

## PENENTUAN BILANGAN HIDROPHILE-LIOPHILE BALANCE (HLB) FOSFOLIPIDA DARI BUAH KELAPA

Dwi Hudiyanti, Basuki Ariadi, Rum Hastuti

Laboratorium Kimia Fisik FMIPA, Universitas Diponegoro

### ABSTRAK

Telah dilakukan penentuan bilangan HLB fosfolipida dari buah kelapa. Bilangan HLB ditentukan dengan metode Davies yang menghitung bilangan HLB dari bilangan HLB komponen-komponennya.

Penelitian menunjukkan bahwa fosfolipida dalam buah kelapa adalah fosfatidiletanolamin dan fosfatidilserin dengan komponen asam lemaknya adalah asam palmitat, miristat, laurat, kaprilat dan kaprat. Dari perhitungan diperoleh bilangan HLB fosfatidiletanolamin adalah antara 11,32 - 17,02 dan fosfatidilserin antara 13,42 - 19,12. Bilangan ini menunjukkan bahwa kedua fosfolipida dari buah kelapa itu berpotensi untuk digunakan sebagai zat pengemulsi.

Kata kunci : fosfolipida, buah kelapa, bilangan HLB

### Determination Of Hydrophile-Lipophile Balance (Hlb) Number Of Phospholipid From Coconut Seed

#### ABSTRACT

Determination of HLB number of phospholipid from coconut seed has been done. The HLB number was determined by Davies method which calculate the HLB number from the HLB of the component.

Research showed that the phospholipid in the coconut seed are phosphatidylethanolamine and or phosphatidylserine and their fatty acid components are palmitic acid, myristic acid, lauric acid, kaprilic acid and kapric acid.

The calculation resulted in that HLB number of phosphatidylethanolamine is between 11,32-17,02 and of phosphatidylserine between is 13,42 - 19,12. It means that the phospholipid can be used as an emulsifier agent.

Key words: phospholipid, coconut seed, HLB number

### PENDAHULUAN

Buah kelapa dapat dibuat santan kelapa yang merupakan emulsi minyak dalam air yang cukup stabil, hal ini menunjukkan bahwa zat pengemulsi dalam santan kelapa mempunyai kemampuan untuk mengemulsikan dengan baik. Diperkirakan bahwa zat pengemulsi tersebut adalah lipida dari kelas fosfolipid<sup>(1)</sup> Senyawa ini biasanya mengandung ester asam lemak pada dua posisi gliserol dengan sua-

tu ester fosfat yang dapat pula mengikat suatu basa nitrogen pada posisi ketiga. Hal ini membuat salah satu ujung molekulnya mempunyai sifat hidrofilik yang tinggi, sedangkan sisa dari molekul tersusun oleh kelompok hidrofobik yang panjang. Dengan demikian fosfolipid dari buah kelapa diperkirakan mempunyai sifat pengemulsi yang baik. Untuk mengetahui hal tersebut maka akan ditentukan

besarnya bilangan HLBnya yang merupakan salah satu parameter yang sering digunakan dalam pemilihan surfaktan sebagai zat pengemulsi. Pemilihan ini berdasarkan pada daerah atau range dimana HLB dapat digunakan secara optimal untuk suatu pemakaian tertentu. HLB surfaktan dapat menunjukkan efisiensi (konsentrasi zat pengemulsi yang dikehendaki), efektivitas (kestabilan emulsi) dan tipe emulsi yang diharapkan dapat terbentuk (o/w atau w/o). Pemilihan emulsifier yang sesuai, dengan metode HLB ini tergantung pada sifat hidrofilik dan lipofilik molekul surfaktan.<sup>(2,3)</sup> Untuk memprediksikan tipe dan kestabilan emulsi yang dihasilkan dari komponen-komponen penyusun surfaktan maka dibuat peringkat secara numerik yang menunjukkan aksi surfaktan seperti diberikan dalam tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Skala HLB<sup>(2)</sup>

Range HLB	Penggunaan
3 - 6	Zat pengemulsi air dalam minyak (w/o)
7 - 9	Zat pembasah (wetting agent)
8 - 18	Zat pengemulsi minyak dalam air (o/w)
13 - 15	Detergen
15 - 18	Pelarut (Solubilizer)

**Fosfolipid.** Fosfolipid atau fosfatidat ialah suatu gliserida yang mengandung fosfat dalam bentuk ester asam fosfat sebagai senyawa fosfolipid. Senyawa-senyawa dalam golongan fosfolipid ini dapat dipandang sebagai derivat asam  $\alpha$  fosfatidat. Jenis asam lemak yang terdapat pada atom karbon lain dalam gliserol

sangat tergantung dari jenis fosfolipidnya, tetapi biasanya satu dari dua asam lemak tersebut merupakan asam lemak yang tidak jenuh. Fosfolipid merupakan salah satu zat pengemulsi yang terdapat di alam, misalnya adalah fosfatidiletanolamin (sefalin).<sup>(4)</sup>

## METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu : isolasi fosfolipida dari buah kelapa kemudian diikuti dengan identifikasi gugus-gugus fungsi penyusun fosfolipida tersebut. Setelah diketahui gugus-gugus fungsinya maka dapat dihitung besarnya angka HLB.

