALMS memiliki nilai vitamin E yang lebih besar dibandingkan dengan DALMS,

yang meliputi nilai α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, dan γ -tokotrienol. FTT DALMS memiliki kadar vitamin E lebih tinggi (1.29%) dibandingkan DALMS (0.02%) (Estiasih *et al.*, 2014).. Kadar vitamin E yang lebih tinggi ini dapat terjadi karena senyawa bioaktif terekstrak dan terakumulasi pada FTT DALMS (Estiasih *et al.*, 2014; Fidalgo *et al.*, 2013; Khatoun *et al.*, 2010). Pada saponifikasi DALMS, terjadi reaksi hidrolisis lemak oleh katalis basa (KOH) sehingga akan menghasilkan sabun yang terbentuk dari garam kalium dan gliserol, serta bagian lain yang terpisah berupa FTT.

FTT merupakan suatu komponen yang terdapat dalam lemak yang tidak dapat disaponifikasi oleh alkali hidroksida dan dapat diekstrak dengan pelarut organik (Mishra, 2019). Metode untuk mengekstraksi FTT dari lemak terdiri dari pengolahan lemak dengan alkali untuk memecah molekul trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak yang diperoleh kemudian diubah menjadi sabun dan fraksi tak tersabunkan yang ada dalam larutan sabun dapat diekstraksi dengan pelarut. Pada ekstraksi FTT sejumlah besar lemak dikesampingkan untuk memperoleh sejumlah kecil senyawa tidak tersabunkan.

Senyawa lain yang terdapat pada FTT DALMS yaitu fitosterol. Total fitosterol dalam bahan baku FTT DALMS yaitu 2,03% atau sebesar 20.323,40 ppm, terdiri dari β -sitosterol 6.050,89 ppm, stigmasterol 11.709,49 ppm, dan kampesterol 2.563,03 ppm. Nilai fitosterol pada bahan baku FTT DALMS memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Balqis (2015), Estiasih *et al.*, (2014), Puspitasari (2013) dan Wulansari *et al.*, (2019) yaitu kadar fitosterol berkisar antara 300 – 88.378 ppm. Kadar fitosterol pada FTT DALMS lebih tinggi (2,03%) dibandingkan dengan fitosterol pada DALMS (0,75%). Kadar fitosterol yang lebih tinggi ini dapat terjadi karena senyawa bioaktif terekstrak dan terakumulasi pada FTT DALMS (Estiasih *et al.*, 2014; Fidalgo *et al.*, 2013; Khatoun *et al.*, 2010). Pada saponifikasi DALMS, terjadi reaksi hidrolisis lemak oleh katalis basa (KOH) sehingga akan menghasilkan sabun yang terbentuk dari garam kalium dan gliserol, serta bagian lain yang terpisah berupa FTT. Fitosterol pada DALMS dapat terekstrak secara optimal setelah dilakukan saponifikasi sehingga diperoleh FTT. Hal ini menyebabkan nilai fitosterol FTT lebih tinggi daripada DALMS.

Kadar β -karoten dan α -karoten pada FTT DALMS bahan baku tidak terdeteksi. Hal ini dapat terjadi karena DALMS memiliki warna pucat akibat adanya proses *pre-treatment* pemurnian pada pengolahan minyak sawit. DALMS merupakan produk samping dari penyulingan CPO pada proses deodorisasi,

bleaching, dan *degumming* (Wei *et al.*, 2004 dan Xu *et al.*, 2020). Proses tersebut bertujuan untuk memurnikan CPO pada proses pengolahan minyak goreng.

Penggunaan asam selama proses pemurnian menyebabkan karoten terdegradasi, karena adanya reaksi protonasi antara karoten dengan asam berkekuatan sedang (Wei *et al.*, 2004). Reaksi ini menghasilkan produk samping berupa DALMS dengan warna pucat kekuningan yang memiliki kadar β -karoten dan α -karoten sangat rendah sehingga pada penelitian ini tidak terdeteksi. (Lokman *et al.*, 2014).

Kadar skualen pada FTT DALMS bahan baku diperoleh nilai sebesar 17.525,53 ppm. Nilai skualen yang diperoleh pada FTT DALMS bahan baku memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Balqis (2015) serta Naz dan Farah (2012) yaitu nilai skualen pada FTT DALMS berkisar antara 21.018 – 132.100 ppm. Nilai skualen pada FTT DALMS bahan baku memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan DALMS. Hal ini dapat terjadi karena senyawa bioaktif terekstrak dan terakumulasi pada FTT DALMS (Estiasih *et al.*, 2014; Fidalgo *et al.*, 2013; Khattoon *et al.*, 2010). Pada saponifikasi DALMS, terjadi reaksi hidrolisis lemak oleh katalis basa (KOH) sehingga akan menghasilkan sabun yang terbentuk dari garam kalium dan gliserol, serta bagian lain yang terpisah berupa FTT. Skualen pada DALMS dapat terekstrak secara optimal setelah dilakukan saponifikasi sehingga diperoleh FTT. Hal ini menyebabkan nilai fitosterol FTT lebih tinggi daripada DALMS.

5.2 Penentuan Batas Minimum dan Maksimum Optimasi Saponifikasi FTT DALMS

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan kombinasi pelarut yang tepat pada reaksi saponifikasi. Kombinasi pelarut yang tepat dalam menghasilkan FTT DALMS diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomis, oleh karena itu dilakukan optimasi pelarut pada saponifikasi dan ekstraksi DALMS. Tahap awal yang dilakukan sebelum optimasi adalah menentukan batas atas dan batas bawah dari pelarut yang digunakan, yaitu etanol, heksana, dan akuades. Penggunaan batas atas dan batas bawah bertujuan untuk menentukan rentang titik perlakuan yang akan dilakukan selama penelitian. Batas atas dan bawah tersebut nantinya akan dimasukkan dalam rancangan optimasi kombinasi pelarut.

Saponifikasi dan ekstraksi FTT menggunakan 3 pelarut, yaitu etanol yang berfungsi sebagai fasilitator selama proses saponifikasi, serta heksana dan akuades yang berperan dalam proses pemisahan FTT dan fraksi tersabunkan yang terbentuk pada saponifikasi. Pada metode Estiasih (2013), penggunaan

pelarut : sampel yang digunakan masing-masing yaitu etanol : sampel sebesar 8:1, heksana : sampel sebesar 15 : 1 dan akuades : sampel sebesar 20 : 1.

Penggunaan perbandingan pelarut tersebut dinilai kurang ekonomis, selain itu penggunaan pelarut heksana yang berasal dari minyak bumi merupakan pelarut yang tidak terbarukan dan dapat menimbulkan beberapa masalah lingkungan (Selka *et al.*, 2016). Oleh karena itu, pengurangan penggunaan heksana sebagai pelarut ekstraktor telah menjadi persyaratan bagi industri makanan

Penentuan nilai batas atas dan bawah dilakukan dengan melakukan *trial and error* pada masing-masing pelarut dengan perbandingan penggunaan 2 pelarut lain mengacu pada metode saponifikasi Estiasih (2014). Parameter yang diamati yaitu rendemen, nilai rendemen yang tertinggi kemudian dijadikan acuan dalam penentuan batas atas dan bawah. Perbandingan pelarut : DALMS pada *trial and error* penentuan batas bawah dan atas yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 5.3, Tabel 5.4, dan Tabel 5.5.**

Tabel 5.3 Perlakuan Pendahuluan Uji Coba Pelarut Etanol : DALMS

| Etanol:DALMS | Heksana:DALMS ^a | Akuades:DALMS ^a | Rendemen (%) |
|--------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| 4:1 | 15:1 | 20:1 | 0,13 |
| 5:1 | 15:1 | 20:1 | 0,49 |
| 6:1 | 15:1 | 20:1 | 0,51 |
| 7:1 | 15:1 | 20:1 | 0,38 |
| 8:1 | 15:1 | 20:1 | 0,38 |

Sumber : a. Estiasih (2014)

Tabel 5.4 Perlakuan Pendahuluan Uji Coba Pelarut Heksana:DALMS

| Etanol:DALMS ^a | Heksana:DALMS | Akuades:DALMS ^a | Rendemen (%) |
|---------------------------|---------------|----------------------------|--------------|
| 8:1 | 6:1 | 20:1 | 0,24 |
| 8:1 | 8:1 | 20:1 | 0,67 |
| 8:1 | 10:1 | 20:1 | 0,34 |
| 8:1 | 12:1 | 20:1 | 0,34 |
| 8:1 | 14:1 | 20:1 | 0,34 |

Sumber : a. Estiasih (2014)

Tabel 5.5 Perlakuan Uji Coba Pelarut Akuades : DALMS

| Etanol:DALMS ^a | Heksana:DALMS ^a | Akuades:DALMS | Rendemen (%) |
|---------------------------|----------------------------|---------------|--------------|
| 8:1 | 15:1 | 10:1 | 0,10 |
| 8:1 | 15:1 | 12:1 | 0,27 |
| 8:1 | 15:1 | 14:1 | 0,05 |
| 8:1 | 15:1 | 16:1 | 0,03 |
| 8:1 | 15:1 | 20:1 | 0,03 |

Sumber : a. Estiasih (2014)

Rendemen pada perlakuan pendahuluan ini berkisar antara 1,3%-6,7%. Hasil dari penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa nilai rendemen meningkat seiring dengan penambahan jumlah pelarut, akan tetapi pada penambahan perbandingan tertentu nilai rendemen tidak mengalami peningkatan bahkan mengalami penurunan. Hasil penelitian pada masing-masing perlakuan pelarut menunjukkan perbandingan penggunaan etanol : sampel yang menghasilkan nilai rendemen tertinggi diperoleh pada perbandingan 6:1 dengan perbandingan heksana dan akuades sesuai literatur. Penggunaan heksana : sampel dengan rendemen tertinggi yaitu pada perbandingan 8:1 dengan perbandingan etanol dan akuades sesuai literatur. Perbandingan akuades : sampel 12:1 memiliki nilai rendemen tertinggi dengan perbandingan etanol dan heksana sesuai dengan literatur.

Pada perlakuan etanol, rendemen yang dihasilkan akan meningkat seiring dengan penambahan proporsi perbandingan etanol : sampel dan pada perbandingan tertentu dengan nilai yang lebih tinggi tidak akan mengalami peningkatan. Menurut Binnal *et al.*, (2017) peningkatan perbandingan jumlah etanol terhadap sampel yang digunakan akan meningkatkan jumlah sabun yang terbentuk, hingga perbandingan tertentu dan akan mencapai titik maksimum yang kemudian apabila perbandingan pelarut ditingkatkan, maka jumlah sabun akan linear. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan perbandingan pelarut terhadap sampel dapat meningkatkan reaksi saponifikasi, hingga perbandingan tertentu yang akan mencapai titik jenuh sehingga perbandingan pelarut tersebut dianggap merupakan titik optimal yang menghasilkan rendemen tertinggi.

Wandira *et al.*, (2017) melakukan optimasi pelarut untuk ekstraksi FTT DALMS menggunakan diklorometana dan akuades. Perbandingan pelarut terbaik hasil optimasi yaitu pada perbandingan diklorometana : sampel 7,5:1 dan akuades : sampel 10:1. Pada perlakuan pendahuluan dan penelitian yang dilakukan oleh Wandira *et al.*, (2017) dapat diamati bahwa peningkatan penggunaan pelarut :

sampel pada perbandingan tertentu akan mengalami penurunan rendemen atau nilai rendemen yang tetap. Hal ini dikarenakan setiap pelarut memiliki kapasitas jenuh dalam mengekstrak suatu senyawa (Wandira *et al.*, 2017). Semakin banyak jumlah fase polar yang digunakan untuk mengekstrak FTT menyebabkan hasil saponifikasi cenderung untuk larut di pelarut polar, dan pelarut non polar tidak dapat mengekstrak FTT secara maksimal sehingga diperoleh nilai rendemen yang rendah. Peningkatan pelarut non polar yang digunakan pada ekstraksi akan meningkatkan nilai rendemen yang diperoleh namun pada volume penambahan tertentu nilai rendemen akan tetap dikarenakan proporsi perbandingan pelarut tersebut sudah maksimal dalam mengekstrak FTT.

Hasil penelitian pada masing-masing perlakuan pelarut menunjukkan perbandingan penggunaan etanol : sampel yang menghasilkan nilai rendemen tertinggi diperoleh pada perbandingan 6:1 dengan perbandingan heksana dan akuades sesuai literatur. Penggunaan heksana : sampel dengan rendemen tertinggi yaitu pada perbandingan 8:1 dengan perbandingan etanol dan akuades sesuai literatur. Perbandingan akuades : sampel 12:1 memiliki nilai rendemen tertinggi dengan perbandingan etanol dan heksana sesuai dengan literatur. Pada penelitian pendahuluan ini dapat diambil batas bawah dari masing-masing perbandingan pelarut yaitu etanol : sampel 5:1, heksana : sampel 6:1, dan akuades : sampel 10: 1, sedangkan batas atas yang digunakan untuk masing-masing pelarut : sampel yaitu etanol : sampel 7:1, heksana : sampel 10:1, dan akuades : sampel 14:1. Batas bawah dan batas atas tersebut kemudian dimasukkan dalam rancangan komposit pusat.

5.3 Optimasi Pebandingan Pelarut: DALMS pada Saponifikasi DALMS dengan Respon Rendemen

Titik optimum pada analisa permukaan respon dengan rancangan komposit pusat dalam penelitian ini ditentukan dengan melakukan uji coba pada titik-titik tertentu disekitar titik tengah percobaan. Daerah percobaan tersebut terdiri dari dua taraf dari setiap variabel yang dikode dengan -1 dan +1 dan diperluas dengan nilai α . Formula yang ditetapkan untuk nilai α adalah $2^{k/2}$. K adalah banyaknya variabel yang diujikan (Gaspers, 1992). Pada penelitian ini nilai α ditetapkan sebesar 1,682 karena variabel yang digunakan adalah dua buah. Variabel terkode -1 dan +1 menunjukkan taraf variabel yang berada sebelum dan

sesudah titik optimum. Jarak antara variabel kode -1 terhadap variabel optimum 0 adalah sama dengan jarak antara variabel kode +1 terhadap variabel optimum 0.

Pada penelitian ini, dikaji 3 faktor, yaitu perbandingan pelarut : sampel (etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel). Respon yang diinginkan adalah respon rendemen maksimum yang mengandung senyawa bioaktif multi komponen. Proses saponifikasi dengan faktor perbandingan pelarut dengan sampel diperlukan perpaduan perbandingan yang tepat agar diperoleh hasil saponifikasi dan ekstraksi yang optimum. Proses saponifikasi dan ekstraksi yang optimum diharapkan mampu menghasilkan rendemen fraksi tidak tersabunkan yang maksimal, sehingga diperoleh senyawa bioaktif yang optimum. Respon pada penelitian ini yaitu rendemen yang akan dinyatakan dengan persentase (%) dengan target maksimum. Variabel yang dikaji pada optimasi saponifikasi FTT DALMS menggunakan metode *Central Composite Design* (CCD) dapat dilihat pada **Tabel 5.6**.

Tabel 5.6 Kisaran Nilai Variabel Bebas

| Faktor | Kode | Level | | | | |
|-----------------|----------------|---------|----|----|----|----------|
| | | -1,682 | -1 | 0 | +1 | +1,682 |
| Etanol : DALMS | X ₁ | 4,318:1 | 5 | 6 | 7 | 7,682:1 |
| Heksana : DALMS | X ₂ | 4,636:1 | 6 | 8 | 10 | 11,364:1 |
| Akuades : DALMS | X ₃ | 8,636:1 | 10 | 12 | 12 | 15,364:1 |

Tabel 5.7 Hasil Respon Perbandingan Pelarut : Sampel pada Saponifikasi menggunakan Program Design Expert 10

| No | Faktor | | | Respon |
|----|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | Etanol:DALMS | Heksana:DALMS | Akuades:DALMS | Rendemen (%) |
| 1 | 5:1 | 6:1 | 10:1 | 0,79 |
| 2 | 5:1 | 6:1 | 14:1 | 1,36 |
| 3 | 5:1 | 10:1 | 10:1 | 1,60 |
| 4 | 5:1 | 10:1 | 14:1 | 1,66 |
| 5 | 7:1 | 6:1 | 10:1 | 0,90 |
| 6 | 7:1 | 6:1 | 14:1 | 1,13 |
| 7 | 7:1 | 10:1 | 12:1 | 1,48 |
| 8 | 7:1 | 10:1 | 12:1 | 2,59 |
| 9 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 1,90 |
| 10 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2,54 |
| 11 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 1,91 |
| 12 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2,31 |
| 13 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2,46 |
| 14 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2,06 |
| 15 | 4,318:1 | 8:1 | 12:1 | 1,85 |
| 16 | 7,682:1 | 8:1 | 12:1 | 1,69 |
| 17 | 6:1 | 4,636:1 | 12:1 | 1,57 |
| 18 | 6:1 | 11,364:1 | 12:1 | 1,75 |
| 19 | 6:1 | 8:1 | 8,636:1 | 0,79 |
| 20 | 6:1 | 8:1 | 15,364:1 | 1,25 |

Prediksi respon dalam RSM dapat diketahui dengan melakukan analisa model rancangan penelitian sehingga diperoleh model rancangan yang sesuai untuk pelaksanaan penelitian. Model yang dievaluasi mencakup linear, interaksi dua faktor (2FI), dan kuadrat. Pemilihan model ini berdasarkan tingkat selektivitas terhadap jenis perhitungan. Analisa pemilihan model yang paling sesuai untuk menentukan respon optimum berdasarkan evaluasi model dilakukan berdasarkan uraian jumlah kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*), uji simpangan model (*lack of fit test*) dan ringkasan model statistik (*Summary of Statistic*). Kesesuaian model dihitung berdasarkan *p-value*, jika *p-value* memiliki nilai < 0,05 maka variabel yang diuji berpengaruh signifikan terhadap model (Myers *et al.*, 2016). Uji simpangan model digunakan untuk menguji apakah suatu fungsi regresi linear cocok dengan model pada taraf α tertentu (Boyaci, 2007). Pada

penelitian ini taraf α yang digunakan yaitu 0,05. *Summary of Statistics* merupakan ringkasan model secara statistik pada hasil analisa.

5.3.1 Pemilihan Model berdasarkan Jumlah Kuadrat

Pemilihan model sekuensial jumlah kuadrat didasarkan pada nilai tertinggi derajat polinomial yaitu dengan syarat model diterima jika $p\text{-value} < 0,05$ (peluang ketidaksesuaian dengan model kurang dari 5%), dimana hal ini menunjukkan model berpengaruh nyata terhadap respon. Berdasarkan analisa "*Sequential Model Sum of Squares*" (**Tabel 5.6**) menunjukkan beberapa kemungkinan model yang dapat dipilih untuk menggambarkan pengaruh perbandingan pelarut dan sampel terhadap kadar rendemen yang dihasilkan. Berdasarkan analisis tersebut didapatkan desain model kuadratik sebagai model terpilih ("*Suggested*").

Tabel 5.8 Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Uraian Jumlah Kuadrat

| Sumber Keragaman | Jumlah Kuadrat | Derajat Bebas | Kuadrat Tengah | Nilai F | Nilai p prob > F | Keterangan |
|-------------------------|----------------|---------------|----------------|-------------|------------------|------------------|
| Rata-rata vs total | 56,28 | 1 | 56,28 | | | <i>Suggested</i> |
| Linier vs rata-rata | 1,48 | 3 | 0,49 | 1,84 | 0,1814 | |
| 2FI vs Linier | 0,17 | 3 | 0,056 | 0,18 | 0,9098 | |
| <u>Kuadratik vs 2FI</u> | <u>2,97</u> | <u>3</u> | <u>0,99</u> | <u>8,65</u> | <u>0,0040</u> | <i>Suggested</i> |
| Kubik vs Kuadratik | 0,76 | 4 | 0,19 | 2,92 | 0,1164 | <i>Aliased</i> |
| Residual | 0,39 | 6 | 0,065 | | | |
| Jumlah | 62,05 | 20 | 3,10 | | | |

Pemilihan model berdasarkan *Sequential Model Sum of Squares* diawali dari model linier. Model linier yang memiliki bentuk persamaan respon $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2$ yang mempunyai $p\text{-value}$ sebesar 0,1814 (18,14%). Hal ini menunjukkan bahwa adanya peluang kesalahan model linear $> 5\%$. Penelitian ini menggunakan batas $p\text{-value} < 5\%$. Nilai peluang kesalahan $> 5\%$ menunjukkan bahwa penggunaan model linear tidak signifikan terhadap respon.

Model selanjutnya yang diamati yaitu 2FI, yaitu model interaksi antara 2 variabel, dengan persamaan respon $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1X_2$. $P\text{-value}$ pada model 2FI yaitu 0,9098 (90,98%) yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan dari model 2FI $> 5\%$. Penelitian ini menggunakan batas $p\text{-value} < 5\%$. Nilai peluang kesalahan $> 5\%$ menunjukkan bahwa penggunaan model linear tidak signifikan terhadap respon.

Pengamatan model selanjutnya adalah bentuk kuadratik, yang memiliki bentuk persamaan respon $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_5X_1X_2$. Model kuadratik memiliki *p-value* sebesar 0,0040 (0,40%). Hal ini menunjukkan bahwa peluang kesalahan untuk model kuadratik < 5%, yang berarti model kuadratik berpengaruh nyata terhadap respon (rendemen). Keterangan *p-value* menyatakan model kuadratik merupakan desain terbaik dan terpilih, dimana pada aplikasi statistik *Design Expert* tertulis “*Suggested*” dengan *p-value* < 5%. Hasil ini menunjukkan bahwa model kuadratik berpengaruh signifikan terhadap respon rendemen dibandingkan dengan pemilihan model lainnya, sehingga model yang terpilih berdasarkan uraian jumlah kuadrat adalah model dari fungsi kuadratik. Menurut Kuhn dan Johnson (2013), model kuadratik memiliki nilai error yang lebih kecil dibandingkan model linear, 2FI, dan kubik.

Pada model kubik diperoleh *p-value* 0,1164 (11,64%), yang menunjukkan peluang kesalahan model > 5%, sehingga model kubik tidak berpengaruh signifikan terhadap respon. Pada analisa ini, model kubik dinyatakan “*Aliased*” atau tidak disarankan oleh aplikasi *Design Expert*. Model kubik diduga terlalu kompleks dalam perencanaan pelaksanaannya sehingga tidak mungkin digunakan. Hal ini mengindikasikan bahwa pengaruh kombinasi perbandingan pelarut etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel dapat dijelaskan dalam model kubik, namun menjadi lebih rumit sehingga tidak mungkin untuk dipilih.

5.3.2 Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Statistik

Proses pemilihan selanjutnya yaitu analisa *Model Summary Statistic*, yaitu analisa perhitungan kesimpulan dari perhitungan sebelumnya. Penentuan model terbaik difokuskan pada nilai *adjusted R²* dan *predicted R²* yang maksimal. Selain itu, pemilihan model juga difokuskan pada nilai PRESS (*Prediction Error Sum of Squares*) yang paling minimal (Draper and Smith, 1998). Hasil analisis *Model Summary Statistic* disajikan pada **Tabel 5.9**.

Tabel 5.9 Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Secara Statistik

| Sumber Keragaman | Standar Deviasi | R ² | Adj-R ² | Predicted R ² | PRESS | Keterangan |
|------------------|-----------------|----------------|--------------------|--------------------------|-------|------------------|
| Linier | 0,52 | 0,2560 | 0,1165 | -0,1153 | 6,43 | |
| 2F1 | 0,56 | 0,2853 | -0,046 | -1,0448 | 11,79 | |
| Kuadratik | 0,34 | 0,8011 | 0,6221 | -0,1653 | 6,72 | <i>Suggested</i> |
| Kubik | 0,25 | 0,9325 | 0,7864 | 0,8981 | 0,59 | <i>Aliased</i> |

Tolak ukur statistik yang digunakan untuk memilih model yang tepat adalah model yang memiliki standar deviasi dan PRESS (*Prediction Error Sum of Square*) terendah. Standar deviasi pada tabel menunjukkan tingkat keragaman data, sedangkan nilai PRESS menunjukkan perkiraan *error* jumlah kuadrat. Pada **Tabel 5.7**, diketahui bahwa model kubik memiliki standar deviasi dan nilai PRESS terkecil. Model kubik dapat dipilih, namun model kubik diprediksi memberikan tingkat kompleksitas yang tinggi sehingga berstatus *Aliased* sedangkan model kuadratik berstatus *Suggested* yang menunjukkan bahwa model tersebut lebih disarankan untuk dipilih.

Model kuadratik memiliki standar deviasi sebesar 0,34 dengan nilai R² 0,8011. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi penggunaan pelarut : DALMS pada etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel pada penelitian ini memberikan pengaruh sebesar 0,8011 (80,11%) pada respon rendemen, sedangkan sisanya dipengaruhi faktor lain yang tidak dimasukkan dalam model. Nilai "*Adjusted R²*" sebesar 0,6221 yang berarti menunjukkan adanya korelasi positif atau keeratan hubungan antara faktor perbandingan pelarut : DALMS yang digunakan terhadap respon rendemen sebesar 62,21%. Myers dan Montgomery (2002) menyatakan bahwa nilai R² merupakan pengukuran jumlah residual pada keragaman respon yang didapatkan dari percobaan aktual di laboratorium. Nilai R² ini akan selalu bertambah dengan semakin banyaknya variabel permodelan.

5.3.3 Analisis Ragam (ANOVA) dari Permukaan Respon untuk Respon Rendemen

Pada dua pemilihan model yang telah dilakukan di atas, model terpilih yang akan digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel X₁ (pelarut etanol : DALMS), variabel X₂ (pelarut heksana : DALMS), dan X₃ (pelarut akuades : DALMS) terhadap respon Y (persentase rendemen) adalah model kuadratik dan selanjutnya dilakukan analisa ragam terhadap model kuadratik tersebut. Hasil

analisis ragam (ANOVA) untuk respon Y (kadar rendemen) dengan model kuadrat dapat dilihat pada **Tabel 5.10**.

Tabel 5.10 Hasil Analisis Ragam (ANOVA) Model Kuadrat

| Sumber Keragaman | Jumlah Kuadrat | Db | Kuadrat Rerata | F Hitung | Nilai p prob>F | Keterangan |
|--------------------|----------------|----|----------------|----------|----------------|------------------|
| Model | 4,62 | 9 | 0,51 | 4,48 | 0,0142 | Signifikan |
| A-Etanol | 0,016 | 1 | 0,016 | 0,14 | 0,7203 | Tidak Signifikan |
| B-Heksana | 0,89 | 1 | 0,89 | 7,79 | 0,0191 | Signifikan |
| C-Akuades | 0,57 | 1 | 0,57 | 4,95 | 0,0503 | Signifikan |
| AB | 0,099 | 1 | 0,099 | 0,86 | 0,3747 | Tidak Signifikan |
| AC | 0,056 | 1 | 0,056 | 0,49 | 0,5002 | Tidak Signifikan |
| BC | 0,014 | 1 | 0,014 | 0,12 | 0,7376 | Tidak Signifikan |
| A ² | 0,33 | 1 | 0,33 | 2,91 | 0,1188 | Tidak Signifikan |
| B ² | 0,53 | 1 | 0,53 | 4,59 | 0,0579 | Tidak Signifikan |
| C ² | 2,51 | 1 | 2,51 | 21,89 | 0,0009 | Signifikan |
| Sisa | 1,15 | 10 | 0,11 | | | |
| <i>Lack of Fit</i> | 0,76 | 5 | 0,15 | 1,95 | 0,2408 | Tidak Signifikan |
| Galat murni | 0,39 | 5 | 0,078 | | | |
| Total | 5,77 | 19 | | | | |

Keterangan :
 A = Variabel X₁ (perbandingan etanol : DALMS)
 B = Variabel X₂ (perbandingan heksana : DALMS)
 C = Variabel X₃ (perbandingan akuades : DALMS)
 AB, AC, BC, A², B², C² = interaksi antar perlakuan

Hasil analisa ragam pada **Tabel 5.10** menunjukkan bahwa model dengan P 0,0142, perbandingan pelarut akuades : DALMS (kuadrat) dengan P 0,0009 memiliki nilai kurang dari 0,05 ($p < 5\%$) memberikan respon signifikan. Pada perbandingan pelarut etanol : DALMS (kuadrat), perbandingan pelarut heksana : DALMS (kuadrat), interaksi antar faktor tidak berpengaruh signifikan terhadap respon. Adapun pada faktor perbandingan etanol : DALMS (linear) dan akuades : DALMS (linear) tidak berpengaruh signifikan, sedangkan perbandingan heksana : DALMS (linear) berpengaruh signifikan pada respon. Pada uji statistik, diperoleh nilai ketidaksesuaian model (*lack of fit*) sebesar 0,2408 (24,08%) dimana nilai yang diperoleh lebih besar dari *p-value* (0,05) sehingga menunjukkan ketidaksesuaian model tidak signifikan, yang menunjukkan bahwa model respon kadar rendemen telah sesuai.