**Bahan-bahan.** Buah kelapa, Aseton (Merck p.a), Heksana (Merck p.a), Iso-propanol (Merck p.a), Kloroform (Merck p.a), Asam asetat (p.a), TLC silica gel GF<sub>254</sub>, Ninhidrin (Merck p.a), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat (Merck p.a), Reagen esterifikasi (NH<sub>4</sub>Cl 2g + Metanol 60 mL + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL), NaOH (Merck p.a), Butylated hidroksitoluena (BHT), Aquades.

**Alat-alat.** Blender, Pompa vakum, Corong buchner, Pengaduk magnet, Seperangkat alat refluks, Kertas Whatman No. 42, Rotary evaporator, GC-MS (Shimadzu QP 5000).

## Isolasi fosfolipida dari buah kelapa.

Pada tahap ini dilakukan pembuatan santan kelapa dari buah kelapa dengan menggunakan alat juicer. Santan kelapa yang diperoleh kemudian disentrifuge untuk memisahkan cream dengan skimnya. Cream yang diperoleh kemudian digunakan untuk isolasi. Cream ditambah dengan aseton dingin lalu dihomogenisasi dalam blender. Homogenat yang diper-

oleh disaring. Residu yang diperoleh dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian ditambah dengan campuran isopropanol-heksana (2:3) dan 0,1% BHT, lalu diaduk diatas hot plate pada suhu  $\pm 38^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Setelah didinginkan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dicuci dengan 7-10%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat dan disaring. Kemudian pelarutnya diuapkan dengan rotary evaporator. Hasil yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (TLC). Spot yang diperoleh diidentifikasi dengan menggunakan ninhidrin dalam aseton yang disemprotkan pada permukaan TLC dan dipanaskan dalam oven pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 2-3 menit

**Identifikasi gugus-gugus fungsi penyusun fosfolipid.** Crude fosfolipida dihidrolisa dengan 0,5M NaOH-metanolik setelah itu direfluks sampai mendidih selama 3-5 menit. Kemudian ditambahkan reagen esterifikasi sebanyak 15 mL dan dididihkan kembali selama  $\pm 15$  menit. Setelah didinginkan hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong ekstraksi lalu ditambah dengan air dan heksana lalu digojog secara perlahan-lahan setelah itu dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan heksana dipisahkan secara hati-hati dan dikeringkan dengan 7-10%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Pelarut heksana dihilangkan dengan rotary evaporator. Sampel telah siap untuk dianalisa dengan alat GC-MS dengan kondisi operasi; jenis pengionan: El (elektron Impact) 70 ev, Suhu detektor:  $280^{\circ}\text{C}$ , Gain: 1,5 Kva, injeksi: split (40:1), 1  $\mu\text{l}$ ; inlet  $270^{\circ}\text{C}$ , jenis kolom: DB-1 (100% Dimethylpolysiloxane) 30 m x 0,25 mm, 0,33

$\mu\text{m}$ , oven  $100^{\circ}\text{C}$  (5 menit) s/d  $260^{\circ}\text{C}$  kenaikan  $10^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ , gas pembawa: helium 15Kpa 0,5 ml/menit constan flow.

**Penentuan bilangan HLB.** Penentuan bilangan HLB dilakukan dengan metode Davies. Dalam metode ini bilangan HLB ditentukan dari bilangan HLB komponen-komponen penyusun zat pengemulsi dan dihitung dengan persamaan:

$$\text{HLB} = 7 + \Sigma (\text{bilangan HLB gugus hidrofilik}) - \Sigma (\text{bilangan HLB gugus hidrofobik})$$