Pada **Tabel 5.10** menunjukkan bahwa perbandingan akuades : DALMS (kuadrat) memberikan korelasi signifikan terhadap respon. Hal ini menunjukkan bahwa perbandingan akuades : DALMS pada model kuadrat memberikan pengaruh terhadap rendemen. Akan tetapi, perbandingan etanol : DALMS

(kuadrat) dan perbandingan heksana : DALMS (kuadrat) tidak berpengaruh signifikan terhadap respon yang diperoleh. Hal ini diduga terjadi karena perbandingan pelarut etanol : DALMS dan heksana : DALMS belum mencapai perbandingan optimal untuk menyabunkan asam lemak pada DALMS sehingga belum memberikan pengaruh tidak signifikan terhadap rendemen FTT yang dihasilkan.

Nollet dan Toldra (2015), menyatakan bahwa ekstraksi FTT memerlukan banyak volume pelarut. Pada penelitian ini diduga perbandingan etanol : sampel dan heksana : sampel yang digunakan belum optimal dan diprediksi membutuhkan jumlah pelarut yang lebih besar. Hal ini menyebabkan reaksi saponifikasi kurang optimal. Asam lemak yang terdapat pada DALMS tidak dapat bereaksi sempurna dengan KOH, yang kemudian pada saat ekstraksi FTT lebih sulit terpisahkan dan terekstrak dari fraksi tersabunkan sehingga rendemen FTT yang dihasilkan kurang optimal.

Penelitian ini menunjukkan bahwa perbandingan pelarut : DALMS merupakan faktor penting dalam saponifikasi. Jumlah pelarut yang terlalu sedikit menyebabkan saponifikasi dan ekstraksi tidak berjalan optimal karena asam lemak tidak mampu terpecah dengan sempurna akibat kurangnya pelarut yang berperan sebagai media saponifikasi dan agen ekstraksi. Sementara itu, penggunaan perbandingan pelarut : DALMS berlebih juga mampu menyebabkan saponifikasi dan ekstraksi tidak optimal. Jumlah pelarut berlebih membutuhkan waktu reaksi yang lebih lama dan suhu reaksi yang lebih tinggi.

Tabel 5.11 menunjukkan ringkasan statistika respon rendemen. Nilai negatif pada *Pred R-Squared* menunjukkan bahwa kemungkinan model prediksi yang disarankan pada aplikasi *Design Expert* dapat memberikan rerata rendemen yang lebih baik. Nilai *Adequate Precision* menunjukkan rasio sinyal dengan *noise*. Rasio *noise* yang diharapkan yaitu lebih besar dari 4. Pada penelitian ini diperoleh rasio sebesar 6,361 yang menunjukkan bahwa nilai rasio sinyal dengan *noise*. Nilai R^2 yang dihasilkan pada respon rendemen dengan model kuadratik yaitu 0,8011 dimana semakin mendekati nilai 1 menunjukkan korelasi antara nilai observasi dan nilai prediksi semakin sesuai (Saniah dan Hasimah, 2008).

Tabel 5.11 Ringkasan Statistika Respon Rendemen

| Sumber Keragaman | a | b | c | d | e | f | g | h |
|------------------|------|------|-------|------|--------|--------|---------|-------|
| Kuadratik | 0,34 | 1,68 | 20,19 | 6,72 | 0,8011 | 0,6221 | -0,1653 | 6,361 |

a = standar deviasi, b = mean, c = C.V. (%), d = PRESS, e = R², f = Adj-R², g = Pred-R², dan h = Adequate Precision

5.3.4 Penentuan Kondisi Optimum Respon Rendemen

Kondisi optimum respon rendemen ditentukan dari hasil analisa program Design Expert 10.0. Berdasarkan analisa, model kuadratik merupakan model yang disarankan pada penelitian ini dengan faktor perbandingan pelarut etanol : sampel, heksana : sampel, akuades : sampel dan respon rendemen, sehingga titik optimum pada variabel dapat diketahui. Titik optimum pada variabel etanol : sampel yaitu menggunakan perbandingan 6,5:1, variabel heksana : sampel yaitu 9,7:1 dan variabel akuades : sampel yaitu 12,6:1. Hasil olah data menunjukkan persamaan model regresi kuadratik terbentuk dari variabel X₁, X₂, dan X₃ yang terbentuk dari model terpilih dalam persamaan kode pada **Gambar 5.1**:

$$Y = 2,20 + 0,034 X_1 + 0,26 X_2 + 0,20 X_3 + 0,11 X_1 X_2 + 0,084 X_1 X_3 + 0,041 X_2 X_3 - 0,15 X_1^2 - 0,19 X_2^2 - 0,42 X_3^2$$

Gambar 5.1 Persamaan Kode Variabel Optimasi

Keterangan : X₁ = perbandingan etanol : sampel, X₂ = perbandingan heksana : sampel, X₃ = perbandingan akuades : sampel, Y = respon (kadar rendemen)

Tabel 5.12 Koefisien Regresi Respon Rendemen

| | |
|------------------------------------|--------|
| Intercept | +2,20 |
| Linear | |
| X1 (Perbandingan Etanol : Sampel) | +0,034 |
| X2 (Perbandingan Heksana : Sampel) | +0,26 |
| X3 (Perbandingan Akuades : Sampel) | +0,20 |
| Kuadratik | |
| X ₁ ² | -0,15 |
| X ₂ ² | -0,19 |
| X ₃ ² | -0,42 |
| Interaksi | |
| X ₁ X ₂ | +0,11 |
| X ₁ X ₃ | +0,084 |
| X ₂ X ₃ | +0,041 |

Tabel 5.12 dan **Gambar 5.1** menunjukkan bahwa rendemen FTT DALMS tanpa adanya kombinasi perlakuan etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel sebesar 2,20 %. Nilai koefisien perbandingan etanol : sampel (linear) bernilai positif sebesar +0,034, hal ini menunjukkan adanya korelasi positif antara perbandingan etanol : sampel dengan rendemen. Semakin tinggi kadar etanol maka semakin tinggi pula rendemen yang dihasilkan. Nilai koefisien pada perbandingan etanol : sampel (kuadratik) bernilai -0,15, menunjukkan adanya korelasi negatif perbandingan etanol : sampel terhadap respon rendemen. Semakin tinggi jumlah etanol maka respon rendemen akan menurun. Akan tetapi berdasarkan nilai koefisien regresi linear dan kuadratik pada ANOVA dinyatakan tidak signifikan ($p > 0,05$).

Nilai koefisien perbandingan heksana : sampel (linear) bernilai positif sebesar +0,26, hal ini menunjukkan adanya korelasi positif antara perbandingan heksana : sampel dengan rendemen. Semakin tinggi kadar heksana maka semakin tinggi pula rendemen yang dihasilkan. Nilai koefisien pada perbandingan heksana : sampel (kuadratik) bernilai -0,19, menunjukkan adanya korelasi negatif perbandingan heksana : sampel terhadap respon rendemen. Semakin tinggi jumlah heksana yg digunakan maka nilai rendemen semakin berkurang. Akan tetapi berdasarkan nilai koefisien regresi linear dan kuadratik pada ANOVA dinyatakan tidak signifikan ($p > 0,05$).

Nilai koefisien perbandingan akuades : sampel (linear) bernilai positif sebesar +0,20, hal ini menunjukkan adanya korelasi positif antara perbandingan akuades : sampel dengan rendemen. Semakin tinggi kadar akuades maka semakin tinggi pula rendemen yang dihasilkan. Nilai koefisien pada perbandingan akuades : sampel (kuadratik) bernilai -0,42, menunjukkan adanya korelasi negatif perbandingan akuades : sampel terhadap respon rendemen. Semakin tinggi jumlah akuades yang digunakan maka nilai rendemen semakin rendah.

Berdasarkan ANOVA, koefisien regresi linear dinyatakan tidak signifikan ($p > 0,05$), akan tetapi pada koefisien regresi kuadratik dinyatakan signifikan ($p < 0,05$).

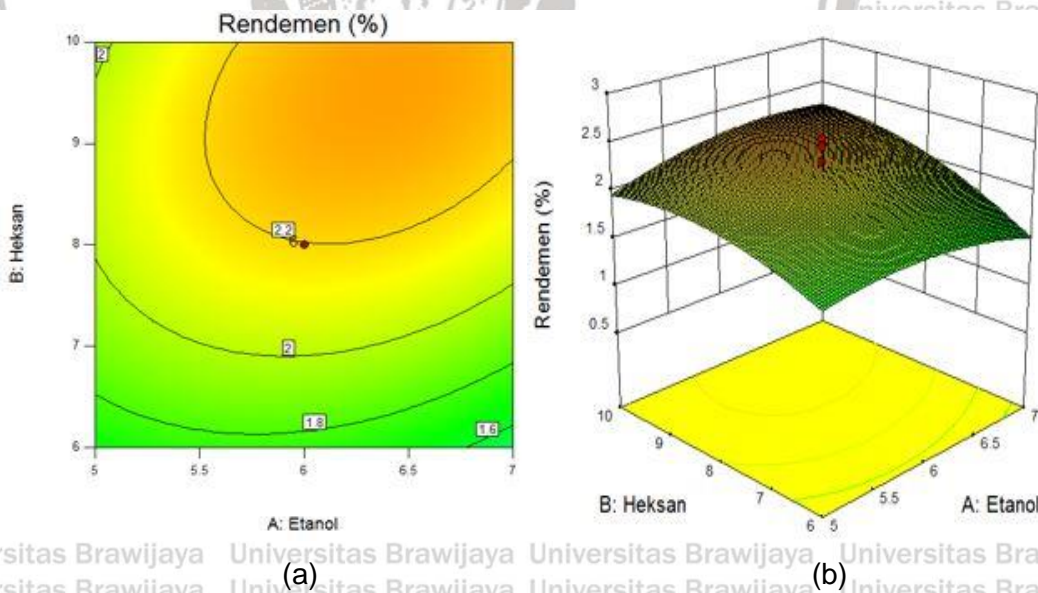
Penggunaan pelarut berlebih menunjukkan efisiensi yang rendah karena adanya penurunan afinitas molekul antara pelarut dan zat terlarut, sehingga berdasarkan koefisien regresi kuadratik semakin tinggi jumlah akuades maka nilai rendemen akan menurun secara signifikan (Shirsath *et al.*, 2012).

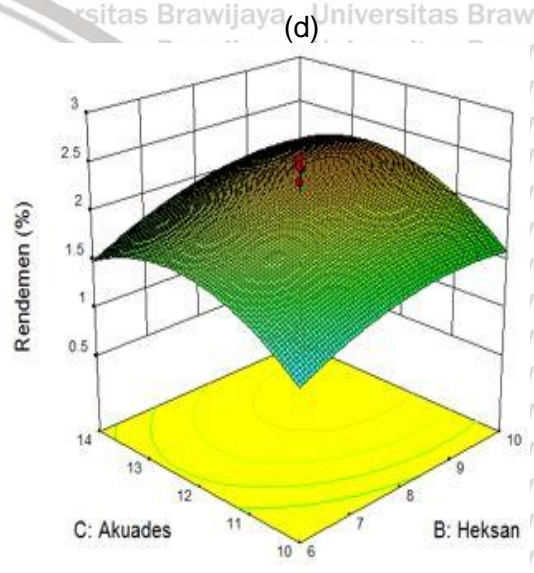
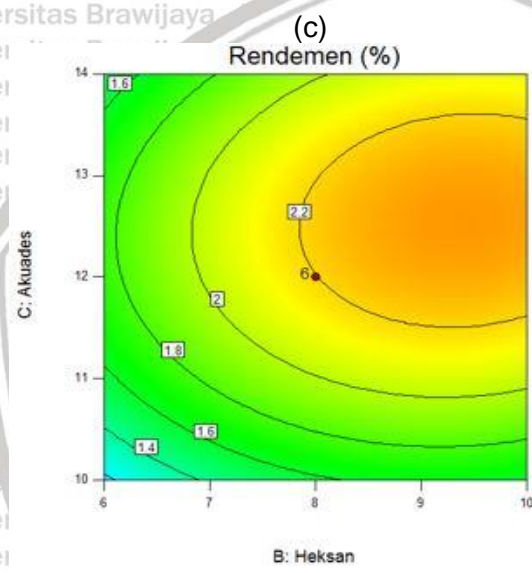
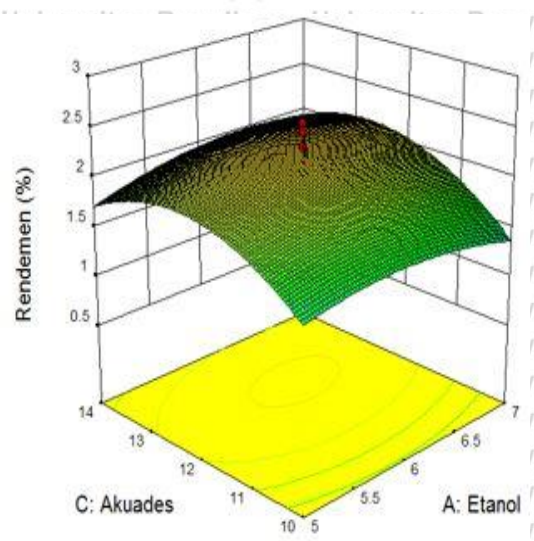
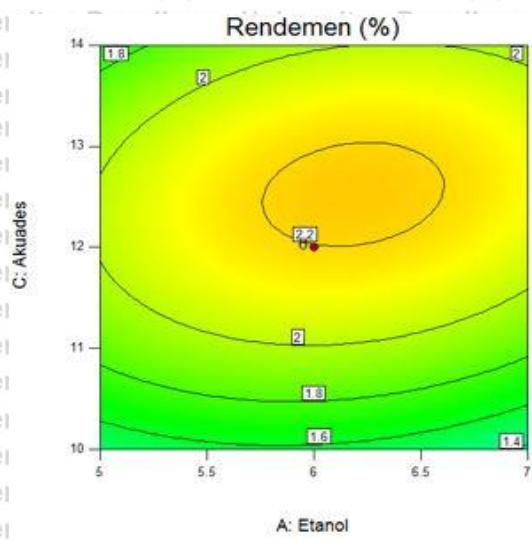
Nilai koefisien interaksi antara etanol dan heksana, etanol dan akuades, serta heksana dan akuades masing-masing sebesar +0,11, +0.084, +0.041

menunjukkan bahwa interaksi 2 faktor pada etanol-heksana, etanol-akuades, dan heksana-akuades mampu menambah jumlah rendemen. Hasil ANOVA **Tabel 5.10** menunjukkan secara statistik interaksi antara etanol dan heksana, etanol dan akuades, serta heksana dan akuades tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap rendemen FTT DALMS. Nilai koefisien etanol kuadrat, heksana kuadrat, dan akuades kuadrat memiliki nilai negatif yaitu masing-masing -0,15, -0,19, dan -0,42 secara berurutan. Hal ini menunjukkan adanya titik stasioner maksimum dari permukaan respon.

5.3.5 Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol : Sampel, Heksana : Sampel, dan Akuades : Sampel terhadap Rendemen

Pengaruh kombinasi perbandingan pelarut etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel dan interaksi antara etanol, heksana, dan akuades memberikan pengaruh terhadap persentase rendemen yang dihasilkan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemilihan perbandingan penggunaan etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel yang tepat sehingga diperoleh FTT yang memiliki rendemen tinggi. **Gambar 5.2** menunjukkan hubungan penggunaan perbandingan antar pelarut terhadap respon rendemen.





Gambar 5.2 Kontur Plot dan Kurva Respon Permukaan (3D) terhadap Rendemen

Gambar 5.2 (a) menunjukkan bahwa sumbu X merupakan variabel etanol dan sumbu Y merupakan variabel heksana terhadap rendemen FTT DALMS.

Gambar 5.2 (c) menunjukkan bahwa sumbu X merupakan variabel etanol dan sumbu Y merupakan variabel akuades terhadap rendemen FTT DALMS. Gambar

5.2 (e) menunjukkan sumbu X merupakan variabel heksana dan sumbu Y merupakan variabel akuades terhadap rendemen FTT DALMS. Garis lengkung yang terdapat pada kontur plot menunjukkan tingkatan respon rendemen, yaitu posisi garis terluar menunjukkan nilai respon rendemen terendah, sedangkan posisi garis terdalam menunjukkan nilai respon rendemen tertinggi. Gambar 5.2

(b), (d), (f) merupakan kurva permukaan respon variabel etanol : sampel, heksana : sampel, dan akuades : sampel.

Gambar 5.2 (a) dan (b) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar rendemen hingga mencapai titik tertentu seiring dengan meningkatnya perbandingan jumlah etanol dan heksana yang digunakan dengan kadar akuades konstan, meskipun peningkatan rendemen yang terjadi tidak berbeda nyata. Peningkatan perbandingan jumlah etanol dan heksana melebihi titik tertentu mengakibatkan terjadinya penurunan kadar rendemen. **Gambar 5.2 (c) dan (d)** menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar rendemen hingga mencapai titik tertentu seiring dengan meningkatnya perbandingan jumlah etanol dan akuades dengan kadar heksana konstan, meskipun peningkatan rendemen yang terjadi tidak berbeda nyata. Peningkatan perbandingan jumlah etanol dan akuades melebihi titik tertentu mengakibatkan terjadinya penurunan kadar rendemen. **Gambar 5.2 (e) dan (f)** menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar rendemen hingga mencapai titik tertentu seiring dengan meningkatnya perbandingan jumlah heksana dan akuades dengan kadar etanol konstan, meskipun peningkatan rendemen yang terjadi tidak berbeda nyata. Peningkatan perbandingan jumlah heksana dan akuades melebihi titik tertentu mengakibatkan terjadinya penurunan kadar rendemen.

Penurunan kadar rendemen pada penambahan perbandingan jumlah pelarut melebihi titik tertentu dapat terjadi karena setiap pelarut memiliki kapasitas jenuh dalam mengekstrak suatu senyawa (Wandira *et al.*, 2017). Semakin banyak jumlah fase polar yang digunakan untuk mengekstrak FTT menyebabkan hasil saponifikasi cenderung untuk larut di pelarut polar, dan pelarut non polar tidak dapat mengekstrak FTT secara maksimal sehingga diperoleh nilai rendemen yang rendah. Peningkatan pelarut non polar yang digunakan pada ekstraksi akan meningkatkan nilai rendemen yang diperoleh namun pada volume penambahan tertentu nilai rendemen akan tetap, bahkan dapat mengalami penurunan dikarenakan proporsi perbandingan pelarut tersebut sudah maksimal dalam mengekstrak FTT.

5.4 Verifikasi Hasil Optimasi Respon Rendemen

Optimasi respon perbandingan pelarut : DALMS yang digunakan untuk saponifikasi dan ekstraksi dengan *Design Expert* bertujuan untuk mendapatkan input variabel terbaik guna menghasilkan respon rendemen optimal. Pengaturan kriteria yang digunakan yaitu sebagai berikut : etanol, heksana, dan akuades pada

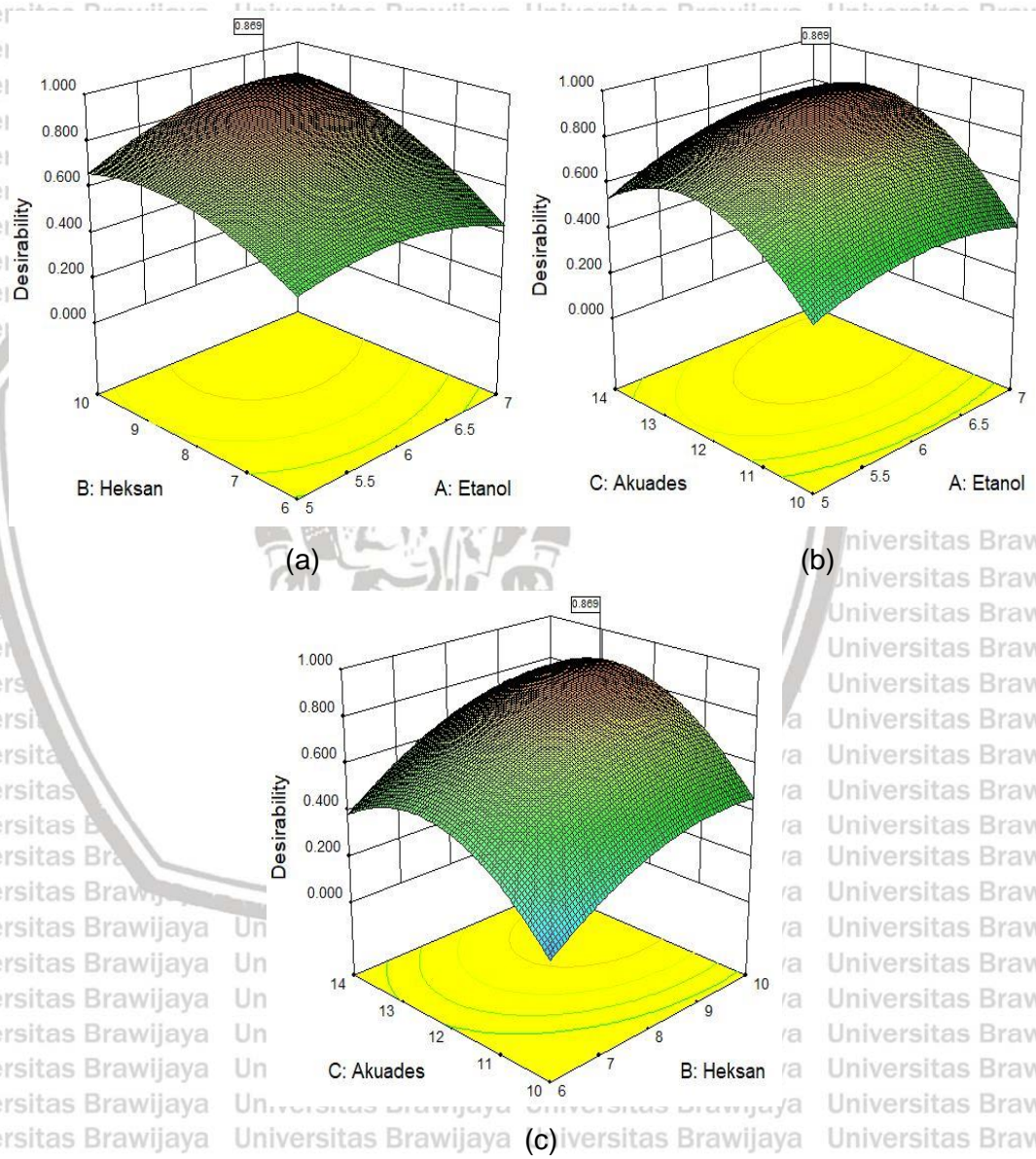
nilai *in range* dan respon rendemen pada nilai maksimum. Respon optimasi diperoleh dari analisa statistika dan nilai *desirability*. Hasil dari optimasi berdasarkan aplikasi *Design Expert* akan memberikan nilai prediksi respon yang selanjutnya akan dilakukan verifikasi. Pelaksanaan verifikasi dilakukan dengan membandingkan nilai variabel dan nilai respon yang disarankan dari aplikasi dengan nilai variabel dan nilai respon yang dihasilkan berdasar uji empiris pada formulasi optimum sebanyak tiga kali pengulangan menggunakan *paired T-Test software Minitab 17*. Jika hasil validasi diperoleh *p-value* dengan prediksi lebih dari 0.05 maka nilai prediksi pada *software Design Expert* dan hasil penelitian tidak berbeda nyata sehingga menunjukkan adanya kesesuaian model.

Hasil dari solusi yang diperoleh dari perhitungan *software Design Expert*, kondisi terbaik yaitu pada perbandingan etanol : sampel 6.5 : 1, heksana : sampel 9.7 : 1, dan akuades : sampel 12.6 : 1. Nilai yang diperoleh dari hasil perhitungan tersebut kemudian akan digunakan sebagai perlakuan untuk mendapatkan FTT dengan rendemen maksimum, kemudian dilakukan verifikasi pada parameter rendemen.

Verifikasi data RSM dilakukan dengan melakukan saponifikasi dan Ekstraksi FTT DALMS berdasarkan kondisi terbaik yang disarankan oleh aplikasi *Design Expert 11.0*. Saponifikasi dilakukan dengan mereaksikan DALMS, etanol dengan perbandingan etanol : sampel (6,5 : 1), asam askorbat, dan KOH pada penangas air. Kemudian hasil saponifikasi DALMS dilakukan proses ekstraksi cair - cair menggunakan pelarut heksana sebagai pelarut non polar, dan akuades sebagai pelarut polar. Penggunaan dua jenis pelarut yang berbeda polaritas bertujuan untuk memisahkan fraksi tersabunkan yang mengandung gliserol, dan FTT yang terlarut dalam heksana. FTT memiliki densitas lebih ringan akan terpisah di bagian atas dan dipisahkan dari fraksi tersabunkan. Selanjutnya FTT yang terlarut dalam heksana diekstrak dari pelarutnya sehingga dihasilkan FTT murni bebas pelarut. Hasil verifikasi perlakuan optimum yang disarankan pada aplikasi *Design Expert 11.0* dapat dilihat pada **Tabel 5.13**.

Tabel 5.13 Formulasi Optimum yang disarankan dengan Respon Terprediksi dan Terobservasi

| Keterangan | Etanol : Sampel | Heksana : Sampel | Akuades : Sampel | Kadar Rendemen (% b/b) | Desirability |
|------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|--------------|
| Prediksi | 6,5:1 | 9,7:1 | 12,6:1 | 2,35 | 0,869 |
| Verifikasi | 6,5:1 | 9,7:1 | 12,6:1 | 2,23 | 0,869 |
| | <i>p-value</i> | | | 0,223 | |



Gambar 5.3 Kurva Respon Permukaan (3D) terhadap *Desirability* Respon

Pada **Gambar 5.3** menunjukkan formula optimal ditentukan dari nilai *desirability* paling maksimum. Nilai *desirability* terbaik yaitu semakin mendekati nilai 1 maka formula optimasi akan semakin baik, dimana program mampu memenuhi tujuan berdasarkan kriteria yang diinginkan pada produk akhir (Nurmiah *et al.*, 2013). Hasil verifikasi yang dilakukan dengan formulasi yang disarankan pada program RSM menghasilkan nilai rendemen 2.23% (b/b%). Berdasarkan uji *paired T-Test* respon rendemen menunjukkan hasil verifikasi dan prediksi optimasi pada aplikasi RSM tidak berbeda signifikan dengan *p-value* 0.223 (>0.05).

5.5 Karakteristik FTT DALMS Hasil Verifikasi Optimum

FTT bebas pelarut yang diperoleh dari proses optimasi kemudian dikarakterisasi kimiawi dengan analisa bilangan peroksida, dan *p*-Anisidin, serta kandungan senyawa bioaktifnya yang meliputi kadar vitamin E, fitosterol, skualen, dan karotenoid.

5.5.1 Tingkat Oksidasi

Hasil analisa tingkat oksidasi DALMS dapat dilihat pada **Tabel 5.14**.

Tabel 5.14 Tingkat Oksidasi FTT DALMS Sebelum dan Setelah Optimasi Perbandingan Pelarut

| Karakteristik | FTT DALMS Tanpa Optimasi | FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | Literatur |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Bilangan Peroksida (mek/kg) | 9,60±0,11 | 10,29±0,35 | 1-17 ^a , 1-9 ^b |
| Bilangan <i>p</i> -Anisidin | 14,26±0,15 | 12,19±0,01 | 6,91 ^c , 6-31 ^b |

Sumber: a.Chang *et al.*, 2016, b. Estiasih dan Ahmadi, 2018, c. Ahmadi *et al.*, 2018

Keterangan : * Data merupakan rerata dari 2 kali ulangan

* Angka setelah ± adalah standar error

5.5.1.1 Bilangan Peroksida

Mutu FTT hasil verifikasi dianalisis dan berdasarkan **Tabel 5.12** didapatkan bilangan peroksida yang tinggi yaitu 10,29±0,35 mek/kg. Bila dibandingkan dengan FTT DALMS sebelum optimasi, kadar bilangan peroksida hasil verifikasi meningkat sebesar 0,69 mek/kg. Menurut Chang *et al.*, (2016) bilangan peroksida pada FTT DALMS dipengaruhi oleh kondisi bahan baku DALMS sebelum proses saponifikasi. Bilangan peroksida pada FTT DALMS berkisar antara 1,09 - 16,50. Peroksida FTT DALMS hasil optimasi diduga meningkat pada saat optimasi,

karena penggunaan pelarut etanol yang digunakan setelah optimasi berkurang dibandingkan sebelum optimasi. Jumlah etanol yang lebih sedikit menyebabkan peroksida yang bereaksi pada saat saponifikasi menjadi lebih pekat.

Menurut Hoseini dan Danesh (2019), oksigen, cahaya, panas, ion logam, dan enzim merupakan agen yang dapat mempercepat kerusakan oksidatif minyak. Oksidasi minyak juga dipengaruhi oleh komposisi asam lemak, pigmen, fosfolipid, asam lemak bebas, mono dan diasilgliserol dan senyawa termal teroksidasi (Choe & Min, 2006). Nilai peroksida yang tinggi mampu menginterpretasikan ketengikan lemak. Menurut An *et al.*, (2010) Nilai peroksida (PV) digunakan sebagai indikator umum pada oksidasi lemak tahap awal. Peroksida dan hidroperoksida terbentuk akibat oksidasi ikatan rangkap asam lemak karena adanya panas, kelebihan oksigen, dan ROS yang terbentuk saat autooksidasi.

5.5.1.2 *p*-Anisidin

Berdasarkan **Tabel 5.12** diketahui bahwa bilangan *p*-Anisidin FTT hasil verifikasi optimum untuk respon rendemen sebesar $12,19 \pm 0,01$, lebih rendah dari bilangan *p*-Anisidin pada FTT DALMS sebelum optimasi, yaitu sebesar $14,26 \pm 0,15$. Pengukuran bilangan *p*-Anisidin pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri guna mengukur senyawa karbonil terutama aldehid (seperti 2-alkena dan 2,4-diena) karena didasarkan pada reaktivitas ikatan karbonil aldehida pada gugus amina *p*-anisidin (Ansorena, 2012). Senyawa aldehid yang kemudian terukur sebagai bilangan *p*-Anisidin pada FTT diduga berasal dari hasil oksidasi sekunder yang terjadi baik pada proses pemisahan maupun penyimpanan FTT setelah proses saponifikasi.

Hidroperoksida sebagai hasil oksidasi primer bersifat tidak stabil dan akan berubah menjadi produk oksidasi sekunder yang terdiri dari persenyawaan alkohol, aldehid, dan hidrokarbon (Ruiz dan Hardwood, 2013). Secara umum aldehid sebagai hasil oksidasi sekunder merupakan senyawa sederhana yang bersifat polar juga bersifat volatil sehingga kemungkinan pada saat proses penanganan maupun penyimpanan, senyawa tersebut menguap dan menyebabkan keberadaan aldehid (terukur sebagai bilangan *p*-Anisidin) menjadi turun. Aldehid merupakan senyawa volatil yang cukup dominan (50%) yang menyebabkan senyawa hasil oksidasi sekunder tersebut dapat mengalami penguapan dengan mudah.

5.5.2 Senyawa Bioaktif FTT DALMS Hasil Verifikasi Optimum

Pemurnian fisik minyak sawit pada tahap deodorisasi, *bleaching* dan *degumming* akan diperoleh hasil samping berupa DALMS yang mengandung beberapa senyawa bioaktif seperti vitamin E (tokoferol dan tokotrienol), fitosterol, dan skualen. Senyawa bioaktif ini terakumulasi dalam FTT. Hasil verifikasi RSM menghasilkan kombinasi pelarut yang digunakan untuk memperoleh rendemen FTT optimum yaitu dengan perbandingan etanol : heksana : akuades sebesar 6,5 : 9,7 : 12,6. Pengamatan kadar senyawa bioaktif pada FTT DALMS dengan perbandingan pelarut sesuai hasil optimasi dan verifikasi FTT DALMS tercantum dalam **Tabel 5.15**.

Tabel 5.15 Kadar Senyawa Bioaktif FTT DALMS Hasil Verifikasi Optimum

| Senyawa Bioaktif | FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | | FTT DALMS Tanpa Optimasi | | Literatur FTT DALMS | |
|-------------------|---------------------------------------|-----------|--------------------------|----------|--|-----------------------------|
| | ppm | % relatif | ppm | %relatif | ppm | % relatif |
| Kadar Vitamin E | 15.804,52 | 1,58 | 12.948,11 | 1,29 | 7.662-19.600 ^{abeg} | 0,76 - 1,96 ^{abeg} |
| α-tokoferol | 3.558,93 | 0,36 | 3187,84 | 0,32 | 644,11-3145,8 ^{eg} | 0,06-0,31 ^{eg} |
| α-tokotrienol | 4.437,60 | 0,44 | 3818,35 | 0,38 | 1.860,54-6.546 ^{eg} | 0,19-0,65 ^{eg} |
| δ-tokotrienol | 3.760,72 | 0,38 | 2930,46 | 0,29 | 4.853,78-4429,6 ^{eg} | 0,49-0,44 ^{eg} |
| γ-tokotrienol | 4.047,27 | 0,40 | 3011,46 | 0,30 | 609,61-5.478,2 ^{eg} | 0,06-0,55 ^{eg} |
| Total Tokotrienol | 12.245,59 | 1,22 | 9.760,27 | 0,98 | 5.500 ^a | - |
| Total Fitosterol | 18.851,28 | 1,89 | 20.323,40 | 2,03 | 7.476,56 ^c 300-620 ^b 88.378 ^f | 0,55 - 8,84 ^{abcf} |
| β-sitosterol | 18.007,13 | 1,80 | 6.050,89 | 0,60 | 3.913,37 ^e | 0,39 ^e |
| Stigmasterol | 372,95 | 0,04 | 11.709,49 | 1,17 | 1.774,66 ^e | 0,18 ^e |
| Kampesterol | 471,20 | 0,05 | 2.563,03 | 0,26 | 1.788,53 ^e | 0,18 ^e |
| α –karoten | td | td | td | Td | - | - |
| β –karoten | td | td | td | Td | - | - |
| Kadar Skualen | 40.670,86 | 4,07 | 17.525,53 | 1,75 | 21.018 - 132.100 ^{df} | 2,10 - 13,21 ^{df} |

Keterangan : **td** : tidak terdeteksi

Sumber : a.Estiasih *et al.*, (2014), b.Chang *et al.*, (2016), c.Wulansari *et al.*, (2019), d.Naz dan Farah, (2012), e. Puspitasari (2013), f. Balqis (2015), g. Rhitmayanti (2014)

Pengamatan kadar vitamin E pada penelitian ini meliputi tokoferol dan tokotrienol. Senyawa yang diukur pada tokoferol yaitu α-tokoferol, dan senyawa

yang diukur pada tokotrienol meliputi α -tokotrienol, δ -tokotrienol, dan γ -tokotrienol. Hasil analisa **Tabel 5.16** menunjukkan bahwa FTT DALMS pada optimasi perbandingan volume pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) mengandung vitamin E sebesar 15.804,52 ppm yang terdiri dari tokoferol (α -tokoferol) sebesar 3.558,93 ppm dan tokotrienol sebesar 12.245,59 ppm. Nilai tokotrienol tersebut terdiri dari α -tokotrienol 4.437,60 ppm, δ -tokotrienol 3760,72 ppm, dan γ -tokotrienol 4.047,27 ppm.

Nilai vitamin E, yang meliputi α -tokotrienol, δ -tokotrienol, dan γ -tokotrienol pada penggunaan pelarut daur ulang memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Chang et al., (2016), Estiasih et al., (2014), Puspitasari (2013), dan Rhitmayanti (2014) yaitu vitamin E pada FTT DALMS berkisar antara 7.662 – 19.600 ppm. Pada produksi FTT DALMS menggunakan perbandingan hasil optimasi, terjadi peningkatan nilai total vitamin E dibandingkan dengan perlakuan hasil optimasi menggunakan pelarut baru. Begitupula pada nilai α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, dan γ -tokotrienol mengalami peningkatan kadar vitamin E. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan perbandingan pelarut setelah optimasi (pelarut etanol : heksana : akuades 6,5 : 9,7 : 12,6) lebih efektif dalam melakukan saponifikasi dan ekstraksi dibandingkan dengan penggunaan perbandingan pelarut etanol : heksana : akuades (8 : 15 : 20). Penggunaan rasio pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) telah optimal dalam ekstraksi rendemen dan vitamin E. Diperlukan rasio pelarut dan sampel yang tepat pada ekstraksi dan saponifikasi FTT DALMS. Penggunaan jumlah pelarut polar yang terlalu tinggi dapat menurunkan kemampuan ekstraksi vitamin E, karena vitamin E fraksi tokoferol dan tokotrienol memiliki gugus metil yang bersifat nonpolar (Oliveira et al., 2011). Rasio heksana dan DALMS saat mengekstraksi FTT dibutuhkan perbandingan yang tepat. Penggunaan heksana yang terlalu sedikit tidak mampu mengekstraksi vitamin E secara maksimal akibat kurangnya tegangan antarmuka pada heksana dan DALMS, sehingga agitasi antara DALMS dan pelarut kurang efektif, sedangkan penggunaan heksana berlebih mengakibatkan ekstraksi tidak efektif dari segi ekonomis karena terlalu banyak pelarut yang digunakan sehingga nilai ekonomis akan semakin meningkat (Djaeni & Listyadevi, 2019; Oliveira et al., 2011).

Selain mengandung vitamin E dalam bentuk tokotrienol dan tokoferol, DALMS juga mengandung komponen fitosterol. Pada penggunaan perbandingan pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6), diperoleh total fitosterol

18.851,28 ppm dengan kadar β -sitosterol 18.007,13 ppm, stigmasterol 372,95 ppm dan kampesterol 471,20 ppm. Nilai fitosterol FTT DALMS pada penggunaan pelarut bekas memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Balqis (2015), Estiasih *et al.*, (2014), Puspitasari (2013) dan Wulansari *et al.*, (2019) yaitu berkisar antara 300 – 88.378 ppm.

Penggunaan perbandingan pelarut setelah dilakukan optimasi, yaitu etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) menyebabkan terjadinya penurunan pada total fitosterol dibandingkan dengan penggunaan perbandingan pelarut sebelum optimasi. Hal ini terjadi karena adanya penurunan nilai stigmasterol dan kampesterol pada penggunaan perbandingan pelarut setelah optimasi. Pada perbandingan pelarut setelah optimasi terjadi banyak pengurangan pada penggunaan heksana. Rasio penggunaan heksana sebelum optimasi yaitu sampel : heksana 1:15, dan setelah optimasi menjadi 1 : 9,7. Heksana berperan pada tahap ekstraksi FTT DALMS. Sementara itu, pelarut etanol yang berperan sebagai pelarut pada tahap saponifikasi mengalami penurunan jumlah perbandingan setelah optimasi lebih sedikit dibandingkan heksana yaitu sampel : etanol (1 : 6,5), dibandingkan sebelum optimasi (1 : 8). Hal ini mengakibatkan keadaan setelah optimasi pelarut cenderung lebih polar dibandingkan kondisi sebelum dilakukan optimasi pelarut. dibandingkan mengakibatkan penggunaan pelarut.

Stigmasterol memiliki polaritas lebih rendah, yang kemudian diikuti oleh kampesterol, lalu β -sitosterol yang memiliki polaritas tertinggi dari ketiga jenis fitosterol ini (Dikshit *et al.*, 2020). Karena kondisi setelah optimasi cenderung lebih polar, sedangkan stigmasterol dan kampesterol memiliki nilai polaritas yang lebih rendah, maka terjadi penurunan kadar stigmasterol dan kampesterol setelah optimasi pelarut, sehingga menyebabkan penurunan kadar fitosterol total. Akan tetapi, meskipun kadar fitosterol total mengalami penurunan, terjadi peningkatan kadar β -sitosterol pada penggunaan perbandingan pelarut setelah optimasi dikarenakan β -sitosterol memiliki polaritas lebih tinggi dibandingkan stigmasterol dan kampesterol. Faktor lain yang menyebabkan kadar β -sitosterol meningkat yaitu kondisi setelah optimasi cenderung lebih polar dibandingkan kondisi sebelum dilakukan optimasi.

Kadar β -karoten dan α -karoten FTT DALMS menggunakan perbandingan optimasi pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) tidak terdeteksi. Hal ini dapat terjadi karena DALMS memiliki warna pucat akibat adanya proses *pre-*

treatment pemurnian pada pengolahan minyak sawit. DALMS merupakan produk samping dari penyulingan CPO pada proses deodorisasi, *bleaching*, dan *degumming* (Wei *et al.*, 2004 dan Xu *et al.*, 2020). Proses tersebut bertujuan untuk memurnikan CPO pada proses pengolahan minyak goreng. Penggunaan asam selama proses pemurnian menyebabkan karoten terdegradasi, karena adanya reaksi protonasi antara karoten dengan asam berkekuatan sedang (Wei *et al.*, 2004). Reaksi ini menghasilkan produk samping berupa DALMS dengan warna pucat kekuningan yang memiliki kadar β -karoten dan α -karoten sangat rendah sehingga pada penelitian ini tidak terdeteksi (Lokman *et al.*, 2014).

Kadar skualen pada FTT DALMS dengan perbandingan optimasi pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) diperoleh nilai sebesar 40.670,86 ppm. Nilai skualen yang diperoleh pada optimasi pelarut memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Balqis (2015) serta Naz dan Farah (2012) yaitu nilai skualen pada FTT DALMS berkisar antara 21.018 – 132.100 ppm. Optimasi pelarut pada saponifikasi dan ekstraksi DALMS dengan perbandingan etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) menghasilkan nilai skualen yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan penggunaan pelarut sebelum dioptimasi. Hal ini dapat terjadi karena polaritas etanol daur ulang yang digunakan semakin meningkat sehingga dapat meningkatkan kemampuannya dengan mengikat skualen. Menurut Farjaminezhad & Garoosi (2020), penggunaan etanol 50% mampu menghasilkan nilai skualen lebih tinggi dibandingkan penggunaan pelarut etanol 100%, dimana etanol 50% memiliki polaritas yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol 100%.

Secara keseluruhan, kandungan senyawa bioaktif pada FTT DALMS dengan saponifikasi menggunakan perbandingan pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) mengalami peningkatan pada total vitamin E yang meliputi nilai α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol. Penggunaan perbandingan pelarut setelah optimasi juga dapat meningkatkan kadar β -sitosterol, dan skualen. Akan tetapi penggunaan optimasi pelarut etanol : heksana : akuades (6,5 : 9,7 : 12,6) menyebabkan terjadinya penurunan kadar kampesterol dan stigmasterol, serta tidak dapat mengekstrak α -karoten dan β -karoten pada DALMS.

5.6 Perbandingan Pelarut : DALMS Sebelum Optimasi dan Setelah Optimasi

Penggunaan pelarut : DALMS setelah optimasi mengalami penurunan volume, akan tetapi dapat melakukan saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS lebih optimal. Berikut merupakan perbandingan pelarut : DALMS dan rendemen FTT yang dihasilkan saat sebelum optimasi dan setelah dilakukan optimasi, pada **Tabel 5.16**.

Tabel 5.16 Perbandingan Rasio Pelarut : DALMS yang Digunakan Sebelum dan Sesudah Optimasi

| Perlakuan Optimasi | Etanol : DALMS (v/b) | Heksana : DALMS (v/b) | Akuades : DALMS (v/b) |
|--------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Sebelum | 8 : 1 | 15 : 1 | 20 : 1 |
| Sesudah | 6,5 : 1 | 9,7 : 1 | 12,6 : 1 |

5.7 Penggunaan Pelarut Daur Ulang Pada Saponifikasi dan Ekstraksi FTT DALMS

Penggunaan pelarut daur ulang pada saponifikasi dan ekstraksi DALMS bertujuan untuk efisiensi nilai ekonomis untuk ekstraksi FTT yang mengandung senyawa bioaktif multikomponen, selain itu penggunaan pelarut organik yang digunakan untuk saponifikasi dan ekstraksi berasal dari minyak bumi yang tidak terbarukan dan dinilai tidak ramah lingkungan (Kumar *et al.*, 2017; Selka *et al.*, 2016). Pelarut daur ulang yang digunakan yaitu etanol dan heksana sekali pakai pada saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS, yang dilakukan penyulingan dengan destilasi. Perbandingan volume pelarut yang digunakan pada saponifikasi dan ekstraksi pelarut daur ulang menggunakan perbandingan hasil optimasi pelarut yang telah dilakukan pada tahap sebelumnya. Perbandingan yang digunakan masing-masing yaitu etanol : sampel 6,5:1, heksana:sampel 9,7:1 dan akuades 12,6:1. Tahap ini dilakukan untuk mengamati apakah terdapat perbedaan hasil rendemen ketika menggunakan pelarut baru, pelarut daur ulang, serta kombinasi pelarut baru dan pelarut daur ulang. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan mengamati rendemen pada 4 perlakuan berbeda, yaitu kombinasi pelarut etanol baru : heksana baru, kombinasi pelarut etanol baru : heksana daur ulang, kombinasi pelarut etanol daur ulang : heksana baru, dan kombinasi perlakuan etanol daur ulang : heksana daur ulang. Perlakuan terbaik dari 4 perlakuan tersebut akan dilakukan pengamatan lanjutan seperti mengamati bilangan peroksida dan bilangan *p*-anisidin, serta pengamatan terhadap senyawa bioaktif (karoten,

skualen, fitosterol, dan vitamin E) dilakukan untuk mengetahui profil rendemen yang dihasilkan.

5.7.1 Rendemen FTT DALMS Hasil Optimasi Pelarut pada Penggunaan Pelarut Baru, Pelarut Daur Ulang, dan Kombinasi Keduanya

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan melakukan saponifikasi dan ekstraksi DALMS menggunakan kombinasi pelarut etanol baru : heksana baru, pelarut etanol baru : heksana daur ulang, pelarut etanol daur ulang : heksana baru, dan perlakuan etanol daur ulang : heksana daur ulang, sehingga terbentuk 4 perlakuan. Masing-masing perlakuan kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Rendemen yang dihasilkan kemudian dihitung, dan dilakukan uji peroksida dan anisidin untuk mengetahui kualitas FTT yang dihasilkan, serta dilakukan pengukuran kadar senyawa bioaktif yaitu karotenoid (β -karoten dan α -karoten), fitosterol, skualen, dan vitamin E. Kadar rendemen FTT yang diperoleh pada tahap ini tertera pada **Tabel 5.16**.

Tabel 5.17 Kadar Rendemen FTT yang Diperoleh pada Uji Coba Penggunaan Pelarut Baru dan Pelarut Daur Ulang

| Kombinasi Pelarut | Rendemen FTT (%) |
|--|--------------------------|
| Etanol Baru : Heksana Baru | 2,23 ± 0,18 ^a |
| Etanol Baru : Heksana Daur Ulang | 1,99 ± 0,11 ^a |
| Etanol Daur Ulang : Heksana Baru | 2,07 ± 0,08 ^a |
| Etanol Daur Ulang : Heksana Daur Ulang | 2,14 ± 0,15 ^a |

Keterangan : * Data merupakan rerata dari 5 kali ulangan
 * Angka setelah ± adalah standar deviasi
 * Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan pada BNT 95% ($\alpha=0,05$)

Berdasarkan hasil analisa, rendemen DALMS dari 4 perlakuan tersebut diperoleh nilai antara 1,99 – 2.23 %. Secara statistik, kadar rendemen FTT DALMS tidak dipengaruhi secara nyata ($\alpha = 0.05$) oleh penggunaan pelarut baru, pelarut daur ulang, maupun kombinasi penggunaan pelarut baru dan daur ulang. Rerata rendemen tertinggi terdapat pada perlakuan saponifikasi dan ekstraksi menggunakan etanol baru : heksana baru, sebesar 2.23 ± 0.18%. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut baru maupun pelarut daur ulang tidak menghasilkan perbedaan rendemen yang tidak nyata.

Ekstraksi dan saponifikasi DALMS guna menghasilkan FTT membutuhkan banyak pelarut dengan nilai rendemen yang sedikit. Efektivitas dan efisiensi penggunaan pelarut pada saponifikasi dan ekstraksi FTT diperukan karena penggunaan pelarut berasal dari sumber tidak terbarukan dan limbah pelarut yang sulit terdegradasi sehingga memberikan dampak negatif pada lingkungan. Penggunaan jumlah pelarut yang tepat juga berpengaruh terhadap biaya produksi FTT, sehingga diharapkan penggunaan pelarut daur ulang dapat digunakan kembali untuk melakukan ekstraksi dan saponifikasi DALMS guna menghasilkan FTT. Berdasarkan pada penelitian ini, penggunaan pelarut daur ulang tidak berbeda nyata dalam menghasilkan rendemen FTT jika dibandingkan dengan penggunaan pelarut baru maupun kombinasi pelarut baru dan daur ulang. Hal ini dapat terjadi karena pelarut daur ulang sekali pakai yang digunakan pada penelitian ini belum mencapai titik jenuh sehingga dapat menghasilkan rendemen FTT yang tidak berbeda nyata dengan pelarut baru dan kombinasi pelarut baru : daur ulang.

Kejenuhan pelarut daur ulang dapat mempengaruhi efektivitas dan efisiensi saponifikasi DALMS. Kejenuhan pelarut dapat terjadi karena berbagai faktor yaitu titik tercapainya keadaan jenuh larutan sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu, tekanan, dan kontaminasi (Kar *et al.*, 2016). Suhu saponifikasi dan ekstraksi serta tekanan pada penelitian ini dilakukan menggunakan suhu yang rendah, yaitu berkisar antara 45°C sampai 65°C dengan tekanan 200 mbar. Kondisi ini mampu menjaga pelarut dari kejenuhan. Pada penelitian ini untuk menghasilkan pelarut daur ulang, pelarut dilakukan filtrasi kemudian didestilasi sehingga dapat menjaga kemurnian pelarut (Lynam *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, alkohol akan terdestilasi pada suhu 78°C - 80°C, sedangkan heksana akan terdestilasi pada suhu 45°C dengan tekanan 200 mbar. Kondisi ini memungkinkan asam lemak bebas yang terlarut pada alkohol akan terpisah dari pelarut alkohol. Begitupun dengan heksana, pada kondisi tersebut senyawa nonpolar yang terlarut didalamnya akan dipisahkan sehingga diperoleh pelarut heksana daur ulang.

Pada penelitian ini, berdasarkan hasil uji statistik diperoleh hasil yang tidak berbeda nyata antar perlakuan. Oleh karena itu kombinasi penggunaan pelarut etanol daur ulang dan heksana daur ulang dapat digunakan untuk melakukan saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS, yang selanjutnya akan dilakukan uji bilangan peroksida dan bilangan *p*-anisidin, serta pengamatan terhadap senyawa bioaktif (karoten, skualen, fitosterol, dan vitamin E) untuk mengetahui profil

rendemen yang dihasilkan. Penggunaan kombinasi pelarut daur ulang dapat meningkatkan efisiensi biaya produksi FTT DALMS dan mengurangi penggunaan pelarut serta jumlah limbah terbuang. Hal ini dapat memberi dampak positif bagi lingkungan karena pelarut yang digunakan berasal dari sumber tidak terbarukan dan membutuhkan proses lebih lanjut dalam pengolahan limbah.

5.7.2 Tingkat Oksidasi

Hasil analisa tingkat oksidasi DALMS dapat dilihat pada Tabel 5.17 berikut ini.

Tabel 5.18 Hasil Analisa Tingkat Oksidasi DALMS

| Karakteristik | FTT DALMS menggunakan Pelarut Daur Ulang | FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | p-value | Literatur |
|-----------------------------|--|---------------------------------------|---------|-----------------|
| Bilangan Peroksida (mek/kg) | 11,12±0,08 | 10,29±0,35 | 0,195 | 1-17*, 1-9** |
| Bilangan p-Anisidin | 13,65±0,18 | 12,19±0,01 | 0,059 | 6,91***, 6-31** |

Sumber: *.Chang *et al.*, 2016, **. Estiasih dan Ahmadi, 2018, ***. Ahmadi *et al.*, 2018
 Keterangan : * Data merupakan rerata dari 2 kali ulangan
 * Angka setelah ± adalah standar eror

5.7.2.1 Bilangan Peroksida

Bilangan Peroksida pada FTT DALMS menggunakan pelarut daur ulang memiliki nilai yang tinggi, yaitu 11,12 ± 0,08 mek/kg. Nilai bilangan peroksida FTT DALMS menggunakan pelarut daur ulang secara statistik tidak berbeda nyata ($\alpha = 0.05$) dengan nilai FTT DALMS hasil optimasi menggunakan pelarut baru. Meski begitu, FTT DALMS pelarut daur ulang memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan FTT DALMS hasil optimasi (menggunakan pelarut baru), yaitu sebesar 10,29 ± 0,35 mek/kg. Bilangan peroksida FTT DALMS berkisar antara 1 – 17 mek/kg (Chang *et al.*, 2016; Estiasih dan Ahmadi, 2018).

Menurut Chang *et al.*, (2016) bilangan peroksida pada FTT DALMS dipengaruhi oleh kondisi bahan baku DALMS sebelum proses saponifikasi. Nilai peroksida yang tinggi mampu menginterpretasikan ketengikan lemak. Ketengikan lemak menunjukkan telah terjadi oksidasi pada asam lemak. Bilangan peroksida akan meningkat seiring dengan kualitas bahan baku yang kurang baik. Menurut Hoseini dan Danesh (2019), oksigen, cahaya, panas, ion logam, dan enzim

merupakan agen yang dapat mempercepat kerusakan oksidatif minyak. Oksidasi minyak juga dipengaruhi oleh komposisi asam lemak, pigmen, fosfolipid, asam lemak bebas, mono dan diasilgliserol dan senyawa termal teroksidasi (Choe dan Min, 2006).

Penggunaan pelarut daur ulang menghasilkan bilangan peroksida yang tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan optimasi menggunakan pelarut baru. Hal ini dapat terjadi karena pelarut daur ulang yang digunakan merupakan pelarut daur ulang sekali pakai sehingga belum terjadi kejenuhan pada pelarut. Walaupun tidak terdapat perbedaan yang signifikan, tetapi terdapat peningkatan nilai peroksida pada penggunaan pelarut daur ulang. Peningkatan bilangan peroksida dapat terjadi akibat akumulasi peroksida pada pelarut etanol daur ulang. Peroksida merupakan senyawa polar, yang memiliki polaritas lebih tinggi dibandingkan asam lemak asalnya (Ahmadi, 2010). Hal ini dapat memicu akumulasi peroksida pada etanol setelah dilakukan destilasi dan ketika digunakan ulang pada proses saponifikasi menghasilkan nilai yang lebih.

Uji beda pada bilangan peroksida dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan tingkat oksidasi berdasarkan bilangan peroksida pada saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut baru dan pelarut daur ulang. Berdasarkan hasil uji beda, diperoleh nilai *p-value* sebesar 0,195. Bilangan *p-value* lebih dari 0,05 yang menunjukkan bahwa penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang tidak memberikan pengaruh nyata terhadap bilangan peroksida FTT DALMS.

5.7.2.2 Bilangan *p*-Anisidin

Berdasarkan hasil analisa, saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS memiliki bilangan *p*-Anisidin sebesar $13,65 \pm 0,08$. Secara statistik, terdapat perbedaan nyata ($\alpha=0.05$) bilangan *p*-Anisidin pada FTT DALMS hasil optimasi dengan FTT DALMS pelarut daur ulang. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa penggunaan pelarut daur ulang berpengaruh nyata terhadap bilangan *p*-Anisidin. Uji lanjut menggunakan BNT 95% menunjukkan adanya pengaruh pada saponifikasi dan ekstraksi FTT hasil optimasi dengan saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut daur ulang. Tabel 5.15 menunjukkan rerata bilangan *p*-Anisidin pada FTT DALMS. Rerata bilangan *p*-Anisidin pelarut daur ulang memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan pada hasil optimasi, yaitu $12,19 \pm 0,01$. Pada penelitian ini, bilangan *p*-Anisidin yang dihasilkan sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ahmadi

et al., (2018) serta Estiasih dan Ahmadi, (2018), yaitu bilangan p -Anisidin berkisar antara 6-31. Berdasarkan hasil uji beda pada bilangan p -Anisidin diperoleh nilai p -value sebesar 0,059. Bilangan p -value lebih dari 0,05 menunjukkan bahwa penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang tidak memberikan pengaruh nyata terhadap bilangan p -Anisidin FTT DALMS.