## PEMBAHASAN

**Isolasi fosfolipid.** Perlakuan awal melibatkan penambahan aseton dingin pada sampel, yaitu untuk mengekstraksi fosfolipid dengan cara pengendapan. Langkah berikutnya adalah meminimalkan kontak langsung antara fosfolipid dengan udara, cahaya dan panas. Hal ini sangat penting untuk mencegah adanya oksidasi atau destruksi pada fosfolipid. Penambahan zat antioksidan seperti butylated hidrositoluena pada pelarut digunakan untuk mencegah terjadinya oksidasi pada fosfolipid. Pada umumnya fosfolipid yang dihasilkan masih terikat dengan protein (lipoprotein) sehingga dalam keadaan ini fosfolipid tidak dapat diekstraksi menggunakan pelarut organik secara murni. Oleh karena itu pelarut yang digunakan adalah campuran isopropanol-heksana 2:3. Iso-propanol efektif dalam memecah membran lipida protein sedangkan heksana digunakan untuk melarutkan fosfolipid. Ekstrak yang diperoleh dicuci dan dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan zat-zat nonlipida yang mungkin

masih ada tanpa menghilangkan zat lipida yang diinginkan. Untuk menghilangkan pelarutnya maka dilakukan evaporasi dengan rotary evaporator dalam keadaan vakum, sehingga diperoleh larutan yang pekat dan berguna untuk analisa lebih lanjut.<sup>(5,6)</sup>

Untuk mengetahui kemurnian dan memisahkan fosfolipid yang dihasilkan ke dalam kelasnya masing-masing maka dilakukan pemisahan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (TLC). Pelarut yang digunakan sebagai eluent adalah kloroform-metanol-asam asetat-air (25:15:4:2 v/v). Fosfolipid dideteksi oleh ninhidrin yang disemprotkan pada permukaan chromatoplate. Fosfolipid yang bereaksi dengan ninhidrin akan memberikan warna ungu, reaksi ini dipercepat dengan pemanasan pada suhu 100°C dalam beberapa menit. Untuk lebih memastikan hasilnya pendeteksian fosfolipid ini dilakukan pula dengan menggunakan lampu UV dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat yang disemprotkan pada permukaan chromatoplate yang akan memberikan warna hitam yang menunjukkan adanya suatu zat organik.<sup>(5,7)</sup> Analisa dengan TLC hanya menghasilkan satu spot saja dan pengidentifikasian dengan ninhidrin menunjukkan bahwa jenis fosfolipid yang terdapat dalam sampel adalah fosfatidiletanolamin dan atau fosfatidilserine karena hanya kedua jenis fosfolipid ini yang mempunyai atom N primer yang akan memberikan warna ungu apabila bereaksi dengan ninhidrin.<sup>(8)</sup> Hal ini mungkin terjadi karena fosfatidiletanolamin dan fosfatidilserine mempunyai kepolaran yang hampir sama sehingga sulit di-

pisahkan, akibatnya keduanya harus dianalisa secara bersama-sama.<sup>(9)</sup>

**Identifikasi gugus-gugus fungsi penyusun fosfolipid.** Fosfolipid mempunyai tekanan uap sangat rendah dan terurai pada suhu tinggi. Oleh karena itu sukar dianalisa langsung dengan kromatografi gas. Meskipun demikian, keterbatasan ini diperbaiki dengan mudahnya ester asam lemaknya dipisahkan dengan kromatografi gas. Fosfolipid dapat diubah menjadi ester metil asam lemaknya dan gliserol serta asam fosfat dan gugus lainnya misalnya etanolamin dengan hidrolisis yang dilanjutkan dengan proses esterifikasi.<sup>(10)</sup> Proses esterifikasi ini menggunakan metode dari Hartman dan Lago.<sup>(11)</sup> Proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan basa yaitu NaOH-metanolik yang akan menguraikan fosfolipid menjadi gliserol dan sabun. Pemilihan metanol sebagai reagen esterifikasi disebabkan karena metanol mempunyai reaktivitas yang tinggi dibandingkan dengan alkohol lain yang sejenis sehingga diharapkan akan menghasilkan rendemen yang baik. Proses esterifikasi ini dipercepat dengan menggunakan suatu katalis yaitu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat.<sup>(4,8)</sup>

**Analisa dengan GC-MS.** Dari hasil analisa dengan GC-MS menunjukkan bahwa dalam sampel terdapat lima komen senyawa seperti ditunjukkan dalam tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisa dengan GC-MS

Puncak	Waktu retensi	Senyawa	Kelimpahan relatif (%)
1	6,334	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	18,35
2	10,267	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	10,26
3	13,502	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	55,75
4	16,118	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	12,90
5	18,376	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2,74

**Penentuan bilangan HLB.** Penentuan bilangan HLB ini dilakukan hanya berdasarkan pada asumsi dan pendekatan yang ada. Tetapi paling tidak dengan penentuan ini akan memberikan gambaran mengenai bilangan HLB dari zat pengemulsi yang ada dalam santan kelapa.