Bilangan p -Anisidin pada penelitian ini menunjukkan bahwa telah terjadi oksidasi sekunder pada DALMS. Proses deodorisasi minyak sawit memerlukan panas yang tinggi, berkisar antara 150-250°C dan dapat menyebabkan oksidasi. Hidroperoksida sebagai hasil oksidasi primer bersifat tidak stabil dan akan berubah menjadi produk sekunder yang terdiri dari persenyawaan alkohol, aldehida dan hidrokarbon (Peng *et al.*, 2017). Penggunaan pelarut daur ulang memiliki bilangan p -Anisidin yang lebih tinggi dan berbeda nyata dibandingkan pada perlakuan hasil optimasi. Hal ini dapat terjadi karena terdapat akumulasi aldehida pada alkohol daur ulang hasil destilasi.

Aldehida merupakan senyawa bersifat polar dan volatil (Payongsri *et al.*, 2015). Bentuk aldehida yang terdapat pada fraksi tersabunkan yaitu alkana, (E) - 2-alkena, (E, E) -2,4-alkadienals, (Z, E) - 2,4-alkadienal, dan 4-oksoalkanal (Guillén dan Uriarte, 2012). Pada saat destilasi fraksi tersabunkan, alkohol akan terpisah dari fraksi tersabunkan. Pada proses destilasi tersebut, sifat aldehida yang polar dan volatil ikut menguap bersama alkohol hasil destilasi sehingga pada alkohol daur ulang terdapat residu aldehida. Saat alkohol daur ulang digunakan ulang untuk proses saponikasi DALMS, akan dihasilkan FTT dengan bilangan p -Anisidin lebih tinggi.

5.7.3 Senyawa Bioaktif FTT DALMS menggunakan Pelarut Daur Ulang

FTT DALMS merupakan akumulasi dari senyawa bioaktif hasil saponifikasi dan ekstraksi DALMS. FTT diperoleh dengan melakukan saponifikasi sederhana pada DALMS sehingga diperoleh fraksi tersabunkan dan fraksi tidak tersabunkan mengandung senyawa bioaktif. Penggunaan etanol dan heksana daur ulang mampu menghasilkan nilai rendemen yang tidak berbeda nyata dengan penggunaan pelarut baru. Oleh karena itu dilakukan pengamatan senyawa bioaktif pada FTT DALMS yang menggunakan pelarut daur ulang. Kadar senyawa bioaktif FTT DALMS tercantum dalam **Tabel 5.19**.

Tabel 5.19 Kadar Senyawa Bioaktif FTT DALMS Pelarut Daur Ulang

| Senyawa Bioaktif | FTT DALMS menggunakan Pelarut Daur Ulang | | FTT DALMS pelarut baru hasil optimasi | | Literatur FTT DALMS | |
|-------------------|--|-----------|---------------------------------------|-----------|---|-----------------------------|
| | ppm | % relatif | ppm | % relatif | ppm | % relatif |
| Kadar Vitamin E | 11.938,99 | 1,19 | 15.804,52 | 1,58 | 7.662-19.600 ^{abeg} | 0,76 - 1,96 ^{abeg} |
| α-tokoferol | 1.825,60 | 0,18 | 3.558,93 | 0,36 | 644,11-3145,8 ^{eg} | 0,06-0,31 ^{eg} |
| α-tokotrienol | 3.006,05 | 0,30 | 4.437,60 | 0,44 | 1.860,54-6.546 ^{eg} | 0,19-0,65 ^{eg} |
| δ-tokotrienol | 3.264,58 | 0,33 | 3.760,72 | 0,38 | 4.853,78-4429,6 ^{eg} | 0,49-0,44 ^{eg} |
| γ-tokotrienol | 3.842,76 | 0,38 | 4.047,27 | 0,40 | 609,61-5.478,2 ^{eg} | 0,06-0,55 ^{eg} |
| Total Tokotrienol | 10.113,39 | 1,01 | 12.245,59 | 1,22 | 5.500 ^a , 7.476,56 ^c , 300-620 ^b , 88.378 ^f | 0,55 - 8,84 ^{abcf} |
| Total Fitosterol | 43.781,76 | 4,38 | 18.851,28 | 1,89 | 3.913,37-12.126,70 ^{ef} | 0,39-1,21 ^{ef} |
| β-sitosterol | 42.378,22 | 4,24 | 18.007,13 | 1,80 | 1.774,66-5.254,6 ^{ef} | 0,18-0,52 ^{ef} |
| Stigmasterol | 361,44 | 0,04 | 372,95 | 0,04 | 1.788,53-70.996,70 ^{ef} | 0,18-7,09 ^{ef} |
| Kampesterol | 1.042,09 | 1,04 | 471,20 | 0,05 | td | td |
| α-karoten | td | td | td | td | td | td |
| β-karoten | td | td | td | td | td | td |
| Kadar Skualen | 90.508,73 | 9,05 | 40.670,86 | 4,07 | 21.018 - 132.100 ^{df} | 2,10 - 13,21 ^{df} |
| <i>p-value</i> | | | | 0,396 | | |

Keterangan : td : tidak terdeteksi

Sumber : a.Estiasih *et al.*, (2014), b.Chang *et al.*, (2016), c.Wulansari *et al.*, (2019), d.Naz dan Farah, (2012), e. Puspitasari (2013), f. Balqis (2015), g. Rhitmayanti (2014)

Pada penelitian ini dilakukan analisa perhitungan vitamin E, meliputi tokoferol dan tokotrienol. Senyawa yang diukur pada tokoferol yaitu α-tokoferol, dan senyawa yang diukur pada tokotrienol meliputi α-tokotrienol, δ-tokotrienol, dan γ-tokotrienol. Hasil analisa **Tabel 5.19** menunjukkan bahwa FTT DALMS pada penggunaan pelarut daur ulang mengandung vitamin E sebesar 11.938,99 ppm yang terdiri dari tokoferol (α-tokoferol) sebesar 1825,60 ppm dan tokotrienol sebesar 10.113,39 ppm. Nilai tokotrienol tersebut terdiri dari α-tokotrienol 3006,05 ppm, δ-tokotrienol 3264,5 ppm, dan γ-tokotrienol 3842,76 ppm.

Nilai vitamin E, yang meliputi meliputi α -tokotrienol, δ -tokotrienol, dan γ -tokotrienol pada penggunaan pelarut daur ulang memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Chang et al., (2016), Estiasih et al., (2014), Puspitasari (2013), dan Rhitmayanti (2014) yaitu vitamin E pada FTT DALMS berkisar antara 7.662 – 19.600 ppm. Pada produksi FTT DALMS menggunakan pelarut daur ulang, terjadi penurunan nilai total vitamin E dibandingkan dengan perlakuan hasil optimasi menggunakan pelarut baru. Begitupula pada nilai α -tokotrienol, δ -tokotrienol, dan γ -tokotrienol mengalami penurunan kadar vitamin E. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan pelarut daur ulang yang digunakan selama saponifikasi dan ekstraksi mengalami penurunan efektifitas dalam mengekstrak vitamin E.

Penggunaan etanol dan heksana daur ulang pada saponifikasi dan ekstraksi DALMS dalam menghasilkan FTT berpengaruh terhadap ekstraksi vitamin E. Vitamin E merupakan vitamin larut lemak yang bersifat hidrofobik sehingga larut dalam pelarut non polar (Manurung, *et al.*, 2018), Terjadi penurunan efektivitas pada penggunaan heksana daur ulang sebagai pelarut non polar dalam mengekstrak FTT sehingga nilai vitamin E pada penggunaan pelarut daur ulang menurun. Hal ini dapat terjadi karena adanya kejenuhan pada pelarut daur ulang akibat adanya kontaminan dari senyawa hasil ekstraksi pertama yang tertinggal pada pelarut daur ulang sehingga mengakibatkan efektivitas heksana sebagai pelarut daur ulang menurun (Marron *et al.*, 2018). Kejenuhan pelarut daur ulang dapat mempengaruhi efektivitas dan efisiensi saponifikasi DALMS. Kejenuhan pelarut dapat terjadi karena berbagai faktor yaitu titik tercapainya keadaan jenuh larutan sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu, tekanan, dan kontaminasi (Kar *et al.*, 2016).

Penurunan nilai vitamin E juga dapat terjadi karena penggunaan etanol daur ulang. Etanol daur ulang diperoleh dengan melakukan destilasi fraksi tersabunkan sehingga akan dihasilkan fraksi etanol, air, dan KOH. Etanol dapat mengalami peningkatan polaritas karena telah mengalami interaksi dengan air dan KOH pada proses saponifikasi sebelumnya (Mas *et al.*, 2019), sehingga akan menurunkan laju ekstraksi dan menyebabkan efektivitas ekstraksi vitamin E menurun.

Selain mengandung vitamin E dalam bentuk tokotrienol dan tokoferol, DALMS juga mengandung komponen fitosterol. Pada penggunaan pelarut daur ulang, diperoleh total fitosterol 43.781,76 ppm dengan kadar β -sitosterol 42.378,22

ppm, stigmasterol 361,44 ppm dan kampesterol 1.042,09 ppm. Nilai fitosterol FTT DALMS pada penggunaan pelarut bekas memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Balqis (2015), Estiasih *et al.*, (2014), Puspitasari (2013) dan Wulansari *et al.*, (2019) yaitu berkisar antara 300 – 88.378 ppm.

Penggunaan pelarut daur ulang menyebabkan terjadinya peningkatan pada total fitosterol, dikarenakan adanya peningkatan nilai β -sitosterol dan kampesterol jika dibandingkan dengan perlakuan hasil optimasi menggunakan pelarut baru. β -sitosterol merupakan jenis fitosterol yang memiliki nilai polaritas tertinggi dibandingkan jenis fitosterol lain. Urutan tingkat kepolaran dari polaritas tertinggi yaitu β -sitosterol, kampesterol, dan stigmasterol. Pada etanol daur ulang terjadi peningkatan polaritas karena untuk menghasilkan etanol daur ulang diperlukan proses daur ulang. Daur ulang dilakukan dengan melakukan destilasi fraksi etanol-air tahap saponifikasi dan ekstraksi FTT pada proses sebelumnya. Pada saat destilasi etanol akan mendidih dan menguap pada suhu 75-80°C, sedangkan pada suhu tersebut air juga mengalami penguapan meskipun belum mendidih. Hal ini memungkinkan tercampurnya uap air dan uap etanol, sehingga tingkat polaritas etanol daur ulang akan meningkat. Menurut Hashim *et al.*, (2019) β -sitosterol dapat terekstrak lebih optimal dengan menggunakan etanol 75% dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan etanol 96%.

Kadar β -karoten dan α -karoten FTT DALMS pada saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut daur ulang tidak terdeteksi. Begitupula dengan FTT DALMS pada hasil optimasi menggunakan pelarut baru, kadar β -karoten dan α -karoten tidak terdeteksi. Hal ini dapat terjadi karena DALMS memiliki warna pucat akibat adanya proses *pre-treatment* pemurnian pada pengolahan minyak sawit. DALMS merupakan produk samping dari penyulingan CPO pada proses deodorisasi, *bleaching*, dan *degumming* (Wei *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2020). Proses tersebut bertujuan untuk memurnikan CPO pada proses pengolahan minyak goreng. Penggunaan asam selama proses pemurnian menyebabkan karoten terdegradasi, karena adanya reaksi protonasi antara karoten dengan asam berkekuatan sedang (Wei *et al.*, 2004). Reaksi ini menghasilkan produk samping berupa DALMS dengan warna pucat kekuningan (Lokman *et al.*, 2014).

Kadar skualen pada FTT DALMS dengan saponifikasi menggunakan pelarut daur ulang diperoleh nilai sebesar 90.508,73 ppm. Nilai skualen yang diperoleh pada penggunaan pelarut daur ulang memiliki kesesuaian dengan

penelitian yang dilakukan oleh Balqis (2015) serta Naz dan Farah (2012) yaitu nilai skualen pada FTT DALMS berkisar antara 21.018 – 132.100 ppm. Penggunaan pelarut daur ulang menghasilkan nilai skualen yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan optimasi menggunakan pelarut baru. Hal ini dapat terjadi karena polaritas etanol daur ulang yang digunakan semakin menurun sehingga dapat meningkatkan kemampuannya dengan mengikat skualen. Menurut Farjaminezhad & Garoosi (2020), penggunaan etanol 50% mampu menghasilkan nilai skualen lebih tinggi dibandingkan penggunaan pelarut etanol 100%.

Secara keseluruhan, kandungan senyawa bioaktif pada FTT DALMS dengan saponifikasi menggunakan pelarut daur ulang mengalami penurunan pada nilai α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol dan stigmasterol. Penggunaan pelarut daur ulang dapat meningkatkan kadar β -sitosterol, kampesterol, dan skualen. Kadar α -karoten dan β -karoten tidak terdeteksi pada saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut daur ulang.

Uji beda pada parameter senyawa bioaktif dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar senyawa bioaktif saat saponifikasi dan ekstraksi menggunakan pelarut baru dan pelarut daur ulang. Berdasarkan hasil uji beda, diperoleh nilai *p-value* sebesar 0,396. Bilangan *p-value* lebih dari 0,05 yang menunjukkan bahwa penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar senyawa bioaktif pada FTT DALMS.

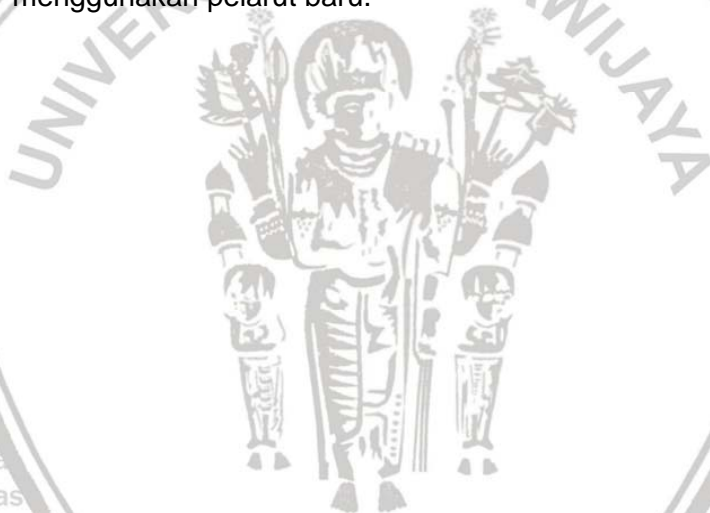
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil optimasi dan verifikasi, penggunaan kombinasi pelarut terbaik adalah perbandingan etanol : sampel (6,5 : 1); heksana : sampel (9,7 : 1) dan akuades (12,6 : 1) dan menghasilkan rerata nilai rendemen 2.23%.
2. Perlakuan optimasi pelarut memiliki kadar β -sitosterol, skualen, dan total Vitamin E (α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol) memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan sebelum optimasi. Perlakuan optimasi memiliki kadar stigmasterol dan kampesterol lebih rendah dibandingkan perlakuan sebelum optimasi. Senyawa α -karoten dan β -karoten tidak dapat terdeteksi pada perlakuan setelah optimasi maupun sebelum optimasi. Optimasi pelarut memiliki bilangan peroksida yang lebih tinggi, serta bilangan *p*-Anisidin yang lebih rendah dibandingkan perlakuan sebelum optimasi.
3. Penggunaan pelarut daur ulang, pelarut baru, dan kombinasi pelarut baru : pelarut daur ulang pada saponifikasi dan ekstraksi FTT DALMS menggunakan perbandingan etanol : DALMS (6,5 : 1), heksana : DALMS (9,7 : 1) dan akuades : DALMS (12,6 : 1) secara statistik memiliki nilai rendemen yang tidak berbeda nyata.
4. Penggunaan pelarut daur ulang memiliki kadar β -sitosterol, kampesterol, dan skualen lebih tinggi dibandingkan pelarut baru. Akan tetapi, penggunaan pelarut daur ulang menghasilkan kadar stigmasterol dan Vitamin E (α -tokoferol, α -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol) lebih kecil dibandingkan pelarut baru. Senyawa α -karoten dan β -karoten tidak dapat terdeteksi pada saponifikasi dan ekstraksi dengan pelarut daur ulang. Bilangan oksidasi pada penggunaan pelarut daur ulang (bilangan peroksida dan *p*-anisidin) memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan penggunaan pelarut baru.
5. Berdasarkan uji beda, penggunaan pelarut baru dan pelarut daur ulang tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar senyawa bioaktif dan bilangan oksidasi (bilangan peroksida dan *p*-anisidin) pada FTT DALMS

6.2 Saran

1. Diperlukan penyimpanan dengan wadah kedap udara dan memiliki suhu lebih stabil untuk menjaga kualitas bioaktif FTT.
2. Diperlukan optimasi ekstraksi karoten agar dapat terdeteksi saat uji HPLC.
3. Diperlukan metode pemisahan yang lebih selektif pada pemisahan fraksi tersabunkan dan FTT sehingga dapat terpisahkan sempurna
4. Diperlukan pengujian lebih lanjut mengenai penggunaan pelarut daur ulang pada saponifikasi yang telah digunakan berulang kali terhadap tingkat oksidasi dan kadar senyawa bioaktif FTT DALMS.
5. Diperlukan uji profiling asam lemak untuk mengetahui apakah ada perbedaan komponen dan kadar asam lemak pada perlakuan optimasi dan daur ulang
6. Diperlukan analisa secara ekonomis apakah penggunaan pelarut daur ulang terbukti lebih terjangkau dan efisien dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut baru.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi K. 2010. Konsentrat vitamin E dari distilat asam lemak minyak sawit: kajian jenis pelarut. *Jurnal Teknologi Pertanian* 11(1): 1–10.
- Ahmadi, K., Estiasih, T. 2010. Optimizing Crystallization Conditions for Obtaining Tocotrienol Enriched Fraction From Palm Fatty Acid Distillate. *International Oil Palm Conference* : 241-250.
- Ahmadi K, Kumalaningsih S, Wijana S, Santoso I. 2013. Antioxidative effect of tocotrienol rich fraction from palm fatty acid distillate on oxidative stress. *Food and Public Health* 3(3): 130–136. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20130303.03>
- Ahmadi K, Oktafa H, Estiasih T, Ahmadi K. 2018. The effect of phytosterol-rich fraction from palm fatty acid distillate on blood serum lipid profile of dyslipidemia rats. *Journal of Dietary Supplements* 15(5): 728-739 <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1406025>
- Ahmed M, Firdaus M, Yusoff M. 2018. Physicochemical properties and analysis of malaysian palm fatty acid distilled. *AIP Conference Proceedings* 1940(1): 020092. <https://doi.org/10.1063/1.5028007>
- An VMŞ, Muste S, Racolta E, Semeniuc CA, Man S, Birou A, Chircu C. 2010. Determination of peroxide value in sunflower halva using a spectrophotometric method. *Bulletin UASVM Agriculture* 67(2): 334–339
- Ansorena D. 2012. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology* 236: 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1866-9>
- Ayoola A, Anawe PA, Ojemuwi M, Amaraibi R. 2016. Comparison of the properties of palm oil and palm kernel oil biodiesel in relation to the degree of unsaturation of their oil. *International Journal of Applied And Natural Sciences* 5(3): 1–8.
- Badan Pusat Statistik. (2017). *Statistik Kelapa Sawit Indonesia 2017*.
- Balqis F. 2015. Fortifikasi roti manis dengan mikroemulsi fraksi tidak tersabunkan dari distilat asam lemak minyak sawit yang mengandung senyawa bioaktif multi komponen. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya.
- Battimelli A, Torrijos M, Moletta R, Delgenès JP. 2010. Bioresource technology slaughterhouse fatty waste saponification to increase biogas yield. *Bioresource Technology* 101(10): 3388–3393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.043>
- Binnal P, Babu PN. 2017. Production of high purity biodiesel through direct saponification of wet biomass of *Chlorella protothecoides* in a low cost microwave reactor. *Kinetic and Thermodynamic Studies* 34(4): 1027–1036. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0002-8>
- Butnariu M. 2016. Methods of analysis (extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products. *Journal of Ecosystem & Ecography* 6(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000193>
- Chang AS, Tufail S, Sherazi H, Kandhro AA, Mahesar SA, Chang F, Shah SN. 2016. Characterization of palm fatty acid distillate of different oil processing



- industries of Pakistan. *Journal of Oleo Sciences* 65(11).
<https://doi.org/10.5650/jos.ess16073>
- Cheah KY, Toh TS, Koh PM. 2010. Palm fatty acid distillate biodiesel: next-generation palm biodiesel. *INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials* 21(5): 264–266.
- Chiu MC, Coutinho CDM, Aparecida L, Gonçalves G. 2009. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. *DES* 245(1–3): 783–786. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.03.002>
- Choe E, Min DB. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety* 5: 169–186.
- Ci U S. 2019. 12 United States Patent 2: 2–5.
- Dikshit S, Bubna S, Gupta A. 2020. Advances in various techniques for isolation and purification of sterols. *Journal of Food Science and Technology* 57(7): 2393–2403. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04209-3>
- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2019). *Statistik Perkebunan Indonesia 2018-2020 (Kelapa Sawit)*, 82
- Djaeni M, Listyadevi YL. 2019. The ultrasound-assisted extraction of rice bran oil with n-hexane as a solvent. *Journal of Physics: Conference Series*.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1295/1/012027>
- Eggersdorfer M, Wyss A. 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
- Estiasih T, Ahmadi K. 2018. Bioactive compounds from palm fatty acid distillate and crude palm oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 131 012016.
- Estiasih, T., Ahmadi, K., Rizqiyah, A. 2015. Mikroemulsifikasi fraksi tidak tersabunkan distilat asam lemak. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*.
<https://doi.org/10.6066/jtip.2015.26.2.189>
- Estiasih T, Ahmadi K, Widyaningsih TD, Rhitmayanti E, Fidyasari A. 2014. The effect of unsaponifiable fraction from palm fatty acid distillate on lipid profile of hypercholesterolaemia rats. *Journal of Food and Nutrition Research* 2(12): 1029–1036. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-12-26>
- Eze, V. C., Harvey, A. P., Phan, A. N. 2015. Determination of the kinetics of biodiesel saponification in alcoholic hydroxide solutions. *FUEL*, 140 :724–730. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.001>
- Faizah, N. J., Noorshamsiana, A. W., Hasamudin, W. H. W., Astimar, A. A., Kamarudin, H., Gapor, M. T. A. 2020. Production of phytosterols mix from palm fatty acid distillate (PFAD) through multi-staged extraction processes. *Energy Security and Chemical Engineering Congress* : 736.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/736/2/022047>
- Farjaminezhad R, Garoosi G. 2020. Establishment of green analytical method for ultrasound-assisted extraction of azadirachtin, mevalonic acid, and squalene from cell suspension culture of *Azadirachta indica* using response surface methodology. *Industrial Crops & Products* 144: 111946.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111946>

- Fidalgo SS, Cárdeno A, Hidalgo MS, Villegas I, Rosillo MA, Lastra CA De. 2013. Dietary unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil supplementation attenuates acute ulcerative colitis in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*: 48: 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.004>
- Fox CB. 2009. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Journal of Molecules* 14(9): 3286–3312. <https://doi.org/10.3390/molecules14093286>
- Gaca J. 2013. Separation of squalene and oil from amaranthus seeds by supercritical carbon dioxide. *Separation and purification technology* 110: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.032>
- Goh SH, Choo YM, Ong SH. 1985. Minor Constituents of Palm Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62(2): 237–238.
- Guergouri, F. Z., Sobhi, W., & Benboubetra, M. 2017. Antioxidant activity of Algerian *Nigella sativa* total oil and its unsaponifiable fraction. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(4) : 234–238.
- Guillén MD, Uriarte PS. 2012. Simultaneous control of the evolution of the percentage in weight of polar compounds, iodine value, acyl groups proportions and aldehydes concentrations in sun flower oil submitted to frying temperature in an industrial fryer. *Food Control* 24(1–2): 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.002>
- Gunawan S, Kasim NS, Ju Y. 2008. Separation and purification of squalene from soybean oil deodorizer distillate. *Separation and Purification Technology* 60(2): 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.08.001>
- H C PP, Lan C, Lin P, Kuo Y. 2017. Effects of cooking method, cooking oil, and food type on aldehyde emissions in cooking oil fumes. *Journal of Hazardous Materials* 324: 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.045>
- Han M, May Y, Ngan A, Hock C, Ali M. 2004. Separation of vitamin E (tocopherol, tocotrienol, and tocomonoenol) in palm oil. *Journal of Lipids* 39(10): 1031–1035. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1327-y>.
- Hanson C, Lyden E, Furtado J, Campos H, Sparrow D, Vokonas P, Litonjua AA. (2016). Serum tocopherol levels and vitamin E intake are associated with lung function in the normative aging study. *Clinical Nutrition* 35(1): 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.01.020>
- Hapsari, I. 2021. Komposisi Senyawa Bioaktif Multikomponen dari Minyak Sawit Kasar dan Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) Serta Fraksi Tidak Tersabunkan dari Berbagai Industri Pemurnian Minyak Sawit. Tesis
- Hashim N, Nour AH, Sakinah M, Munaim A, Almajano MP, Bahirah N. 2019. Extraction of phytosterol concentration in different legume pods by using. *Indonesian Journal of Chemistry* 3(3): 796–803. <https://doi.org/10.22146/ijc.40865>
- Hin EUIHS, Uang YUEHH, Egg ROBP, Hillips RDIP. 2009. Commercial runner peanut cultivars in the united states. *Tocopherol Composition*: 10289–10295. <https://doi.org/10.1021/jf9029546>
- Hoseini M, Danesh M F. 2019. Antioxidant effects of green tea leaf extract on chemical properties of corn refined oil of microwave fried potatoes.

- International Journal of Basic Science in Medicine 4(3): 96–101. <https://doi.org/10.15171/ijbms.2019.18.Introduction>
- Hoskins A, li JLR, Milne G, Choi L, Dworski R. 2012. Natural-source *d-α-tocopheryl acetate* inhibits oxidant stress and modulates atopic asthma in humans in vivo. *Journal of Allergy* 67(5): 676-682. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02810.x>
- ISO 3976. 2006. INTERNATIONAL STANDARD ISO 3976:2006 Milk Fat - Determination of Peroxide Value. ISO and IDF, 2.
- Jaswir I, Noviendri D, Hasrini R, Octavianti F. 2011. Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plant Research* 5(33): 7119–7131. <https://doi.org/10.5897/JMPRx11.011>
- Jumaah MA, Firdaus M, Yusoff M, Salimon J, Bahadi M. 2019. Separation of saturated and unsaturated fatty acids of palm fatty acid distilled via low-temperature methanol crystallization. *Malaysian Journal of Chemistry* 21(2): 8–16.
- Kar T, Ovalles C, Rogel E, Vien J, Hascakir B. 2016. The residual oil saturation determination for Steam Assisted Gravity Drainage (SAGD) and Solvent-SAGD. *FUEL* 172: 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.01.029>
- Kasperczyk J, Osta A, Zaleska-kiolka J, Birkner E. 2014. Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. *Toxicology Applied Pharmacology* 280(1): 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.006>
- Khatoun S, Krishna GA, Rajan RR. 2010. Physicochemical characteristics and composition of indian soybean oil deodorizer distillate and the recovery of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists Society* 87: 321–326. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1499-8>
- Kumar PKP, Krishna AGG. 2014. Physico-chemical characteristics and nutraceutical distribution of crude palm oil and its fractions. *Grasas y Aceites* 65(652): 18-35. <https://doi.org/10.3989/gya.097413>
- Kumar SPJ, Prasad SR, Banerjee R, Agarwal DK, Kulkarni KS, Ramesh KV. 2017. Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds. *Chemistry Central Journal*: 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0238-8>
- Laosiripojana N. 2011. Partial oxidation of palm fatty acids over Ce-ZrO₂: Roles of catalyst surface area, lattice oxygen capacity and mobility. *The Global Home of Chemical Engineers* 57(10): 2861–2869. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Latifah N, Estiasih T. 2016. Microencapsulation unsaponifiable fractions from palm fatty Acid distillate (PFAD) using spray drying method: A Review. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 4(1): 84–88.
- Leong W, Lai O, Long K, Che YB, Misran M, Tan C. 2011. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. *Food Chemistry* 129(1): 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.027>
- Ligand FK, Disruption S, Evidence C, Chin K, Ima-nirwana S. 2012. Vitamin E as an antiosteoporotic agent via receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand signaling disruption: current evidence and other potential research areas. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012.





- <https://doi.org/10.1155/2012/747020>
- Lin X, Ma L, Moreau R A, Jr REO. 2011. Glycosidic bond cleavage is not required for phytosteryl glycoside-induced reduction of cholesterol absorption in mice. *Journal of Lipids* 46(8): 701-708. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3560-2>
- Liu D, Shi J, Posada LR, Kakuda Y, Xue SJ. 2008. Separating tocotrienols from palm oil by molecular distillation. *Food Reviews International* 24(4): 376–391. <https://doi.org/10.1080/87559120802303840>
- Lokman IM, Rashid U, Zainal Z, Yunus R, Taufiq-yap YH. 2014. Microwave-assisted biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. *Journal of Oleo Science*. 63(9): 849–855.
- Lozano-grande MA, Gorinstein S, Espitia-rangel E, Gloria D, Mart AL. 2018. Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International Journal of Agronomy* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1829160>
- Lynam JG, Chow GI, Coronella CJ, Hiibel SR. 2016. Ionic liquid and water separation by membrane distillation. *Chemical Engineering Journal* 288: 557–561. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.028>
- Manurung R, Hutauruk GR, Arief A. 2018. Vitamin E extraction from red palm biodiesel by using K_2CO_3 based deep eutectic solvent with glycerol as hydrogen bond donor. *AIP Conference Proceedings* 1977. 020011 (2018). <https://doi.org/10.1063/1.5042867>
- Marron EL, Mitch WA, Sedlak DL. 2018. A tale of two treatments: the multiple barrier approach to removing chemical contaminants during potable water reuse. *Account of Chemical Research* 52(3): 615-622. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00612>
- Mas'ud F, Bangngalino H, Indriati S, Todingbua A, Sayuti M. 2019. Model development to enhance the solvent extraction of rice bran oil. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*. 26 (16) : 1-9. <https://doi.org/10.1051/ocl/2019009>
- Mehta BM, Darji VB, Aparnathi KD. 2015. Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee. *Food Chemistry* 185: 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.023>
- Mendow, G., Veizaga, N. S., Querini, C. A. 2011. Bioresource Technology Ethyl ester production by homogeneous alkaline transesterification : Influence of the catalyst. *Bioresource Technology*, 102(11) : 6385–6391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.072>
- Moran NA., Jarvik T. 2012. Lateral transfer of genes from fungi underlines carotenoid production in Aphids. *Journal of Science* 328(5978): 624-627. <https://doi.org/10.1126/science.1187113>
- Moreda W & Cert A. 2001. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *Journal of Chromatography* 936(1-2): 159–171. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01222-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01222-5)
- Mukherjee S., Mitra A. 2009. Health effects of palm oil. *Journal of Human Ecology* 26(3): 197–203.
- Naz S., Farah STHS. 2012. Determination of unsaponifiable constituents of deodorizer distillates by GC – MS. *Journal of the American Oil Chemists Society* 89(6): 973–977. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-2000-z>

- Naziri E., Tsimidou MZ. 2013. Formulated squalene for food related applications. *Recent Pat Food Nutr Agric* 5(2): 83-104. <https://doi.org/10.2174/18761429113050200001>
- Nells HJCF., Leenheer AP De. 1983. Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Analytical Chemistry*: 55(2): 270-274. <https://doi.org/10.1021/ac00253a021>
- Ngadi M., Mba OI. 2015. Palm oil: processing, characterization and utilization in the food industry – A review. *Journal of Food Bioscience* 10(1): 26-41. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.01.003>
- Nielsen MM., Hansen Å. 2008. Rapid High-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chemistry* 85(2): 248-251. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-2-1248>
- Norhidayah, S., Baharin, B., Hamed, M., Zaidul, I. S. M. 2012. Squalene recovery from palm fatty acid distillate using supercritical fluid extraction. *International Food Research Journal*, 19(4) : 1661-1667.
- Nyam KL, Tan CP, Lai OM, Long K, Man YBC. 2009. Food and bioproducts processing optimization of supercritical fluid extraction of phytosterol from roselle seeds with a central composite design model. *Food and Bioproducts Processing* 88(2-3): 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.11.002>
- Olabanji IO, Oluyemi EA, Ajayi OS. 2012. Metal analyses of ash derived alkalis from banana and plantain peels (*Musa spp.*) in soap making. *African Journal of Biotechnology* 11(99): 16512-16518. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2255>
- Oliveira R, Oliveira V, Aracava KK, Elisabete C. 2011. Food and bioproducts processing effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol — a response surface approach. *Food and Bioproducts Processing* 90(1): 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.004>
- Paquot C. 1979. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* (6th ed.). Pergamont. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-10129-8>
- Payongsri P, Steadman D, Hailes HC, Dalby PA. 2015. Enzyme and microbial technology second generation engineering of transketolase for polar aromatic aldehyde substrates. *Enzyme and Microbial Technology* 71: 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.01.008>
- Pe L. 2009. Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *Journal of Bioessays* 31(10): 1116-1126. <https://doi.org/10.1002/bies.200900070>
- Pinto JSS., Lanças FM. 2006. Hydrolysis of corn oil using subcritical water. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(1): 85-89. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100013>
- Rawal G, Healthcare M, Yadav S, Clinic C, Nagar M, Delhi. 2015. Phytosterols and the health. *Medico Research Chronicles* 2(3): 441-444. ISSN No 2394-3971
- Rimbach G, Minihane AM, Majewicz J, Fischer A, Pallauf J, Virgli F, Weinberg PD. 2002. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society* 61: 415-425. <https://doi.org/10.1079/PNS2002183>
- Rimbach G, Moehring J, Huebbe P, & Lodge JK. 2010. Gene-regulatory activity of α -tocopherol. *Journal of Molecules* 15(3): 1746-1761. <https://doi.org/10.3390/>

molecules15031746

Rodr L, Shi J, Kakuda Y, Jun S. 2007. Extraction of tocotrienols from palm fatty acid distillates using molecular distillation. *Separation and Purification Technology* 57(2): 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.04.016>

Rukmini A., Raharjo S. 2010. Pattern of peroxide value changes in virgin coconut oil (VCO) due to photo-oxidation sensitized by chlorophyll. *Journal of the American Oil Chemist Society* 87(12): 1407–1412. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1641-7>

S N. 2012. Squalene recovery from palm fatty acid distillate using supercritical fluid extraction. *International Food Research Journal*. 19(4): 1661–1667.

Saini RK., Keum Y. 2018. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry* 240: 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>

Salimon J, Abdullah BM, Salih N. 2012. Saponification of Jatropha curcas seed oil : optimization by d-optimal design. 2012: 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/574780>

Sampaio, K. A., Ayala, J. V., Hoed, V. Van, Monteiro, S., Ceriani, R., Verh, R. 2017. Impact of Crude Oil Quality on the Refining Conditions and Composition of Nutraceuticals in Refined Palm Oil, 00(0) : 1–9. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13805>

Sánchez-quesada C, López-biedma A, Toledo E, Gaforio JJ. 2018. Squalene stimulates a key innate immune cell to foster wound healing and tissue repair. *Evid Based Complement Alternative Medicine* 2018: 9473094. <https://doi.org/10.1155/2018/9473094>

Sari, S. A., Firdaus, M., Fadilla, N. A., Irsanti, R. 2018. Studi Pembuatan Sabun Cair dari Daging Buah Pepaya (Analisis TALENTA Conference Series Studi Pembuatan Sabun Cair dari Daging Buah Pepaya (Analisis. TALENTA Conference Series: Science & Technology (ST), 2(1). <https://doi.org/10.32734/st.v2i1.313>

Selka A, Balcells M, Bily A, Touaibia M, Chemat F. 2016. Substitute n-hexane for the extraction of bioactive. 6596–6608. <https://doi.org/10.1039/c6gc02191c>

Serri NA, Kamarudin AH, Rahaman SNA. 2008. Preliminary studies for production of fatty acids from hydrolysis of cooking palm oil using *C.rugosa lipase*. *Journal of Physical Therapy Science* 19(1): 79–88.

Shahidi F., Camargo AC De. 2016. Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources: occurrence, applications, and health benefits. *International Journal Molecular Science* 17(10):1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms17101745>

Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. 2012. Chemical engineering and processing : process intensification intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* 53: 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>

Singh I, Nair RS, Gan S, Cheong V, Morris A. 2018. Accept us. *Pharmaceutical Development and Technology*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1509347>

- Spanova M. 2011. Review article squalene–biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(11): 1–22. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100203>
- Sugawara T, Yamashita K, Asai A, Nagao A, Shiraishi T. 2009. Esterification of xanthophylls by human intestinal CaCO₂ cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483(2): 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.007>
- Syairah S., Mutalip M. 2018. Vitamin E as an antioxidant in female reproductive health. *Journal of Antioxidants (Basel)* 26;7(22): 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox7020022>
- Tay B, Ping Y, Yusof M. 2009. Characteristics and properties of fatty acid distillates from palm oil. *Oil Palm Bulletin* 59: 5–11.
- Toomey MB., Mcgraw KJ. 2007. Modified saponification and HPLC methods for analyzing carotenoids from the retina of quail: implications for its use as a nonprimate model species. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 3976–3982. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0208>
- Top AG. 2010. Production and utilization of palm fatty acid distillate (PFAD). *Lipid Technology* 22(1): 11–13. <https://doi.org/10.1002/lite.200900070>
- Tufail S, Sherazi H, Mahesar SA. 2016. Vegetable oil deodorizer distillate: a rich source of the natural bioactive components. *Journal of Oleo Science* 966(12): 957–966. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16125>
- Vicente G, Paiva A, Fornari T, Najdanovic-visak V. 2011. Liquid-liquid equilibria for separation of tocopherol from olive oil using ethyl lactate. *Chemical Engineering Journal* 172(2–3): 879–884. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.077>
- Vieira C, Hachemi I, Mäki-arvela P, Smeds A, Aho A, Pereira S, Yu D. 2015. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella sp.* *ALGAL* 11: 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.014>
- Wandira I, Legowo H, Widiputri DI. 2017. Optimization of Squalene produced from crude palm oil waste. *AIP Conference Proceedings* 1803, 020061. <https://doi.org/10.1063/1.4973188>
- Wei PC, May CY, Hock CC. 2004. Degumming and bleaching: effect on selected constituents of palm oil. *Journal of Oil Palm Research* 16(2): 57–63.
- Weisbjerg MR, Wiking L, Kristensen NB, Lund P. 2020. Effects of supplemental dietary fatty acids on milk yield and fatty acid composition in high and medium yielding cows (2008). *The Journal of Dairy Research* 75(2): 142–152. <https://doi.org/10.1017/S002202990800318X>
- Wulansari A, Estiasih T, Yunianta Y. (2019). Mini review : potensi hipokolesterolemik fraksi tidak tersabunkan dari distilat asam lemak minyak sawit. *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian* 3(2): 170–181. <https://doi.org/10.26877/jiphp.v3i2.5359>
- Xiao H, Yao Z, Peng Q, Ni F, Sun Y, Zhang CX, Zhong ZX. 2016. Extraction of squalene from camellia oil by silver ion complexation. *Separation and Purification Technology* 169: 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.05.041>
- Xu H, Lee U, Wang M. 2020. Life-cycle energy use and greenhouse gas emissions



of palm fatty acid distillate derived renewable diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 134. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110144>

Yong H, Tan WSD, Khee T, Wei C, Foster PS, Wong WSF. 2017. Free radical biology and medicine vitamin E isoform γ -tocotrienol protects against emphysema in cigarette. *Free Radical Biology and Medicine* 110: 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.023>



LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Analisa

1.1 Analisa Bilangan Peroksida (ISO 3976 (2006) dan Mehta *et al.*, (2015))

A. Persiapan Bahan Kimia

a. Larutan amonium tiosianat. Dibuat dengan cara melarutkan 30 g amonium tiosianat dalam akuades hingga 100 ml.

b. Larutan Ferro klorida (FeCl_2) dibuat dengan cara melarutkan 0,4 g BaCl_2 dalam air deionisasi hingga 50 ml. Disisi lain ferro sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam air deionisasi hingga 50 ml. Kemudian larutan BaCl_2 perlahan dituangkan ke larutan ferro sulfat sembari diaduk. Lalu ditambahkan HCl 10N sebanyak 2 ml dan diaduk. Larutan yang terbentuk disaring dengan kertas saring whatman no 1. Filtrat disimpan dalam botol gelap dan hanya dipakai dalam jangka waktu 1 minggu.

B. Membuat Kurva Standart Fe.

a. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,50 g dilarutkan dalam 50 ml HCl 10 N dan dioksidasi dengan 1 ml – 2 ml H_2O_2 (30% b/v). Sisa H_2O_2 dihilangkan dengan mendidihkan larutan.

b. Larutan diencerkan menjadi 500 ml digunakan sebagai stock larutan standar.

c. Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ppm dengan mengencerkan larutan stock menggunakan pelarut benzana : metanol 70:30 (v/v) sampai volume 10 ml. Pada larutan ini ditambahkan 1 tetes larutan amonium tiosianat dan 1 tetes ferro klorida.

d. Larutan digojog dengan vortex selama 5 detik

e. Absorbansi warna merah dibaca pada panjang gelombang 500 nm.

f. Kurva standar dibuat dengan absis absorbansi dan ordinat Fe (μg) dan dibuat persamaan regresi liniernya.

C. Persiapan sampel

a. Sampel ditimbang ($\leq 0,01$ - $0,30$ g) pada tabung reaksi

b. Dilarutkan dalam benzana : metanol 70 : 30 v/v sampai volume 10 ml

c. Ditambahkan 50 μL amonium tiosianat, lalu divortex 2-4 detik

d. Ditambahkan 50 μL ferro klorida, lalu divortex 2-4 detik

e. Diinkubasi dalam suhu ruangan selama 5 menit

- f. Dipanaskan 50° C selama 2 menit
 g. Dinginkan pada suhu ruang
 h. Dibaca pada absorbansi pada 500 nm
 i. Banyaknya Fe dalam 10 ml larutan dihitung dengan persamaan garis regresi dari kurva standar.
 j. Bilangan peroksida dihitung dalam miliekuivalen / kg minyak dengan persamaan:

$$\text{Bilangan peroksida} = \frac{A \times B}{C \times 55,85}$$

Keterangan :

A = berat Fe per 10 ml (µg)

B = volume larutan awal (ml)

C = berat sampel minyak (g)

1.2 Analisa Bilangan *p*-Anisidin (Paquot, 1979)

Metode ini digunakan untuk menentukan jumlah aldehid dalam minyak atau lemak. Prosedur:

- Sampel seberat 0,5 - 4,0 g (0,001 g), masukkan ke dalam labu takar 25 mL, dilarutkan dan diencerkan sampai tanda dengan *iso octane*.
- Ukur absorbansi (A_b) larutan lemak tersebut pada panjang gelombang 350 nm dengan spektrofotometer, digunakan sebagai larutan blanko.
- Pipet secara tepat 5 mL larutan lemak/minyak dalam tabung reaksi dan 5 mL pelarut pada tabung reaksi kedua. Pipet 1 mL reagen *p*-Anisidin ke masing-masing tabung, dan gojog.
- Setelah 10 menit ukur absorbansi (A_s) dari larutan pada tabung reaksi pertama pada 350 nm, gunakan larutan pada tabung reaksi kedua sebagai blanko.

Bilangan *p*-Anisidin dihitung menggunakan formula:

$$\text{Bilangan } p\text{-anisidin} = \frac{25 \times (1,2 A_s - A_b)}{m}$$

Dimana:

A_s = nilai absorbansi larutan lemak setelah bereaksi dengan reagen *p*-Anisidin

A_b = nilai absorbansi larutan lemak

m = berat sampel (g)

1.3 Pengujian Senyawa Bioaktif dengan HPLC

1.3.1 Tokoferol dan Tokotrienol (Nielsen dan Hansen, 2008)

- a. Sampel ditimbang sejumlah 5 mg
- a. 1 ml etanol ditambahkan lalu disaring
- b. Kolom dipasang sesuai dengan komponen yang akan dianalisa
- c. *Eluent (mobile phase)* yang akan digunakan disiapkan dalam botol (*eluent* telah disaring dengan kertas saring 0,45 μ m)
- d. Selang inlet dimasukkan dari unit HPLC kedalam botol *eluent*
- e. *Flowrate* diatur sesuai yang diinginkan dan hilangkan gelembung yang terikut dalam selang
- f. Waktu untuk *condisioning* diberikan sampai diperoleh garis dasar yang lurus
- g. Sampel disuntikkan (yang sudah disaring dengan filter 0,45 μ m)
- h. Didiamkan beberapa saat sampai semua komponen yang diinginkan keluar dalam kromatogram
- i. Hasil yang didapat dibandingkan dengan standart yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel

Kondisi HPLC

Karakterisasi Tokoferol dan Tokotrienol

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| Merk | : Shimadzu LC-20AD Prominence |
| Kolom | : C18 |
| Detektor | : UV SPD-20 A |
| Degasser | : DGU-20 A _{5R} |
| Fase mobile | : Metanol : aquabides (90:10) |
| Kecepatan aliran | : 1ml/menit |
| Volume injeksi | : 20 μ l |
| Berat sampel injeksi | : 2 μ g |

1.3.2 Fitosterol (Khatoun *et al.*, 2010)

- a. Sampel ditimbang sejumlah 5 mg
- b. 1 ml etanol ditambahkan lalu disaring
- c. Kolom dipasang sesuai dengan komponen yang akan dianalisa
- d. *Eluent (mobile phase)* yang akan digunakan disiapkan dalam botol (*eluent* telah disaring dengan kertas saring 0,45 μ m)
- e. Selang inlet dimasukkan dari unit HPLC kedalam botol *eluent*

- f. *Flowrate* diatur sesuai yang diinginkan dan hilangkan gelembung yang terikut dalam selang
- g. Waktu untuk *conditioning* diberikan sampai diperoleh garis dasar yang lurus
- h. Sampel disuntikkan (yang sudah disaring dengan filter 0,45µm)
- i. Didiamkan beberapa saat sampai semua komponen yang diinginkan keluar dalam kromatogram
- j. Hasil yang didapat dibandingkan dengan standart yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel

Kondisi HPLC

Karakterisasi Fitosterol

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| Merk | : Shimadzu LC-20AD Prominence |
| Kolom | : C18 |
| Detektor | : UV SPD-20 A |
| Degasser | : DGU-20 A5 |
| Fase mobile | : Metanol : aquabides (99,1:0,9) |
| Kecepatan aliran | : 1ml/menit |
| Volume injeksi | : 20 µl |
| Berat sampel injeksi | : 2 µg |

1.3.3 Kadar α-karoten dan β-karoten (Nells dan Leenheer, 1983)

- a. Sampel ditimbang sejumlah 0.005 g
- b. Ditambahkan 5 ml heksana
- c. Sampel diencerkan hingga konsentrasi 100 ppm
- d. *Eluent (mobile phase)* yang akan digunakan disiapkan dalam botol
- e. Selang inlet dimasukkan dari unit HPLC kedalam botol *eluent*
- f. *Flowrate* diatur sesuai yang diinginkan dan hilangkan gelembung yang terikut dalam selang
- g. Waktu untuk *conditioning* diberikan sampai diperoleh garis dasar yang lurus
- h. Sampel disuntikkan (yang sudah disaring dengan filter 0,45µm)
- i. Didiamkan beberapa saat sampai semua komponen yang diinginkan keluar dalam kromatogram
- j. Hasil yang didapat dibandingkan dengan standart yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel

Kondisi HPLC**Karakterisasi α -karoten dan β -karoten**

| | |
|----------------------|--|
| Merk | : Shimadzu LC-20AD Prominence |
| Kolom | : C18 |
| Detektor | : UV SPD-20 A |
| Degasser | : DGU-20 A5 |
| Fase mobile | : Asetonitrile : Methanol : Dichloromethane (70:20:10) |
| Kecepatan aliran | : 1ml/menit |
| Volume injeksi | : 20 μ l |
| Berat sampel injeksi | : 10 μ g |

1.3.4 Skualen (Mendez et al., 2003)

Sebelum dilakukan analisa, sampel terlebih dahulu dilakukan derivatisasi sebagai berikut:

- Sampel ditimbang sejumlah 0.005 g
- Etanol ditambahkan 5 ml
- Diambil 1 ml dan ditambahkan 1 ml asetonitril lalu disaring
- Eluent (mobile phase)* yang akan digunakan disiapkan dalam botol
- Selang inlet dimasukkan dari unit HPLC kedalam botol *eluent*
- Flowrate* diatur sesuai yang diinginkan dan hilangkan gelembung yang terikut dalam selang
- Waktu untuk *conditioning* diberikan sampai diperoleh garis dasar yang lurus
- Sampel disuntikkan (yang sudah disaring dengan filter 0,45 μ m)
- Didiamkan beberapa saat sampai semua komponen yang diinginkan keluar dalam kromatogram
- Hasil yang didapat dibandingkan dengan standart yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel

Kondisi HPLC**Karakterisasi Skualen**

| | |
|-------------|-------------------------------|
| Merk | : Shimadzu LC-20AD Prominence |
| Kolom | : C18 |
| Detektor | : UV SPD-20 A |
| Degasser | : DGU-20 A5 |
| Fase mobile | : Asetonitril (100%) |

Kecepatan aliran : 1ml/menit

Volume injeksi : 20 µl

Berat sampel injeksi : 2 µg

Lampiran 2. Rendemen FTT DALMS

Rendemen FTT DALMS digunakan untuk mengetahui persentase FTT yang dihasilkan dari berat DALMS yang disaponifikasi Perhitungan digunakan dengan metode Hasnaeni *et al.*, (2019).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat FTT DALMS}}{\text{Berat DALMS}} \times 100\%$$

2.1 Rendemen FTT DALMS Sebelum Optimasi

| Ulangan | DALMS (g) | FTT (g) | Kadar Rendemen (%) |
|---------|-------------------------|---------|--------------------|
| 1 | 10.03 | 0.25 | 2.47 |
| 2 | 10.03 | 0.23 | 2.28 |
| 3 | 10.03 | 0.24 | 2.35 |
| Jumlah | 30.08 | 0.71 | 7.11 |
| Rerata | 10.03 | 0.24 | 2.37 |
| | Standar Deviasi | | 0.10 |
| | Standar Error | | 0.06 |
| | Coefficient of Variance | | 0.04 |

2.2 Rendemen FTT DALMS Berdasarkan Rancangan Perlakuan Aplikasi Design Expert 11.0

| Std | Run | Faktor 1 A : Etanol | Faktor 2 B : Heksana | Faktor 3 C : Akuades | Respon : Rendemen (%) |
|-----|-----|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 15 | 1 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 1.9 |
| 14 | 2 | 6:1 | 8:1 | 15.3636:1 | 1.25 |
| 11 | 3 | 6:1 | 4.63641:1 | 12:1 | 1.57 |
| 16 | 4 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2.54 |
| 18 | 5 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2.31 |
| 20 | 6 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2.06 |
| 17 | 7 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 1.91 |
| 6 | 8 | 7:1 | 6:1 | 14:1 | 1.13 |
| 7 | 9 | 5:1 | 10:1 | 14:1 | 1.66 |
| 13 | 10 | 6:1 | 8:1 | 8.63641:1 | 0.79 |
| 10 | 11 | 7.68179:1 | 8:1 | 12:1 | 1.69 |
| 3 | 12 | 5:1 | 10:1 | 10:1 | 1.6 |
| 2 | 13 | 7:1 | 6:1 | 10:1 | 0.9 |
| 5 | 14 | 5:1 | 6:1 | 14:1 | 1.36 |
| 19 | 15 | 6:1 | 8:1 | 12:1 | 2.46 |
| 4 | 16 | 7:1 | 10:1 | 10:1 | 1.48 |
| 8 | 17 | 7:1 | 10:1 | 14:1 | 2.59 |
| 12 | 18 | 6:1 | 11.3636:1 | 12:1 | 1.75 |
| 1 | 19 | 5:1 | 6:1 | 10:1 | 0.75 |

9 20 4.31821:1 8:1 12:1 1.85

2.3 Rendemen FTT DALMS Verifikasi *Design Expert* (DX 11.0)

Verifikasi dilakukan dengan melakukan saponifikasi dengan perbandingan etanol : sampel (6,5 : 1), heksana : sampel (9,7 : 1), dan akuades : sampel (12,6 : 1). Berdasarkan aplikasi *DX 11.0*, kombinasi perlakuan tersebut diprediksi akan menghasilkan rendemen FTT 2,35%

| Hasil (%) | Prediksi (%) |
|-----------|--------------|
| 2.34 | 2.35 |
| 2.11 | 2.35 |
| 2.25 | 2.35 |

Paired T-Test and CI: Hasil, Prediksi

Paired T for Hasil - Prediksi

| | N | Mean | StDev | SE Mean |
|------------|---|---------|--------|---------|
| Hasil | 3 | 2.2333 | 0.1159 | 0.0669 |
| Prediksi | 3 | 2.3500 | 0.0000 | 0.0000 |
| Difference | 3 | -0.1167 | 0.1159 | 0.0669 |

95% CI for mean difference: (-0.4046, 0.1713)

T-Test of mean difference = 0 (vs ≠ 0): T-Value = -1.74 P-Value = 0.223

2.4 Rendemen FTT DALMS Menggunakan Pelarut Baru, Kombinasi Pelarut Baru : Daur Ulang, dan Pelarut Daur Ulang

| Ulangan | Etanol Baru : Heksana Baru (%) | Etanol Baru : Heksana Daur Ulang (%) | Etanol Daur Ulang : Heksana Baru (%) | Etanol Daur Ulang : Heksana Daur Ulang (%) |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 2.40 | 2.00 | 1.98 | 2.18 |
| 2 | 1.98 | 1.87 | 2.00 | 1.93 |
| 3 | 2.39 | 2.08 | 2.14 | 2.19 |
| 4 | 2.10 | 1.90 | 2.08 | 2.33 |
| 5 | 2.28 | 2.11 | 2.17 | 2.07 |
| Jumlah | 11.14 | 9.97 | 10.37 | 10.70 |
| Rerata | 2.23 | 1.99 | 2.07 | 2.14 |
| Standar Deviasi | 0.18 | 0.11 | 0.08 | 0.15 |
| Standar Error | 0.08 | 0.05 | 0.04 | 0.07 |
| Coefficient of Variance | 0.08 | 0.05 | 0.04 | 0.07 |

One-way ANOVA: Rendemen versus Perlakuan

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis At least one mean is different

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

| Factor | Levels | Values |
|-----------|--------|------------|
| perlakuan | 4 | 1, 2, 3, 4 |

Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|-----------|----|--------|---------|---------|---------|
| perlakuan | 3 | 0.1483 | 0.04942 | 2.66 | 0.083 |
| Error | 16 | 0.2968 | 0.01855 | | |
| Total | 19 | 0.4450 | | | |

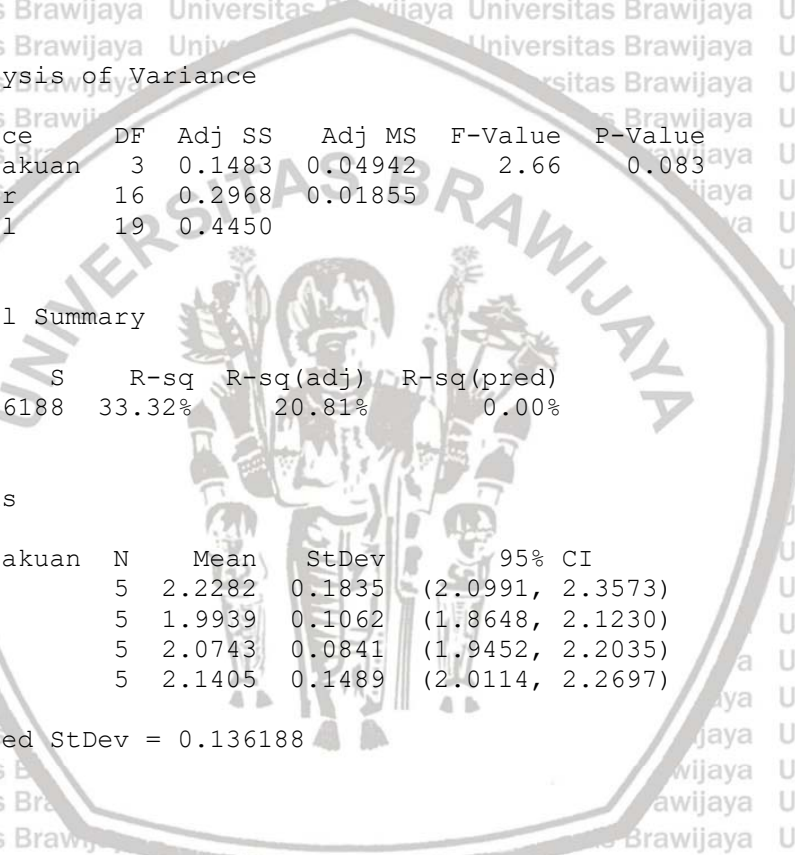
Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|----------|--------|-----------|------------|
| 0.136188 | 33.32% | 20.81% | 0.00% |