Fosfolipida yang terdapat dalam buah kelapa diidentifikasi sebagai fosfatidiletanolamin dan fosfatidilserine. Asam lemak penyusunnya adalah asam kaprilat, asam kaprat, asam miristat dan asam palmitat dengan posisi masing-masing dalam fosfolipid tidak diketahui, akibatnya ada beberapa kemungkinan bilangan HLB yang diperoleh berdasarkan posisi asam lemak dalam fosfolipid. Bilangan HLB untuk komponen-komponen zat pengemulsi diatas adalah; untuk gugus

hidrofilik, ester =2,4, -O-=1,3, N=9,4, -OH=1,9, -COOH=2,1 sedangkan untuk gugus hidrofobik, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>= 0,475.<sup>(3)</sup> Sedangkan R<sub>1</sub> dan R<sub>2</sub> dapat tersusun dari; (1) asam kaprilat (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>COOH) (2) asam kaprat (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>COOH) 3) asam laurat (C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>COOH) 3) asam miristat (C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>COOH) 3) asam palmitat (C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>COOH). Sehingga nilai HLB yang mungkin bagi kedua fosfolipid tersebut pada tabel 3, dan dari data tersebut diperkirakan bahwa bilangan HLB untuk fosfatidiletanolamin sekitar berkisar 11,31-17,01 sedangkan bilangan HLB untuk fosfatidilserine sekitar berkisar 13,41-19,11. Bilangan HLB tersebut keduanya bertendensi untuk membentuk tipe emulsi o/w.

Tabel. 3 Bilangan HLB fosfolipid

Jenis fosfolipid	HLB									
	Kombinasi asam lemak yang mungkin terjadi pada R <sub>1</sub> dan R <sub>2</sub>									
	1. 2	1. 3	1. 4	1. 5	2. 3	2. 4	2. 5	3. 4	3. 5	4. 5
fosfatidiletanolamin	7,01	16,06	15,11	14,16	15,11	14,16	13,21	13,21	12,26	11,31
Fosfatidilserine	19,11	18,16	17,21	16,26	17,21	16,26	15,31	15,31	14,36	13,41

### KESIMPULAN

Fosfolipida dalam buah kelapa adalah fosfatidiletanolamin dan atau fosfatidilserine dengan asam lemak penyusun, asam palmitat, asam miristat, asam laurat, asam kaprilat, dan asam kaprat. Bilangan HLB untuk fosfatidiletanol-

amin berkisar 11,31-17,01, dan fosfatidilserine berkisar 13,41-19,11. Hal ini menunjukkan bahwa fosfolipida tersebut dapat berfungsi sebagai zat pengemulsi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Birosel, Dionisio M., Ferro, Oliveira, de Vicente, (1977), "*Study of The Properties and Composition of The Coconut Emulsion*", An Farm. Quim S. Paulo 17 : 9.
2. Becher, P. (1983), "*Encyclopaedia of Emulsion Technology*", Volume 1, Marcel Bekker Mc, New York, p. 217, 337.
3. Rosen, Milton J., (1976), "*Surfactant and Interfacial Phenomena*", A Wiley Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York, p. 1-4.
4. Poedjiadi, Anna, (1994), "*Dasar-Dasar Biokimia*", Universitas Indonesia Press, Jakarta, hal 63.
5. Holme, David J., (1993), "*Analytical of Biochemistry*", Second Edition, John Wiley and Son New York, p. 440-441
6. Boyer, Rodney F., (1993), "*Modern Experimental of Biochemistry*", Second Edition, The Benjamin/Cummings Company Inc, California, p. 325.
7. Heftmann, (1983), "*Chromatography Fundamental and Application of Cromatographic and Electrophoretic Methods*", Part B, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, p. B 90.
8. Fessenden, Ralph J., Fessenden, Joan J., (1992), "*Kimia Organik*", a.b Aloysius Hadyana Pudjasmaka, Edisi ketiga, Jilid 2, Erlangga, Jakarta, hal 275.
9. Jobe, Alan and Gluck, Louis, (1978), "*Labeling of Phospholipids in the Surfactant and Subcellular Fractions of Rabbit Lung*", J. Biol. Chem, 253 : 3810.
10. Fardiaz, Dedi, (1989), "*Penunjuk Laboratorium Kromatografi Gas dalam Analisis Pangan*", Pusat Antar Universitas, IPB, Bogor, hal 152, 154.
11. Kirk, Ronalds, Sawyer, Ronald, (1991), "*Pearson's Composition and Analysis of Food*", Ninth Edition, Longman Scientific and Technical, New York, p. 63.