Means

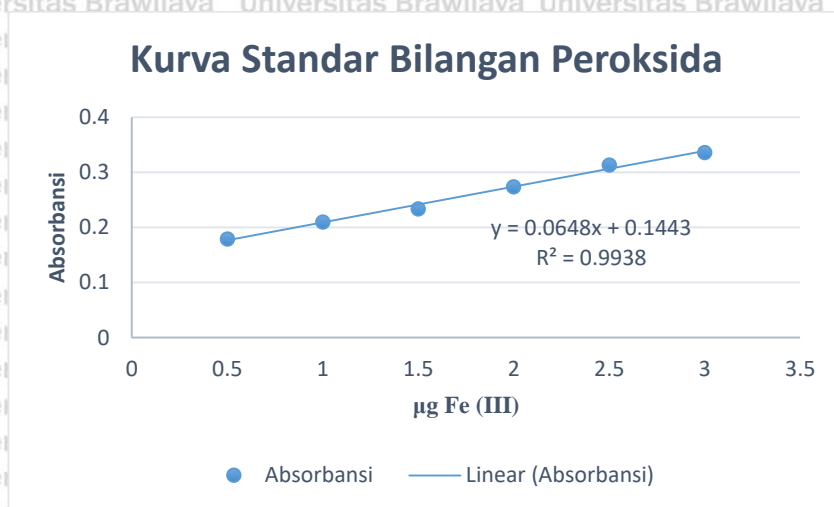
| perlakuan | N | Mean | StDev | 95% CI |
|-----------|---|--------|--------|------------------|
| 1 | 5 | 2.2282 | 0.1835 | (2.0991, 2.3573) |
| 2 | 5 | 1.9939 | 0.1062 | (1.8648, 2.1230) |
| 3 | 5 | 2.0743 | 0.0841 | (1.9452, 2.2035) |
| 4 | 5 | 2.1405 | 0.1489 | (2.0114, 2.2697) |

Pooled StDev = 0.136188



Lampiran 3. Bilangan Peroksida FTT DALMS

3.1 Kurva Standar Bilangan Peroksida



| No | Berat Fe (µg) | Absorbansi |
|----|---------------|------------|
| 1 | 0.5 | 0.179 |
| 2 | 1 | 0.21 |
| 3 | 1.5 | 0.234 |
| 4 | 2 | 0.274 |
| 5 | 2.5 | 0.313 |
| 6 | 3 | 0.336 |

3.2 Bilangan Peroksida FTT DALMS Sebelum Optimasi

| Ulangan | Berat (g) (C) | Absorbansi (nm) | Konsentrasi Fe (µg)(A) | Volume (ml) (B) | Bilangan Peroksida (mek/kg) |
|-------------------------|---------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------------------|
| 1 | 0,05 | 0,316 | 2,65 | 5 | 9,49 |
| 2 | 0,05 | 0,320 | 2,71 | 5 | 9,71 |
| Rerata | | | | | 9.60 |
| Standar Deviasi | | | | | 0.16 |
| Standar Error | | | | | 0.11 |
| Coefficient of Variance | | | | | 0.02 |

3.3 Bilangan Peroksida FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi

| Ulangan | Berat (g) (C) | Absorbansi (nm) | Konsentrasi Fe (µg)(A) | Volume (ml) (B) | Bilangan Peroksida (mek/kg) |
|-------------------------|---------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------------------|
| 1 | 0,05 | 0.326 | 2.80 | 5 | 10.04 |
| 2 | 0,05 | 0.335 | 2.94 | 5 | 10.54 |
| Rerata | | | | | 9.60 |
| Standar Deviasi | | | | | 0.16 |
| Standar Error | | | | | 0.11 |
| Coefficient of Variance | | | | | 0.02 |

3.4 Bilangan Peroksida FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang

| Ulangan | Berat (g) (C) | Absorbansi (nm) | Konsentrasi Fe (μg)(A) | Volume (ml) (B) | Bilangan Peroksida (mek/kg) |
|-------------------------|---------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| 1 | 0,05 | 0.347 | 3.13 | 5 | 11.20 |
| 2 | 0,05 | 0.344 | 3.08 | 5 | 11.04 |
| Rerata | | | | | 9.60 |
| Standar Deviasi | | | | | 0.16 |
| Standar Error | | | | | 0.11 |
| Coefficient of Variance | | | | | 0.02 |

Lampiran 4. Bilangan Anisidin FTT DALMS

4.1 Bilangan Anisidin FTT DALMS Sebelum Optimasi

| Ulangan | Berat (g) | Absorbansi FTT + Reagen <i>p</i> -Anisidin (nm) (A_s) | Absorbansi FTT (nm) (A_b) | Bilangan <i>p</i> -Anisidin |
|-------------------------|-----------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 0,05 | 0.530 | 0.353 | 14.15 |
| 2 | 0,05 | 0.541 | 0.362 | 14.36 |
| Rerata | | | | 14.26 |
| Standar Deviasi | | | | 0.15 |
| Standar Error | | | | 0.11 |
| Coefficient of Variance | | | | 0.01 |

4.2 Bilangan Anisidin FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi

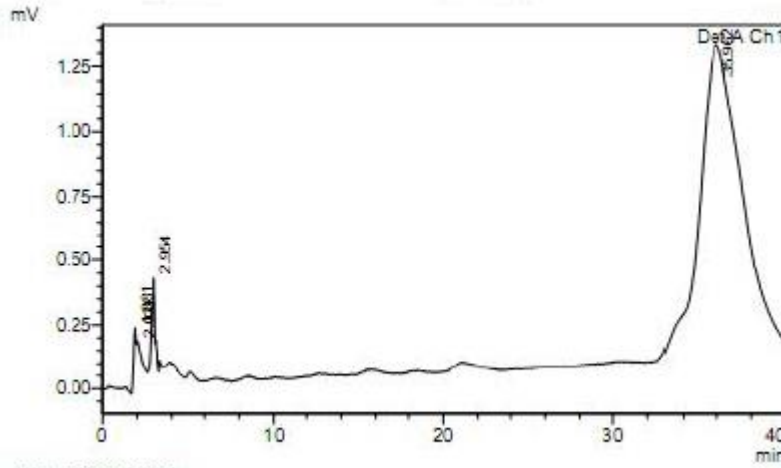
| Ulangan | Berat (g) | Absorbansi FTT + Reagen <i>p</i> -Anisidin (nm) (A_s) | Absorbansi FTT (nm) (A_b) | Bilangan <i>p</i> -Anisidin |
|-------------------------|-----------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 0,05 | 0.445 | 0.290 | 12.20 |
| 2 | 0,05 | 0.443 | 0.288 | 12.18 |
| Rerata | | | | 14.26 |
| Standar Deviasi | | | | 0.15 |
| Standar Error | | | | 0.11 |
| Coefficient of Variance | | | | 0.01 |

4.3 Bilangan Anisidin FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang

| Ulangan | Berat (g) | Absorbansi FTT + Reagen <i>p</i> -Anisidin (nm) (A_s) | Absorbansi FTT (nm) (A_b) | Bilangan <i>p</i> -Anisidin |
|-------------------------|-----------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 0,05 | 0.491 | 0.319 | 13.51 |
| 2 | 0,05 | 0.538 | 0.370 | 13.78 |
| Rerata | | | | 14.26 |
| Standar Deviasi | | | | 0.15 |
| Standar Error | | | | 0.11 |
| Coefficient of Variance | | | | 0.01 |

Lampiran 5. Analisa Kadar Vitamin E dengan HPLC

5.1 Standar α -Tokoferol



1 Det.A Ch1/295nm

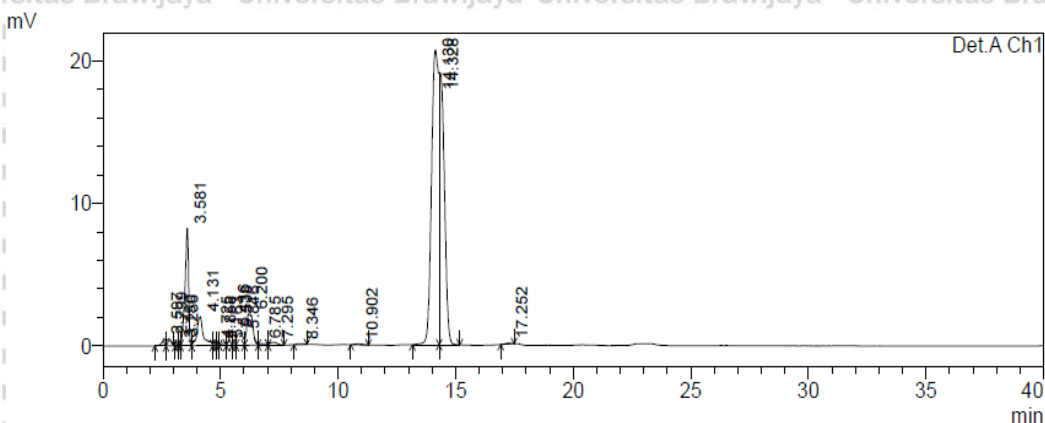
PeakTable

Detector A Ch1 295nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 1.881 | 2652 | 248 | 1.639 | 13.335 |
| 2 | 2.031 | 3898 | 189 | 2.409 | 10.140 |
| 3 | 2.954 | 4644 | 384 | 2.870 | 20.642 |
| 4 | 35.962 | 150635 | 1039 | 93.082 | 55.883 |
| Total | | 161830 | 1860 | 100.000 | 100.000 |



5.2 Standar δ -Tokotrienol



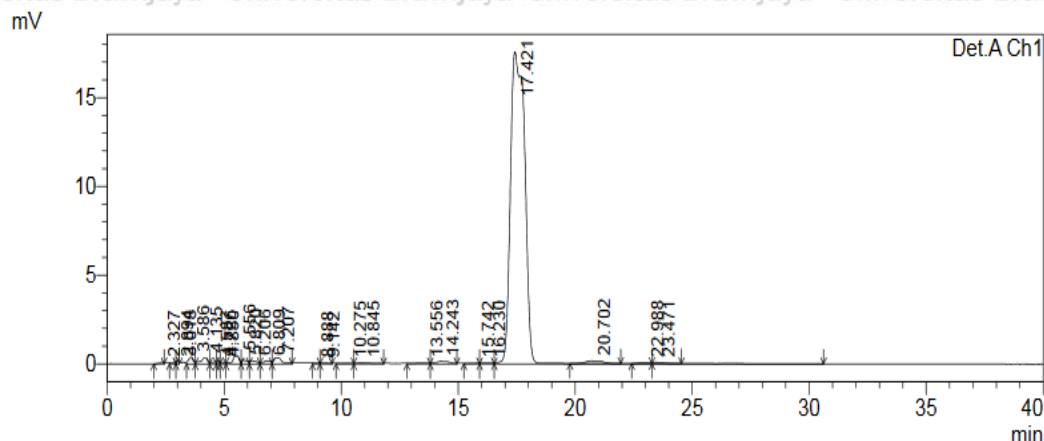
1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.597 | 5129 | 498 | 0.542 | 0.864 |
| 2 | 2.799 | 6471 | 492 | 0.684 | 0.854 |
| 3 | 3.150 | 1596 | 252 | 0.169 | 0.438 |
| 4 | 3.256 | 1928 | 323 | 0.204 | 0.560 |
| 5 | 3.581 | 88393 | 8231 | 9.341 | 14.271 |
| 6 | 4.131 | 38353 | 2030 | 4.053 | 3.521 |
| 7 | 4.725 | 1709 | 218 | 0.181 | 0.378 |
| 8 | 4.858 | 1240 | 178 | 0.131 | 0.308 |
| 9 | 5.163 | 2548 | 173 | 0.269 | 0.300 |
| 10 | 5.436 | 8492 | 975 | 0.897 | 1.690 |
| 11 | 5.538 | 7634 | 957 | 0.807 | 1.660 |
| 12 | 5.846 | 14779 | 868 | 1.562 | 1.506 |
| 13 | 6.200 | 40211 | 2209 | 4.250 | 3.831 |
| 14 | 6.785 | 2274 | 116 | 0.240 | 0.201 |
| 15 | 7.295 | 4168 | 189 | 0.441 | 0.328 |
| 16 | 8.346 | 1283 | 67 | 0.136 | 0.116 |
| 17 | 10.902 | 1599 | 65 | 0.169 | 0.113 |
| 18 | 14.130 | 426268 | 20688 | 45.048 | 35.869 |
| 19 | 14.328 | 291053 | 19083 | 30.759 | 33.087 |
| 20 | 17.252 | 1115 | 61 | 0.118 | 0.106 |
| Total | | 946245 | 57674 | 100.000 | 100.000 |

5.3 Standar γ -Tokotrienol

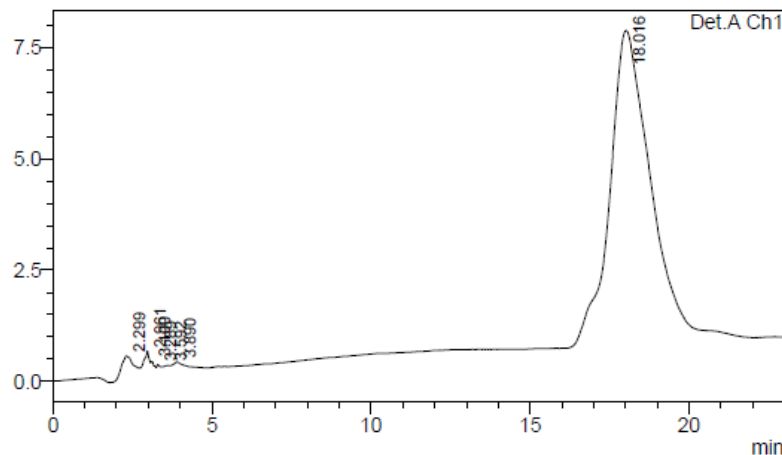


1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.327 | 1245 | 113 | 0.150 | 0.532 |
| 2 | 2.894 | 1363 | 128 | 0.165 | 0.602 |
| 3 | 3.018 | 1104 | 135 | 0.133 | 0.635 |
| 4 | 3.586 | 5073 | 386 | 0.613 | 1.819 |
| 5 | 4.135 | 6785 | 326 | 0.819 | 1.539 |
| 6 | 4.587 | 1611 | 114 | 0.195 | 0.536 |
| 7 | 4.726 | 1142 | 131 | 0.138 | 0.617 |
| 8 | 4.850 | 1265 | 109 | 0.153 | 0.512 |
| 9 | 5.556 | 9040 | 465 | 1.092 | 2.193 |
| 10 | 5.820 | 3706 | 207 | 0.448 | 0.976 |
| 11 | 6.206 | 3475 | 173 | 0.420 | 0.815 |
| 12 | 6.809 | 4039 | 184 | 0.488 | 0.867 |
| 13 | 7.207 | 8490 | 333 | 1.025 | 1.571 |
| 14 | 8.888 | 1109 | 60 | 0.134 | 0.285 |
| 15 | 9.142 | 1397 | 58 | 0.169 | 0.275 |
| 16 | 10.275 | 1713 | 44 | 0.207 | 0.205 |
| 17 | 10.845 | 3446 | 63 | 0.416 | 0.296 |
| 18 | 13.556 | 3062 | 73 | 0.370 | 0.342 |
| 19 | 14.243 | 5912 | 136 | 0.714 | 0.640 |
| 20 | 15.742 | 1466 | 47 | 0.177 | 0.223 |
| 21 | 16.230 | 2353 | 69 | 0.284 | 0.326 |
| 22 | 17.421 | 747146 | 17571 | 90.237 | 82.835 |
| 23 | 20.702 | 7616 | 154 | 0.920 | 0.725 |
| 24 | 22.988 | 2143 | 65 | 0.259 | 0.307 |
| 25 | 23.471 | 2279 | 69 | 0.275 | 0.326 |
| Total | | 827980 | 21212 | 100.000 | 100.000 |

5.4 Standar α -Tokoferol

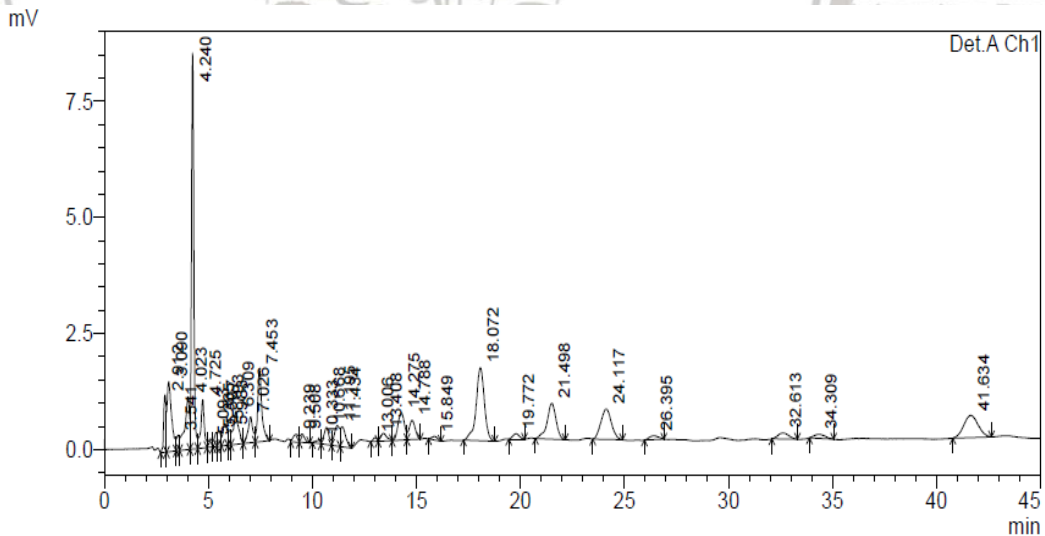


PeakTable

Detector A Ch1 295nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.299 | 14443 | 533 | 2.288 | 5.992 |
| 2 | 2.961 | 7411 | 557 | 1.174 | 6.269 |
| 3 | 3.100 | 2420 | 303 | 0.383 | 3.413 |
| 4 | 3.289 | 1608 | 204 | 0.255 | 2.294 |
| 5 | 3.592 | 2684 | 142 | 0.425 | 1.595 |
| 6 | 3.890 | 3796 | 180 | 0.601 | 2.025 |
| 7 | 18.016 | 598792 | 6971 | 94.873 | 78.412 |
| Total | | 631153 | 8890 | 100.000 | 100.000 |

5.5 Kadar Vitamin E FTT DALMS Sebelum Optimasi



1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

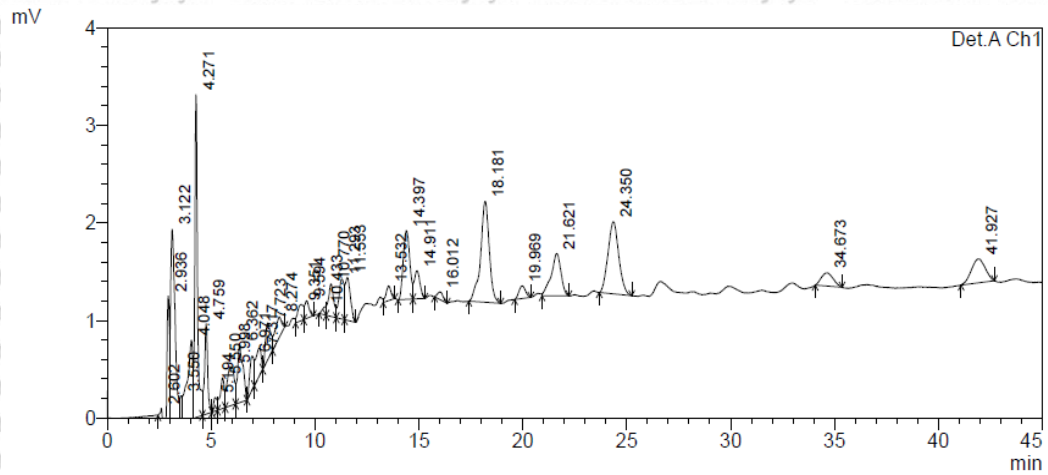
Detector A Ch1 295nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.912 | 10360 | 1237 | 2.765 | 4.930 |
| 2 | 3.090 | 22724 | 1509 | 6.066 | 6.012 |
| 3 | 3.541 | 3179 | 334 | 0.848 | 1.332 |
| 4 | 4.023 | 17720 | 1140 | 4.730 | 4.541 |
| 5 | 4.240 | 66037 | 8532 | 17.627 | 33.997 |
| 6 | 4.725 | 12202 | 1039 | 3.257 | 4.140 |
| 7 | 5.093 | 2620 | 175 | 0.699 | 0.696 |
| 8 | 5.365 | 2676 | 302 | 0.714 | 1.202 |
| 9 | 5.507 | 3736 | 338 | 0.997 | 1.346 |
| 10 | 5.793 | 6618 | 471 | 1.767 | 1.876 |
| 11 | 5.983 | 2711 | 322 | 0.724 | 1.282 |
| 12 | 6.309 | 11904 | 699 | 3.178 | 2.784 |
| 13 | 7.026 | 9034 | 556 | 2.412 | 2.215 |
| 14 | 7.453 | 21378 | 1564 | 5.707 | 6.230 |
| 15 | 9.239 | 3039 | 164 | 0.811 | 0.654 |
| 16 | 9.508 | 2787 | 178 | 0.744 | 0.708 |
| 17 | 10.333 | 1288 | 80 | 0.344 | 0.321 |
| 18 | 10.668 | 6385 | 366 | 1.704 | 1.460 |
| 19 | 11.195 | 7797 | 445 | 2.081 | 1.773 |
| 20 | 11.434 | 7392 | 431 | 1.973 | 1.718 |
| 21 | 13.006 | 1125 | 82 | 0.300 | 0.327 |
| 22 | 13.408 | 3371 | 168 | 0.900 | 0.670 |
| 23 | 14.275 | 12649 | 583 | 3.376 | 2.325 |
| 24 | 14.788 | 8356 | 412 | 2.231 | 1.643 |
| 25 | 15.849 | 1443 | 76 | 0.385 | 0.301 |
| 26 | 18.072 | 43557 | 1573 | 11.627 | 6.266 |
| 27 | 19.772 | 2457 | 113 | 0.656 | 0.451 |
| 28 | 21.498 | 23375 | 773 | 6.240 | 3.078 |
| 29 | 24.117 | 23138 | 657 | 6.176 | 2.618 |
| 30 | 26.395 | 2521 | 81 | 0.673 | 0.321 |
| 31 | 32.613 | 4802 | 133 | 1.282 | 0.529 |
| 32 | 34.309 | 3209 | 87 | 0.857 | 0.345 |
| 33 | 41.634 | 23035 | 479 | 6.149 | 1.910 |
| Total | | 374625 | 25097 | 100.000 | 100.000 |

Keterangan :

Warna merah = δ -tokotrienol; biru = γ -tokotrienol, hijau = α -tokotrienol, ungu = α -tokoferol

5.6 Kadar Vitamin E FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi



1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

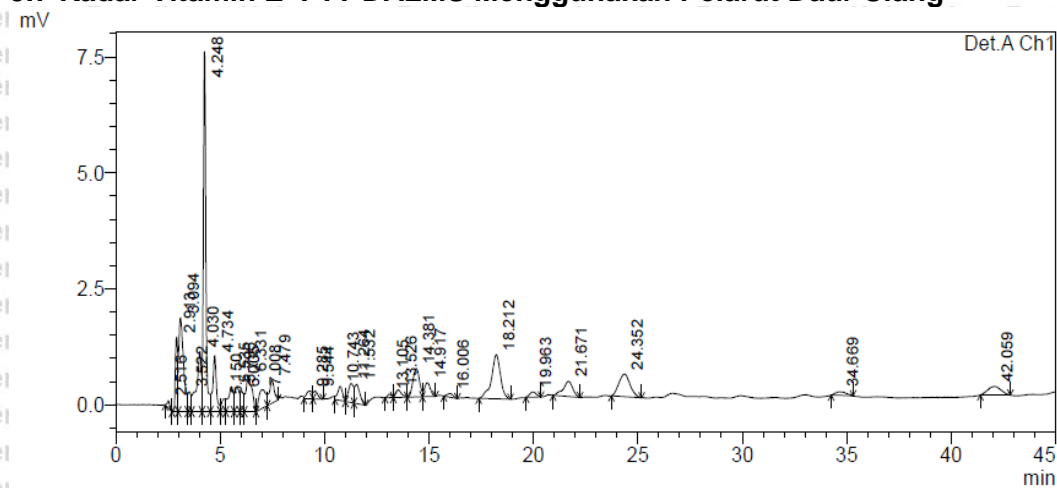
Detector A Ch1 295nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.602 | 1119 | 152 | 0.385 | 0.889 |
| 2 | 2.936 | 11148 | 1347 | 3.837 | 7.899 |
| 3 | 3.122 | 30386 | 2017 | 10.458 | 11.823 |
| 4 | 3.550 | 2286 | 276 | 0.787 | 1.620 |
| 5 | 4.048 | 15635 | 814 | 5.381 | 4.773 |
| 6 | 4.271 | 29624 | 3313 | 10.196 | 19.423 |
| 7 | 4.759 | 9870 | 927 | 3.397 | 5.436 |
| 8 | 5.194 | 1581 | 140 | 0.544 | 0.821 |
| 9 | 5.550 | 4464 | 314 | 1.536 | 1.838 |
| 10 | 5.998 | 9271 | 394 | 3.191 | 2.313 |
| 11 | 6.362 | 10727 | 595 | 3.692 | 3.486 |
| 12 | 6.971 | 4970 | 352 | 1.710 | 2.062 |
| 13 | 7.317 | 5580 | 289 | 1.921 | 1.694 |
| 14 | 7.723 | 6554 | 377 | 2.256 | 2.211 |
| 15 | 8.274 | 4826 | 213 | 1.661 | 1.247 |
| 16 | 9.351 | 3068 | 165 | 1.056 | 0.967 |
| 17 | 9.594 | 2750 | 180 | 0.947 | 1.056 |
| 18 | 10.433 | 1012 | 76 | 0.348 | 0.443 |
| 19 | 10.770 | 5767 | 333 | 1.985 | 1.953 |
| 20 | 11.293 | 7074 | 411 | 2.435 | 2.409 |
| 21 | 11.553 | 7643 | 439 | 2.630 | 2.575 |
| 22 | 13.532 | 2478 | 150 | 0.853 | 0.882 |
| 23 | 14.397 | 15319 | 704 | 5.273 | 4.127 |
| 24 | 14.911 | 5459 | 285 | 1.879 | 1.669 |
| 25 | 16.012 | 1436 | 78 | 0.494 | 0.457 |
| 26 | 18.181 | 30239 | 1035 | 10.407 | 6.065 |
| 27 | 19.969 | 2845 | 130 | 0.979 | 0.760 |
| 28 | 21.621 | 14210 | 434 | 4.891 | 2.544 |
| 29 | 24.350 | 26572 | 739 | 9.146 | 4.331 |
| 30 | 34.673 | 5361 | 135 | 1.845 | 0.792 |
| 31 | 41.927 | 11272 | 245 | 3.879 | 1.435 |
| Total | | 290547 | 17056 | 100.000 | 100.000 |

Keterangan:

Warna merah = δ -tokotrienol; biru = γ -tokotrienol; hijau = α -tokotrienol; ungu = α -tokoferol

5.7 Kadar Vitamin E FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang



1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|--------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.516 | 1398 | 164 | 0.425 | 0.719 |
| 2 | 2.913 | 13358 | 1613 | 4.059 | 7.075 |
| 3 | 3.094 | 31679 | 2025 | 9.626 | 8.880 |
| 4 | 3.522 | 4329 | 429 | 1.315 | 1.881 |
| 5 | 4.030 | 20406 | 1301 | 6.200 | 5.707 |
| 6 | 4.248 | 63300 | 7766 | 19.234 | 34.058 |
| 7 | 4.734 | 15186 | 1204 | 4.614 | 5.282 |
| 8 | 5.150 | 3545 | 271 | 1.077 | 1.187 |
| 9 | 5.535 | 9272 | 536 | 2.818 | 2.351 |
| 10 | 5.796 | 7924 | 528 | 2.408 | 2.317 |
| 11 | 6.005 | 4969 | 439 | 1.510 | 1.926 |
| 12 | 6.331 | 15404 | 785 | 4.681 | 3.443 |
| 13 | 7.008 | 9429 | 406 | 2.865 | 1.781 |
| 14 | 7.479 | 8577 | 499 | 2.606 | 2.190 |
| 15 | 9.285 | 3231 | 168 | 0.982 | 0.737 |
| 16 | 9.544 | 2422 | 168 | 0.736 | 0.735 |
| 17 | 10.743 | 5036 | 303 | 1.530 | 1.331 |
| 18 | 11.264 | 7107 | 411 | 2.160 | 1.803 |
| 19 | 11.532 | 7288 | 415 | 2.215 | 1.818 |
| 20 | 13.105 | 1013 | 74 | 0.308 | 0.324 |
| 21 | 13.526 | 3096 | 162 | 0.941 | 0.711 |
| 22 | 14.381 | 13298 | 613 | 4.041 | 2.687 |
| 23 | 14.917 | 5779 | 300 | 1.756 | 1.316 |
| 24 | 16.006 | 1512 | 79 | 0.459 | 0.346 |
| 25 | 18.212 | 28711 | 953 | 8.724 | 4.180 |
| 26 | 19.963 | 2361 | 111 | 0.717 | 0.486 |
| 27 | 21.671 | 10511 | 328 | 3.194 | 1.439 |
| 28 | 24.352 | 18000 | 484 | 5.469 | 2.122 |
| 29 | 34.669 | 2750 | 79 | 0.836 | 0.345 |
| 30 | 42.059 | 8207 | 187 | 2.494 | 0.820 |
| Total | | 329098 | 22803 | 100.000 | 100.000 |

Keterangan :

Warna merah = δ -tokotrienol; biru = γ -tokotrienol, hijau = α -tokotrienol, ungu = α -tokoferol

5.8 Kadar δ -Tokotrienol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 μ l, maka berat sampel injeksi = 20 μ g
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 μ l, maka berat standart injeksi = 2 μ g
- Retention Time Standart : 14,130 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat δ -Tokotrienol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat δ -Tokotrienol dalam FTT (%) | ppm δ -Tokotrienol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|---|---------------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 426.268 | 12.649 | 676,56 | 0,30 | 2.967,38 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 426.268 | 15.319 | 808,59 | 0,36 | 3953,75 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 426.268 | 13.298 | 667,60 | 0,31 | 3119,63 |

5.9 Kadar γ -Tokotrienol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 100 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 μ l, maka berat sampel injeksi = 20 μ g
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 μ l, maka berat standart injeksi = 2 μ g
- Retention Time Standart : 17,421 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat γ -Tokotrienol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat γ -Tokotrienol dalam FTT (%) | ppm γ -Tokotrienol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|---|---------------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 747.146 | 1.443 | 44,03 | 0,02 | 193.13 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 747.156 | 1.436 | 43,24 | 0,02 | 192.19 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 747.146 | 1.512 | 43.31 | 0,02 | 202,37 |

5.10 Kadar α -Tokotrienol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 μ l, maka berat sampel injeksi = 20 μ g
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 μ l, maka berat standart injeksi = 2 μ g
- Retention Time Standart : 18.016 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat α -Tokotrienol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat α -Tokotrienol dalam FTT (%) | ppm α -Tokotrienol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|---|---------------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 598.792 | 43.557 | 1.658,51 | 0,73 | 7.274,14 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 598.792 | 30.239 | 1.136,25 | 0,51 | 5.050,00 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 598.792 | 28.711 | 1.026,09 | 0,48 | 4.794,82 |

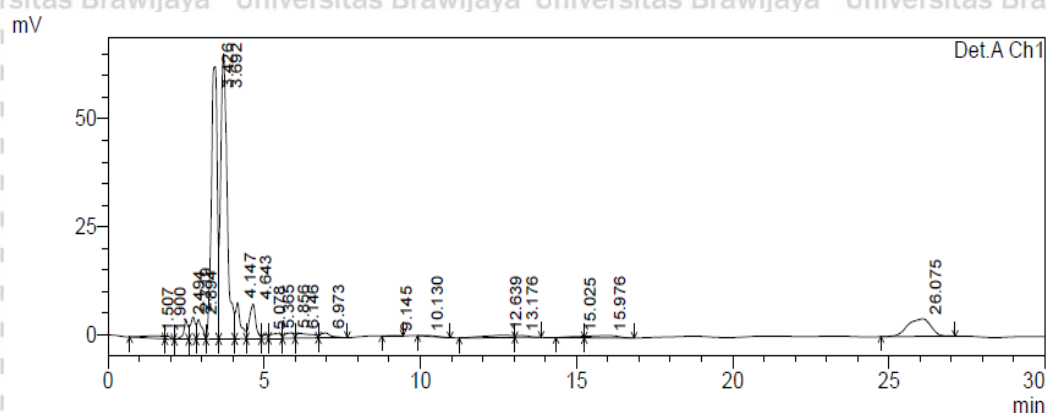
5.11 Kadar α -Tokoferol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 μ l, maka berat sampel injeksi = 20 μ g
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 μ l, maka berat standart injeksi = 2 μ g
- Retention Time Standart : 35.962 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat α -Tokoferol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat α -Tokoferol dalam FTT (%) | ppm α -Tokoferol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|---|-------------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 150.635 | 3.209 | 485,71 | 0,21 | 2.130,31 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 150.635 | 5.361 | 800,76 | 0,36 | 3.558,93 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 150.635 | 2.750 | 390,68 | 0,18 | 1.825,60 |

Lampiran 6. Analisa Kadar Fitosterol dengan HPLC

6.1 Standar β -Sitosterol



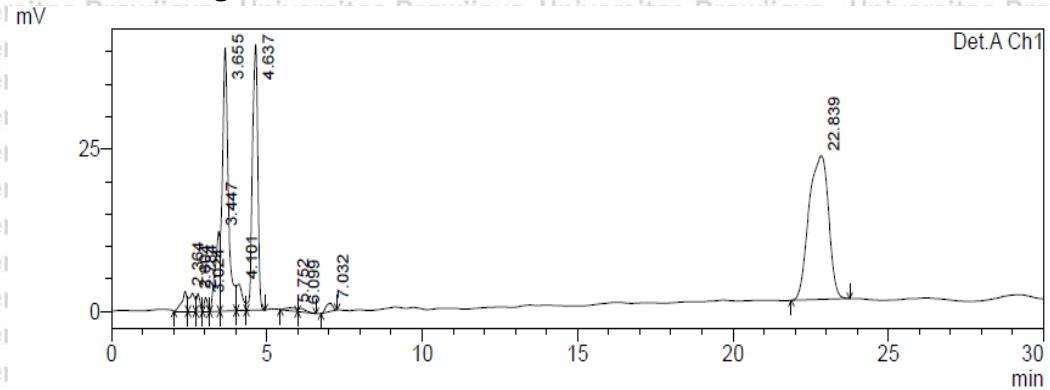
1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 1.507 | 26147 | 566 | 0.999 | 0.328 |
| 2 | 1.900 | 7812 | 681 | 0.298 | 0.395 |
| 3 | 2.494 | 42221 | 4586 | 1.613 | 2.658 |
| 4 | 2.719 | 58328 | 5143 | 2.229 | 2.981 |
| 5 | 2.894 | 52526 | 4602 | 2.007 | 2.667 |
| 6 | 3.426 | 840573 | 63137 | 32.118 | 36.593 |
| 7 | 3.692 | 945041 | 65973 | 36.109 | 38.236 |
| 8 | 4.147 | 96997 | 8453 | 3.706 | 4.899 |
| 9 | 4.643 | 111744 | 7989 | 4.270 | 4.630 |
| 10 | 5.078 | 11385 | 925 | 0.435 | 0.536 |
| 11 | 5.365 | 27707 | 1102 | 1.059 | 0.638 |
| 12 | 5.856 | 25626 | 1196 | 0.979 | 0.693 |
| 13 | 6.146 | 39671 | 1083 | 1.516 | 0.627 |
| 14 | 6.973 | 25853 | 1104 | 0.988 | 0.640 |
| 15 | 9.145 | 1545 | 70 | 0.059 | 0.041 |
| 16 | 10.130 | 5895 | 135 | 0.225 | 0.078 |
| 17 | 12.639 | 34749 | 539 | 1.328 | 0.312 |
| 18 | 13.176 | 12009 | 418 | 0.459 | 0.242 |
| 19 | 15.025 | 9810 | 273 | 0.375 | 0.158 |
| 20 | 15.976 | 32638 | 542 | 1.247 | 0.314 |
| 21 | 26.075 | 208895 | 4024 | 7.982 | 2.332 |
| Total | | 2617171 | 172540 | 100.000 | 100.000 |

6.2 Standar Stigmasterol



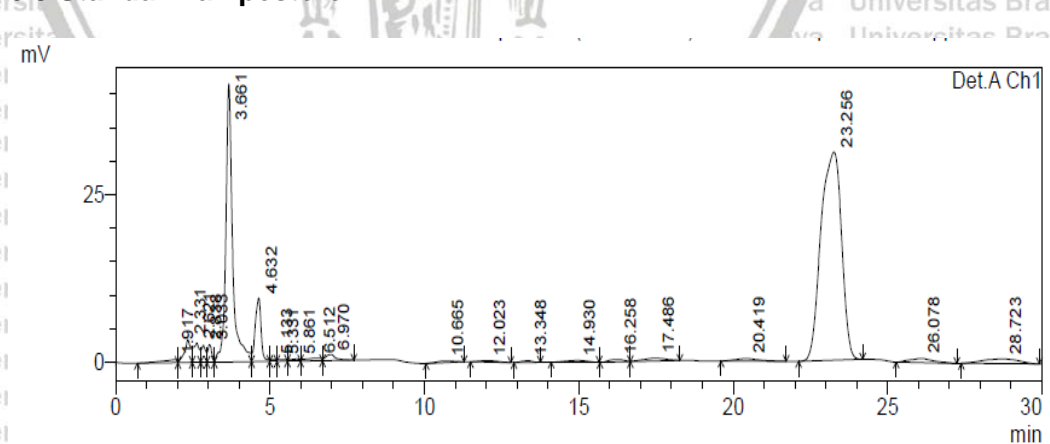
1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.364 | 37005 | 3083 | 1.598 | 2.316 |
| 2 | 2.604 | 33120 | 2802 | 1.431 | 2.104 |
| 3 | 2.784 | 23131 | 2729 | 0.999 | 2.050 |
| 4 | 3.024 | 15419 | 2130 | 0.666 | 1.600 |
| 5 | 3.447 | 127938 | 12338 | 5.526 | 9.266 |
| 6 | 3.655 | 529580 | 40582 | 22.875 | 30.478 |
| 7 | 4.101 | 53695 | 4104 | 2.319 | 3.082 |
| 8 | 4.637 | 481057 | 40964 | 20.779 | 30.765 |
| 9 | 5.752 | 12061 | 491 | 0.521 | 0.369 |
| 10 | 6.099 | 9094 | 527 | 0.393 | 0.396 |
| 11 | 7.032 | 19670 | 1283 | 0.850 | 0.963 |
| 12 | 22.839 | 973313 | 22119 | 42.042 | 16.612 |
| Total | | 2315084 | 133152 | 100.000 | 100.000 |

6.3 Standar Kampesterol



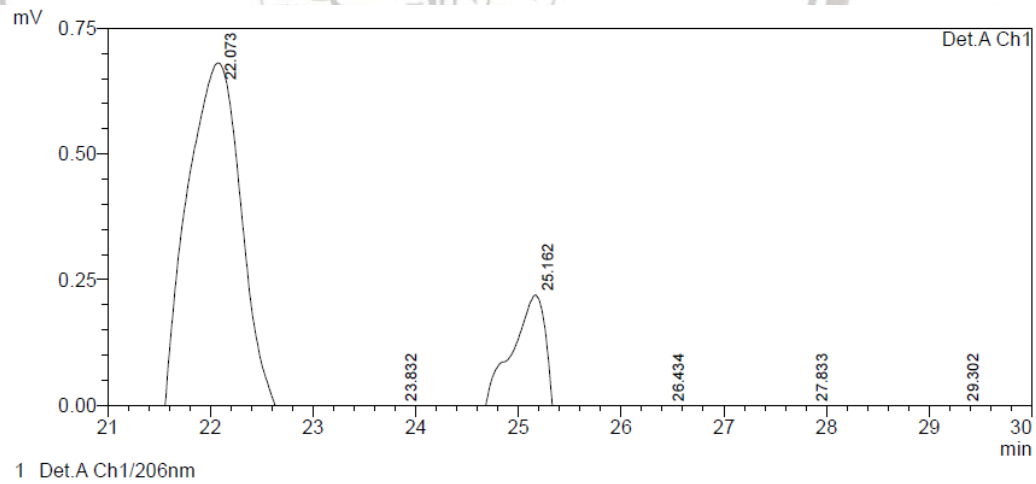
1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 1.917 | 15988 | 435 | 0.621 | 0.437 |
| 2 | 2.331 | 48684 | 3417 | 1.890 | 3.433 |
| 3 | 2.621 | 37861 | 2883 | 1.470 | 2.896 |
| 4 | 2.838 | 25093 | 2523 | 0.974 | 2.534 |
| 5 | 3.033 | 23667 | 2624 | 0.919 | 2.636 |
| 6 | 3.661 | 629581 | 41486 | 24.447 | 41.669 |
| 7 | 4.632 | 122564 | 9473 | 4.759 | 9.515 |
| 8 | 5.133 | 3622 | 266 | 0.141 | 0.267 |
| 9 | 5.331 | 5088 | 280 | 0.198 | 0.281 |
| 10 | 5.861 | 6576 | 315 | 0.255 | 0.316 |
| 11 | 6.512 | 14248 | 398 | 0.553 | 0.400 |
| 12 | 6.970 | 21471 | 916 | 0.834 | 0.920 |
| 13 | 10.665 | 9672 | 256 | 0.376 | 0.257 |
| 14 | 12.023 | 9331 | 212 | 0.362 | 0.213 |
| 15 | 13.348 | 6578 | 260 | 0.255 | 0.261 |
| 16 | 14.930 | 12787 | 253 | 0.497 | 0.254 |
| 17 | 16.258 | 11812 | 361 | 0.459 | 0.363 |
| 18 | 17.486 | 21547 | 413 | 0.837 | 0.415 |
| 19 | 20.419 | 19706 | 378 | 0.765 | 0.379 |
| 20 | 23.256 | 1438651 | 31050 | 55.864 | 31.187 |
| 21 | 26.078 | 33315 | 637 | 1.294 | 0.640 |
| 22 | 28.723 | 57419 | 724 | 2.230 | 0.727 |
| Total | | 2575260 | 99559 | 100.000 | 100.000 |

6.4 Kadar Fitosterol FTT DALMS Sebelum Optimasi



PeakTable

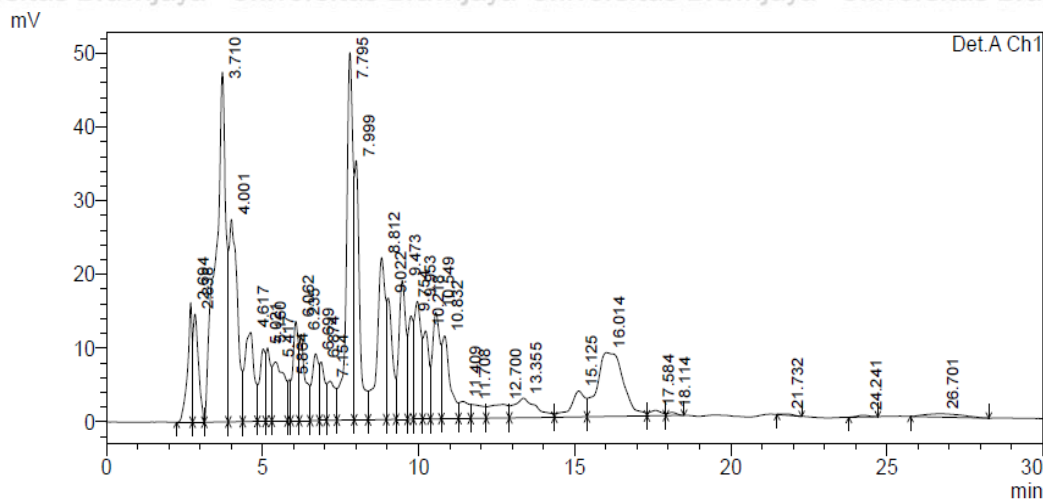
Detector A Ch1 206nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|----------|---------|---------|----------|
| 1 | 2.927 | 3157989 | 170975 | 10.783 | 12.333 |
| 2 | 3.058 | 1165078 | 168197 | 3.978 | 12.133 |
| 3 | 3.606 | 7020752 | 247180 | 23.973 | 17.830 |
| 4 | 3.782 | 6437802 | 244305 | 21.983 | 17.622 |
| 5 | 4.744 | 921252 | 64624 | 3.146 | 4.661 |
| 6 | 5.275 | 419754 | 24711 | 1.433 | 1.782 |
| 7 | 5.575 | 313325 | 21765 | 1.070 | 1.570 |
| 8 | 5.694 | 382747 | 20238 | 1.307 | 1.460 |
| 9 | 6.374 | 621286 | 30483 | 2.121 | 2.199 |
| 10 | 7.018 | 458983 | 19739 | 1.567 | 1.424 |
| 11 | 7.374 | 141024 | 10966 | 0.482 | 0.791 |
| 12 | 7.500 | 97885 | 10484 | 0.334 | 0.756 |
| 13 | 8.148 | 1836210 | 82662 | 6.270 | 5.963 |
| 14 | 8.730 | 162900 | 10009 | 0.556 | 0.722 |
| 15 | 9.176 | 1081749 | 43940 | 3.694 | 3.170 |
| 16 | 9.714 | 365859 | 27845 | 1.249 | 2.009 |
| 17 | 9.888 | 386384 | 30506 | 1.319 | 2.200 |
| 18 | 10.377 | 766741 | 30434 | 2.618 | 2.195 |
| 19 | 10.842 | 344054 | 28232 | 1.175 | 2.036 |
| 20 | 11.023 | 650515 | 35238 | 2.221 | 2.542 |
| 21 | 11.651 | 94494 | 5373 | 0.323 | 0.388 |
| 22 | 11.877 | 102916 | 4955 | 0.351 | 0.357 |
| 23 | 12.711 | 235482 | 4135 | 0.804 | 0.298 |
| 24 | 13.691 | 122439 | 5298 | 0.418 | 0.382 |
| 25 | 13.899 | 217442 | 5346 | 0.742 | 0.386 |
| 26 | 15.740 | 289614 | 6841 | 0.989 | 0.493 |
| 27 | 16.573 | 944361 | 20128 | 3.225 | 1.452 |
| 28 | 17.977 | 62285 | 2220 | 0.213 | 0.160 |
| 29 | 18.370 | 49638 | 1986 | 0.169 | 0.143 |
| 30 | 18.905 | 13587 | 729 | 0.046 | 0.053 |
| 31 | 20.131 | 144456 | 1907 | 0.493 | 0.138 |
| 32 | 22.073 | 113970 | 1621 | 0.389 | 0.117 |
| 33 | 23.832 | 36873 | 686 | 0.126 | 0.049 |
| 34 | 25.162 | 64370 | 1140 | 0.220 | 0.082 |
| 35 | 26.434 | 12640 | 344 | 0.043 | 0.025 |
| 36 | 27.833 | 22406 | 568 | 0.077 | 0.041 |
| 37 | 29.302 | 26492 | 524 | 0.090 | 0.038 |
| Total | | 29285755 | 1386335 | 100.000 | 100.000 |

Keterangan :

Warna merah = Stigmasterol; biru = Campesterol, ungu = β -sitosterol

6.5 Kadar Fitosterol FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

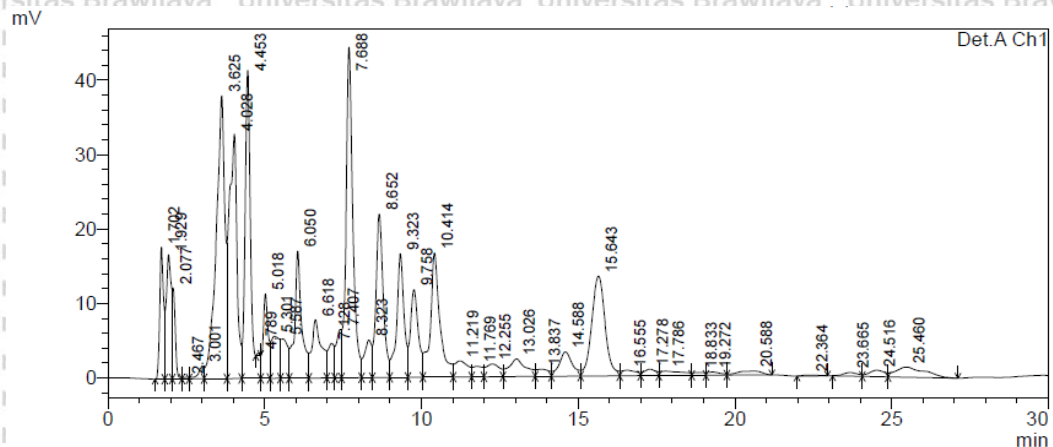
Detector A Ch1 206nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.694 | 159050 | 16209 | 2.171 | 3.758 |
| 2 | 2.838 | 175514 | 14652 | 2.396 | 3.397 |
| 3 | 3.710 | 1085420 | 47429 | 14.815 | 10.996 |
| 4 | 4.001 | 511532 | 27441 | 6.982 | 6.362 |
| 5 | 4.617 | 252622 | 12080 | 3.448 | 2.801 |
| 6 | 5.021 | 121612 | 9795 | 1.660 | 2.271 |
| 7 | 5.160 | 105160 | 9940 | 1.435 | 2.304 |
| 8 | 5.417 | 206486 | 7996 | 2.818 | 1.854 |
| 9 | 5.864 | 35935 | 5625 | 0.490 | 1.304 |
| 10 | 6.062 | 163819 | 13496 | 2.236 | 3.129 |
| 11 | 6.235 | 154634 | 11691 | 2.111 | 2.711 |
| 12 | 6.699 | 129303 | 9049 | 1.765 | 2.098 |
| 13 | 6.874 | 93038 | 7937 | 1.270 | 1.840 |
| 14 | 7.154 | 97017 | 5297 | 1.324 | 1.228 |
| 15 | 7.795 | 748979 | 49839 | 10.223 | 11.555 |
| 16 | 7.999 | 395122 | 35188 | 5.393 | 8.158 |
| 17 | 8.812 | 401703 | 21959 | 5.483 | 5.091 |
| 18 | 9.022 | 213179 | 16479 | 2.910 | 3.821 |
| 19 | 9.473 | 291289 | 18825 | 3.976 | 4.365 |
| 20 | 9.754 | 150781 | 14000 | 2.058 | 3.246 |
| 21 | 9.953 | 249358 | 15962 | 3.403 | 3.701 |
| 22 | 10.218 | 152293 | 11933 | 2.079 | 2.767 |
| 23 | 10.549 | 241031 | 14439 | 3.290 | 3.348 |
| 24 | 10.832 | 198141 | 11222 | 2.704 | 2.602 |
| 25 | 11.409 | 50117 | 2315 | 0.684 | 0.537 |
| 26 | 11.708 | 51692 | 1893 | 0.706 | 0.439 |
| 27 | 12.700 | 76423 | 1852 | 1.043 | 0.429 |
| 28 | 13.355 | 130500 | 2614 | 1.781 | 0.606 |
| 29 | 15.125 | 109199 | 3500 | 1.490 | 0.811 |
| 30 | 16.014 | 500147 | 8667 | 6.826 | 2.009 |
| 31 | 17.584 | 19063 | 735 | 0.260 | 0.170 |
| 32 | 18.114 | 8400 | 415 | 0.115 | 0.096 |
| 33 | 21.732 | 3630 | 131 | 0.050 | 0.030 |
| 34 | 24.241 | 6779 | 244 | 0.093 | 0.056 |
| 35 | 26.701 | 37616 | 476 | 0.513 | 0.110 |
| Total | | 7326581 | 431323 | 100.000 | 100.000 |

Keterangan :

Warna merah = Stigmasterol; biru = Campesterol, ungu = β -sitosterol

6.6 Kadar Fitosterol FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 1.702 | 155834 | 17750 | 2.560 | 4.830 |
| 2 | 1.929 | 185686 | 16695 | 3.050 | 4.543 |
| 3 | 2.077 | 78955 | 12237 | 1.297 | 3.330 |
| 4 | 2.467 | 2592 | 189 | 0.043 | 0.051 |
| 5 | 3.001 | 20743 | 1702 | 0.341 | 0.463 |
| 6 | 3.625 | 718906 | 37978 | 11.808 | 10.333 |
| 7 | 4.028 | 564711 | 32851 | 9.275 | 8.938 |
| 8 | 4.453 | 519898 | 41399 | 8.539 | 11.264 |
| 9 | 4.789 | 1528 | 302 | 0.025 | 0.082 |
| 10 | 5.018 | 125158 | 11341 | 2.056 | 3.086 |
| 11 | 5.301 | 104668 | 5661 | 1.719 | 1.540 |
| 12 | 5.587 | 82320 | 5258 | 1.352 | 1.431 |
| 13 | 6.050 | 268242 | 17064 | 4.406 | 4.643 |
| 14 | 6.618 | 168747 | 7832 | 2.772 | 2.131 |
| 15 | 7.128 | 63827 | 4642 | 1.048 | 1.263 |
| 16 | 7.407 | 72145 | 6483 | 1.185 | 1.764 |
| 17 | 7.688 | 664571 | 44393 | 10.916 | 12.079 |
| 18 | 8.323 | 82628 | 5038 | 1.357 | 1.371 |
| 19 | 8.652 | 354094 | 21949 | 5.816 | 5.972 |
| 20 | 9.323 | 271778 | 16599 | 4.464 | 4.516 |
| 21 | 9.758 | 205101 | 11769 | 3.369 | 3.202 |
| 22 | 10.414 | 354166 | 16689 | 5.817 | 4.541 |
| 23 | 11.219 | 63544 | 2170 | 1.044 | 0.591 |
| 24 | 11.769 | 31810 | 1428 | 0.522 | 0.388 |
| 25 | 12.255 | 51832 | 1712 | 0.851 | 0.466 |
| 26 | 13.026 | 89621 | 2363 | 1.472 | 0.643 |
| 27 | 13.837 | 27093 | 961 | 0.445 | 0.262 |
| 28 | 14.588 | 95408 | 3255 | 1.567 | 0.886 |
| 29 | 15.643 | 398050 | 13407 | 6.538 | 3.648 |
| 30 | 16.555 | 24994 | 750 | 0.411 | 0.204 |
| 31 | 17.278 | 22844 | 886 | 0.375 | 0.241 |
| 32 | 17.786 | 29723 | 603 | 0.488 | 0.164 |
| 33 | 18.833 | 10221 | 387 | 0.168 | 0.105 |
| 34 | 19.272 | 12406 | 425 | 0.204 | 0.116 |
| 35 | 20.588 | 27849 | 527 | 0.457 | 0.143 |
| 36 | 22.364 | 3518 | 121 | 0.058 | 0.033 |
| 37 | 23.665 | 14992 | 479 | 0.246 | 0.130 |
| 38 | 24.516 | 29489 | 857 | 0.484 | 0.233 |
| 39 | 25.460 | 88526 | 1367 | 1.454 | 0.372 |
| Total | | 6088222 | 367521 | 100.000 | 100.000 |

Keterangan :
 Warna merah = Stigmasterol; biru = Campesterol, ungu = β-sitosterol

6.7 Kadar Stigmasterol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 µl, maka berat sampel injeksi = 20µg
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 µl, maka berat standart injeksi = 2 µg
- Retention Time Standart : 22.839 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat Stigmasterol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat Stigmasterol dalam FTT (%) | ppm Stigmasterol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|--|------------------------------------|------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 973.313 | 113.970 | 2.740,02 | 1,17 | 11.709,49 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 973.313 | 3.630 | 83,91 | 0,04 | 372,95 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 973.313 | 3.518 | 77,35 | 0,04 | 361,44 |

6.8 Kadar β-sitosterol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 µl, maka berat sampel injeksi = 20µg
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 µl, maka berat standart injeksi = 2 µg
- Retention Time Standart : 26.075 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat β-sitosterol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat β-sitosterol dalam FTT (%) | ppm β-sitosterol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|--|------------------------------------|------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 208.895 | 12.640 | 1415,91 | 0,61 | 6.050,88 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 208.895 | 37.616 | 4.051,60 | 1,80 | 18.007,13 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 208.895 | 2.750 | 9.068,94 | 4,24 | 42.378,22 |



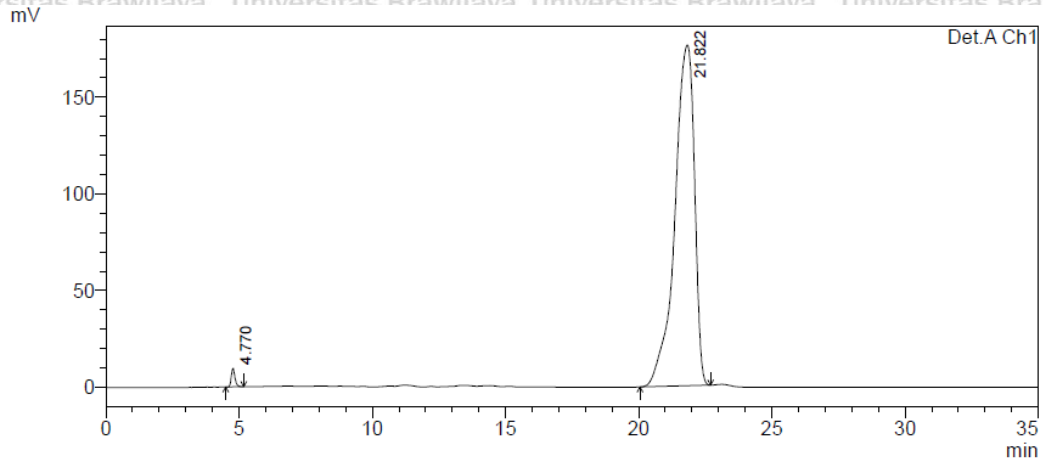
6.9 Kadar Kampesterol pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 µl, maka berat sampel injeksi = 20µg
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 µl, maka berat standart injeksi = 2 µg
- Retention Time Standart : 23.256 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat Kampesterol dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat Kampesterol dalam FTT (%) | ppm Kampesterol |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|-----------------------------------|-----------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 1.438.651 | 36.873 | 599,75 | 0,26 | 2.563,02 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 1.438.651 | 6.779 | 106,02 | 0,05 | 471,20 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 1.438.651 | 14.992 | 223.01 | 0,10 | 1.042,08 |

Lampiran 7. Analisa Kadar Karoten dengan HPLC

7.1 Standar α -Karoten



1 Det.A Ch1/450nm

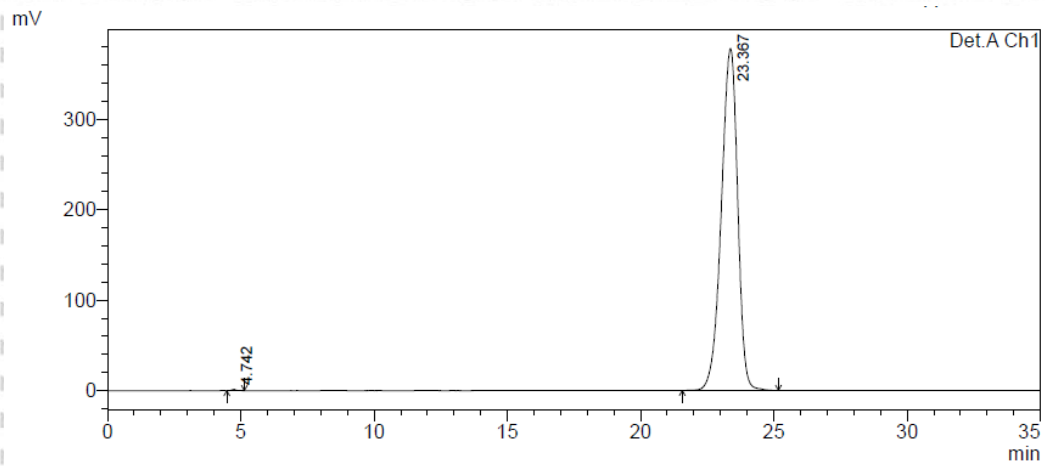
PeakTable

Detector A Ch1 450nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 4.770 | 91944 | 9421 | 1.006 | 5.081 |
| 2 | 21.822 | 9048315 | 176012 | 98.994 | 94.919 |
| Total | | 9140259 | 185433 | 100.000 | 100.000 |



7.2 Standar β -Karoten



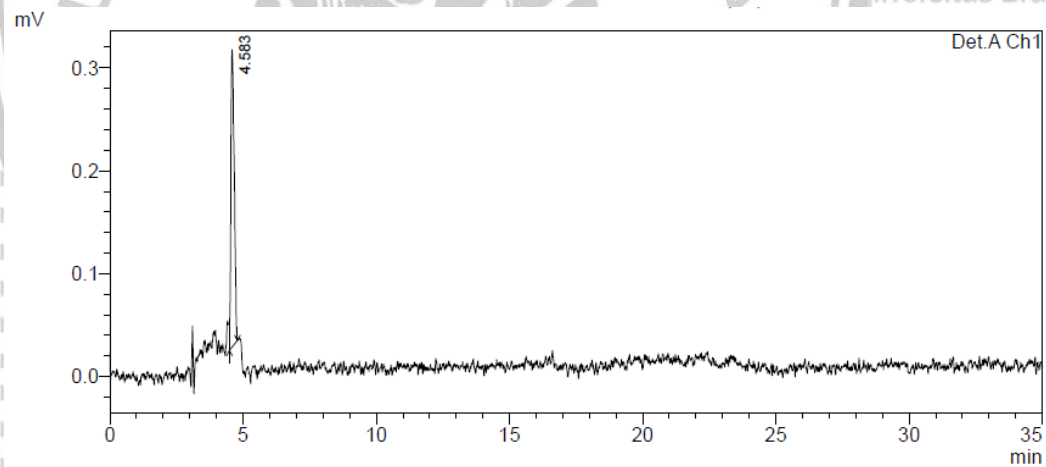
1 Det.A Ch1/450nm

PeakTable

Detector A Ch1 450nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|----------|--------|---------|----------|
| 1 | 4.742 | 12156 | 1290 | 0.075 | 0.340 |
| 2 | 23.367 | 16144779 | 378108 | 99.925 | 99.660 |
| Total | | 16156934 | 379397 | 100.000 | 100.000 |

7.3 Kadar Karoten FTT DALMS Sebelum Optimasi



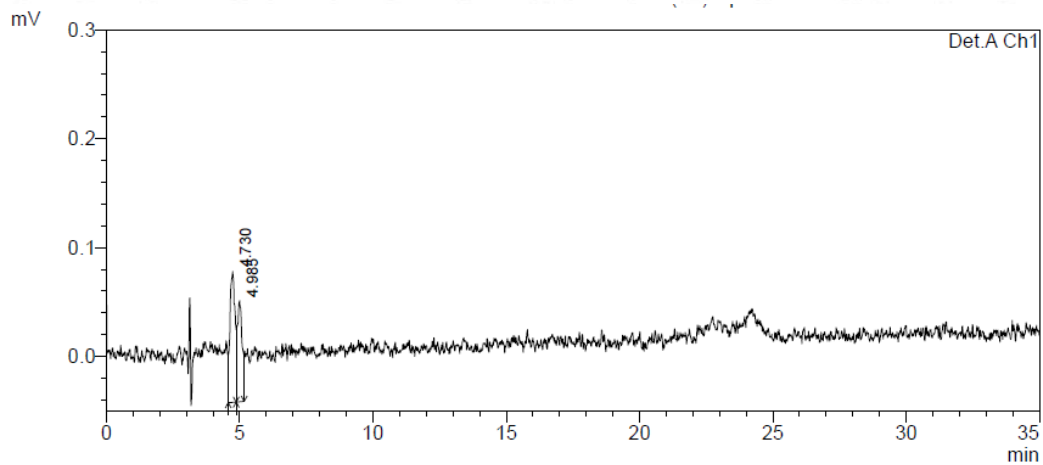
1 Det.A Ch1/450nm

PeakTable

Detector A Ch1 450nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|------|--------|---------|----------|
| 1 | 4.583 | 2526 | 289 | 100.000 | 100.000 |
| Total | | 2526 | 289 | 100.000 | 100.000 |

7.4 Kadar Karoten FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi



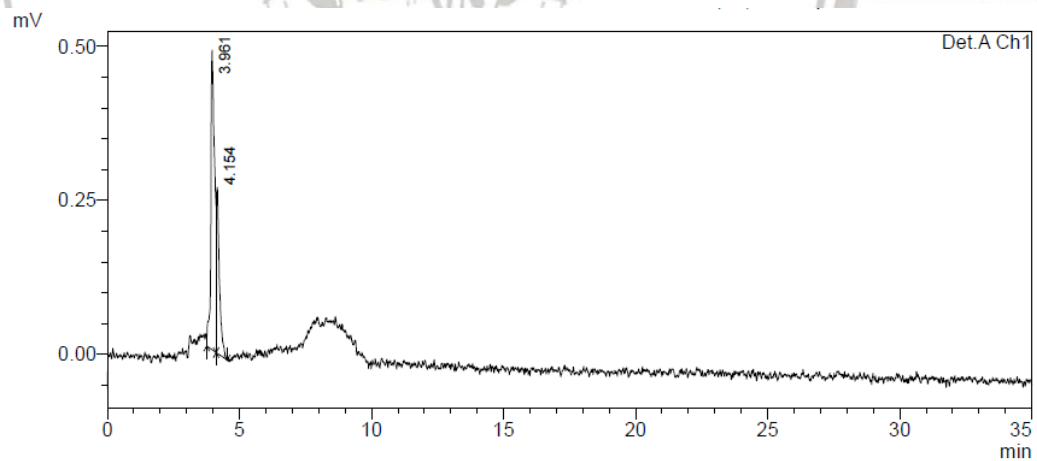
1 Det.A Ch1/450nm

PeakTable

Detector A Ch1 450nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|------|--------|---------|----------|
| 1 | 4.730 | 1592 | 120 | 56.248 | 56.391 |
| 2 | 4.985 | 1239 | 93 | 43.752 | 43.609 |
| Total | | 2831 | 213 | 100.000 | 100.000 |

7.5 Kadar Karoten FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang



1 Det.A Ch1/450nm

PeakTable

Detector A Ch1 450nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|------|--------|---------|----------|
| 1 | 3.961 | 4915 | 487 | 69.413 | 64.365 |
| 2 | 4.154 | 2166 | 270 | 30.587 | 35.635 |
| Total | | 7081 | 756 | 100.000 | 100.000 |

7.6 Kadar α -Karoten pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 μ l, maka berat sampel injeksi = 20 μ g
- Konsentrasi Standart : 50 ppm (0,05 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 1 μ l, maka berat standart injeksi = 0,05 μ g
- Retention Time Standart : 21.822 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat α -Karoten dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat α -Karoten dalam FTT (%) | ppm α -Karoten |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|---|-----------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 9.048.315 | nd | nd | nd | nd |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 9.048.315 | nd | nd | nd | nd |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 9.048.315 | nd | nd | nd | nd |

Keterangan : nd = tidak terdeteksi

7.6 Kadar β -Karoten pada FTT DALMS

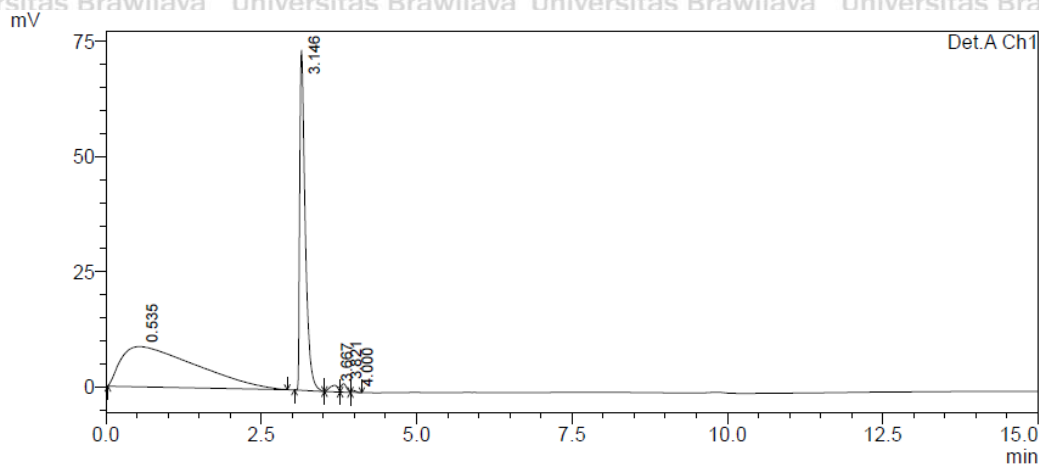
- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 μ l, maka berat sampel injeksi = 20 μ g
- Konsentrasi Standart : 50 ppm (0,05 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 1 μ l, maka berat standart injeksi = 0,05 μ g
- Retention Time Standart : 23.367 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat β -Karoten dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat β -Karoten dalam FTT (%) | ppm β -Karoten |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|--|--|----------------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 16.144.779 | nd | nd | nd | nd |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 16.144.779 | nd | nd | nd | nd |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 16.144.779 | nd | nd | nd | nd |

Keterangan : nd = tidak terdeteksi

Lampiran 8. Analisa Kadar Skualen dengan HPLC

8.1 Standar Skualen



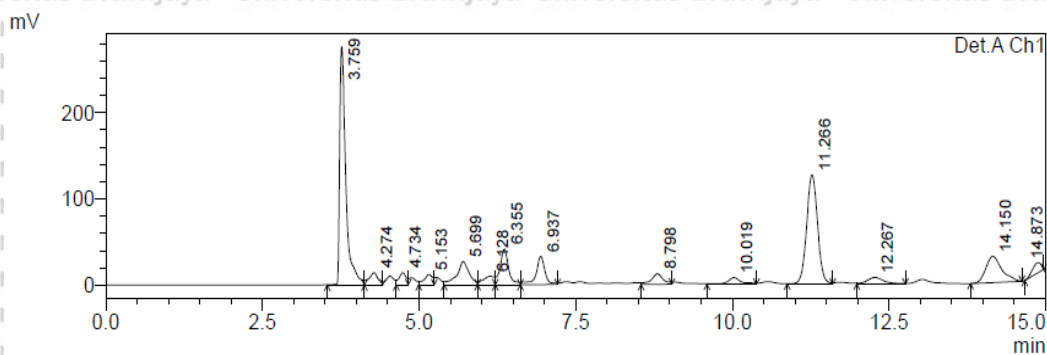
1 Det.A Ch1/208nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 0.535 | 735463 | 8725 | 60.549 | 10.206 |
| 2 | 3.146 | 452437 | 73214 | 37.248 | 85.641 |
| 3 | 3.667 | 13629 | 1354 | 1.122 | 1.584 |
| 4 | 3.821 | 10944 | 1793 | 0.901 | 2.097 |
| 5 | 4.000 | 2190 | 403 | 0.180 | 0.472 |
| Total | | 1214662 | 85489 | 100.000 | 100.000 |



8.2 Kadar Skualen FTT DALMS Sebelum Optimasi



1 Det.A Ch1/208nm

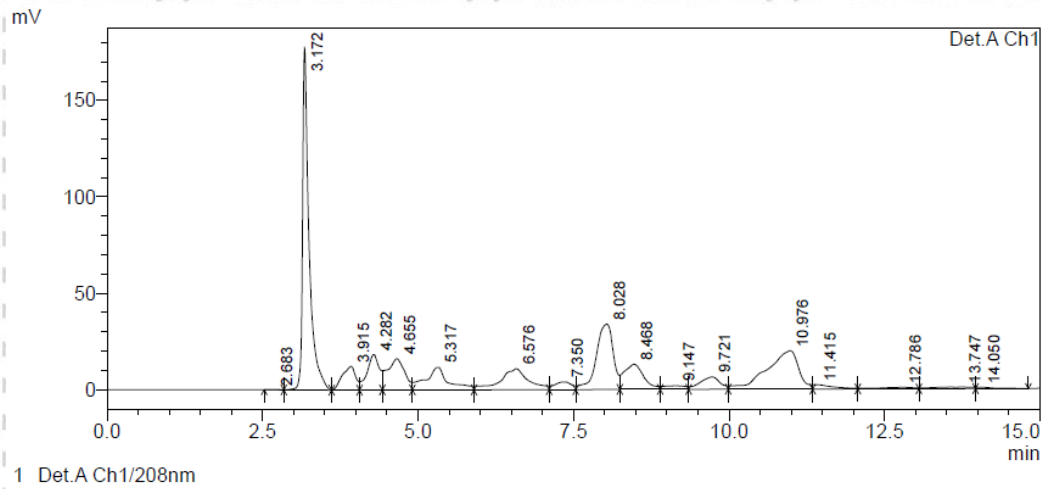
PeakTable

Detector A Ch1 208nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 3.759 | 1895617 | 276459 | 31.198 | 44.333 |
| 2 | 4.274 | 144638 | 14070 | 2.380 | 2.256 |
| 3 | 4.734 | 111230 | 14224 | 1.831 | 2.281 |
| 4 | 5.153 | 117775 | 11982 | 1.938 | 1.922 |
| 5 | 5.699 | 365373 | 27046 | 6.013 | 4.337 |
| 6 | 6.128 | 125049 | 9780 | 2.058 | 1.568 |
| 7 | 6.355 | 385608 | 41297 | 6.346 | 6.622 |
| 8 | 6.937 | 323638 | 32653 | 5.326 | 5.236 |
| 9 | 8.798 | 160630 | 12284 | 2.644 | 1.970 |
| 10 | 10.019 | 112796 | 7536 | 1.856 | 1.208 |
| 11 | 11.266 | 1535262 | 126371 | 25.267 | 20.265 |
| 12 | 12.267 | 134745 | 7411 | 2.218 | 1.188 |
| 13 | 14.150 | 545817 | 30564 | 8.983 | 4.901 |
| 14 | 14.873 | 117956 | 11920 | 1.941 | 1.911 |
| Total | | 6076133 | 623597 | 100.000 | 100.000 |



8.3 Kadar Skualen FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi



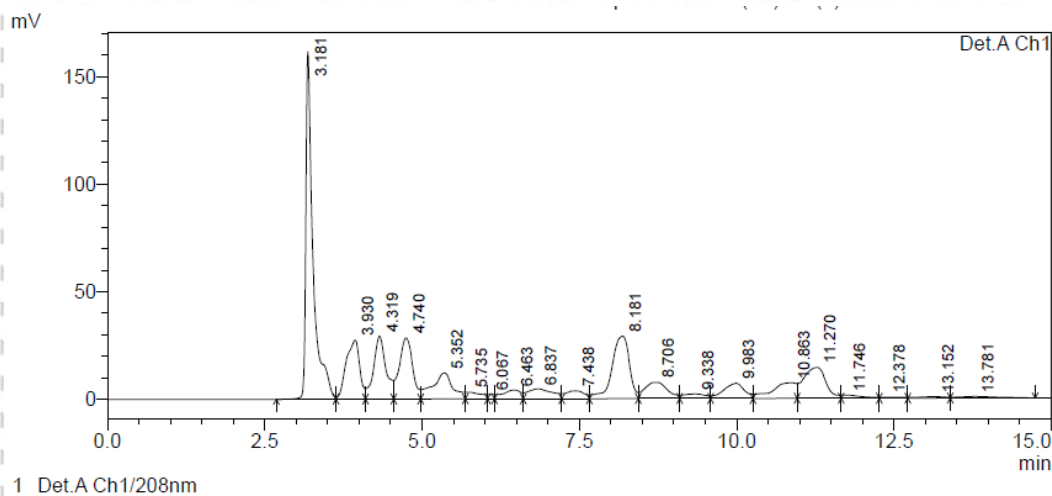
1 Det.A Ch1/208nm

PeakTable

Detector A Ch1 208nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.683 | 1218 | 77 | 0.026 | 0.023 |
| 2 | 3.172 | 1274586 | 177840 | 27.224 | 53.737 |
| 3 | 3.915 | 184010 | 12326 | 3.930 | 3.724 |
| 4 | 4.282 | 249550 | 18373 | 5.330 | 5.552 |
| 5 | 4.655 | 312473 | 16271 | 6.674 | 4.917 |
| 6 | 5.317 | 295289 | 11723 | 6.307 | 3.542 |
| 7 | 6.576 | 339188 | 10877 | 7.245 | 3.287 |
| 8 | 7.350 | 75570 | 3943 | 1.614 | 1.192 |
| 9 | 8.028 | 641156 | 33911 | 13.695 | 10.247 |
| 10 | 8.468 | 285077 | 13098 | 6.089 | 3.958 |
| 11 | 9.147 | 45523 | 1866 | 0.972 | 0.564 |
| 12 | 9.721 | 141227 | 6387 | 3.017 | 1.930 |
| 13 | 10.976 | 700400 | 19813 | 14.960 | 5.987 |
| 14 | 11.415 | 50001 | 2151 | 1.068 | 0.650 |
| 15 | 12.786 | 33728 | 769 | 0.720 | 0.232 |
| 16 | 13.747 | 39192 | 815 | 0.837 | 0.246 |
| 17 | 14.050 | 13613 | 703 | 0.291 | 0.212 |
| Total | | 4681803 | 330944 | 100.000 | 100.000 |

8.4 Kadar Skualen FTT DALMS Menggunakan Pelarut Daur Ulang



1 Det.A Ch1/208nm

PeakTable

Detector A Ch1 208nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 3.181 | 1268697 | 161581 | 26.926 | 46.593 |
| 2 | 3.930 | 409495 | 27455 | 8.691 | 7.917 |
| 3 | 4.319 | 402898 | 29301 | 8.551 | 8.449 |
| 4 | 4.740 | 410592 | 28421 | 8.714 | 8.195 |
| 5 | 5.352 | 272949 | 12080 | 5.793 | 3.483 |
| 6 | 5.735 | 54286 | 3074 | 1.152 | 0.887 |
| 7 | 6.067 | 13054 | 2022 | 0.277 | 0.583 |
| 8 | 6.463 | 83356 | 4067 | 1.769 | 1.173 |
| 9 | 6.837 | 127193 | 4630 | 2.699 | 1.335 |
| 10 | 7.438 | 75991 | 3662 | 1.613 | 1.056 |
| 11 | 8.181 | 554380 | 28980 | 11.766 | 8.356 |
| 12 | 8.706 | 188865 | 7572 | 4.008 | 2.183 |
| 13 | 9.338 | 52085 | 2073 | 1.105 | 0.598 |
| 14 | 9.983 | 160561 | 7048 | 3.408 | 2.032 |
| 15 | 10.863 | 191636 | 7234 | 4.067 | 2.086 |
| 16 | 11.270 | 351484 | 14403 | 7.460 | 4.153 |
| 17 | 11.746 | 32150 | 1409 | 0.682 | 0.406 |
| 18 | 12.378 | 10360 | 436 | 0.220 | 0.126 |
| 19 | 13.152 | 20836 | 640 | 0.442 | 0.185 |
| 20 | 13.781 | 30993 | 707 | 0.658 | 0.204 |
| Total | | 4711860 | 346794 | 100.000 | 100.000 |

8.5 Kadar Skualen pada FTT DALMS

- Berat Sampel : 1000 ppm (1 mg/ml)
- Volume Injeksi sampel : 20 µl, maka berat sampel injeksi = 20µg
- Konsentrasi Standart : 100 ppm (0,1 mg/ml)
- Volume Injeksi standart : 20 µl, maka berat standart injeksi = 2 µg
- Retention Time Standart : 3,146 menit

| Sampel | Luas Area Standar | Luas Area Sampel | Berat Skualen dalam FTT Hasil Saponifikasi (ug) | % Berat Skualen dalam FTT (%) | ppm Skualen |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|---|-------------------------------|-------------|
| FTT DALMS Sebelum Optimasi | 452.437 | 144.638 | 7.288,85 | 3,20 | 31.968,65 |
| FTT DALMS Pelarut Baru Hasil Optimasi | 452.437 | 184.010 | 8.581,55 | 4,07 | 40.670,86 |
| FTT DALMS Pelarut Daur Ulang | 452.437 | 409.495 | 19.368,87 | 9,05 | 90.508,73 |

Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian



DALMS sebagai Bahan Baku



Hasil Saponifikasi DALMS



Pemisahan FTT dan FT hasil saponifikasi



Pemisahan FTT dari heksana dengan *Rotary Evaporator*



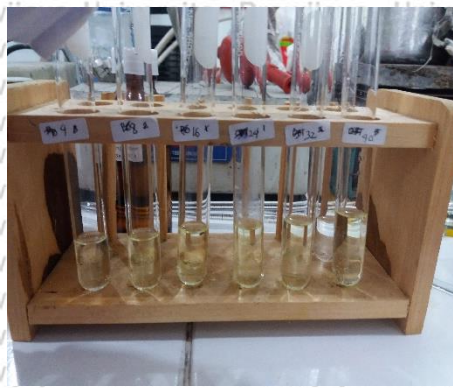
Heksana daur ulang hasil pemisahan FTT dan pelarut



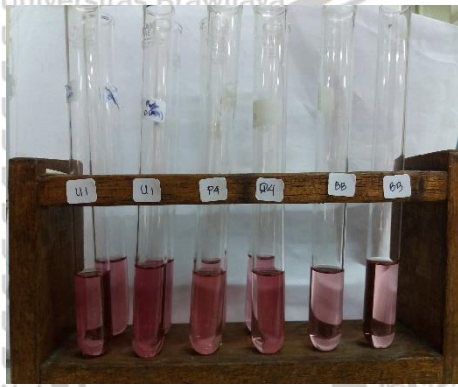
Penguapan Heksana pada FTT dengan Nitrogen



Pemisahan Etanol Daur Ulang dari FT



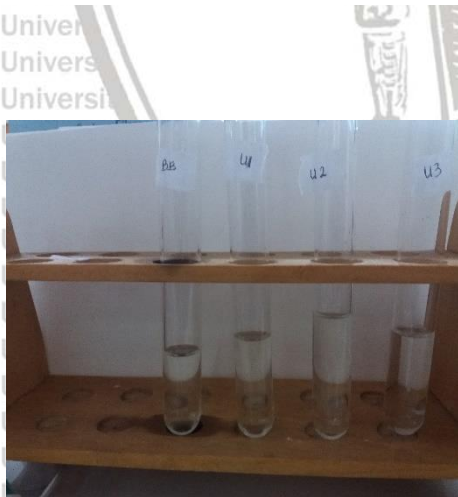
Sampel Uji Bilangan p-Anisidin



Sampel Uji Bilangan Peroksida



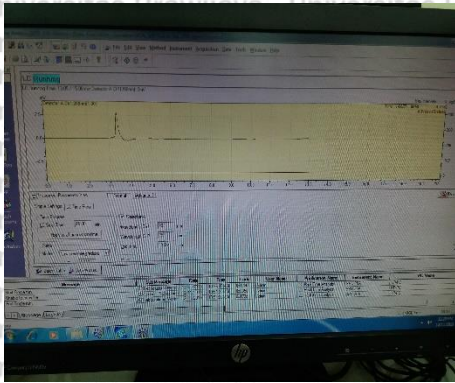
Pengukuran panjang gelombang p-Anisidin dan Peroksida



Preparasi sampel uji untuk HPLC



Injeksi sampel dan pemantauan tekanan HPLC



Running sampel uji HPLC



FTT DALMS bebas pelarut



Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

21-0322-T



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PROGRAM PASCASARJANA**

Nomor: 1159/UN10.F40/PN/2021
Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Nissa Clara Firsta
NIM : 176100100111009
Program Studi : Program Magister Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan Judul Tesis

**Kajian Perbandingan Pelarut : Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) DAN
Penggunaan Pelarut Daur Ulang Pada Proses Saponifikasi DALMS Untuk
Memperoleh Rendemen Tertinggi**

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal 13 Agustus 2021 dan dinyatakan bebas plagiasi dengan kriteria toleransi $\leq 5\%$.



Dr. Pr. Marjono, M.Phil
196211161988031004



Indah Yanti, S.Si., M.Si.
NIP. 19791129.200501.2.002

Malang, 19 Agustus 2021
Ketua Badan Penerbitan Jurnal