

KAJIAN SIFAT SPESIFITAS BEBERAPA JENIS LIPASE TEHADAP ASAM LEMAK OMEGA-3

(The specificity of Several Kinds Lipases on n-3 Polyunsaturated Fatty Acids)

Jenny Elisabeth ¹⁾, T. Yuliani ²⁾, P. M. Tambunan, ²⁾ dan J. M. Purba ²⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) Jl. Brigjen. Katamso no. 151 – KP Baru, Medan 20158

²⁾ Jurusan THP-Fakultas Pertanian, Unika ST. Thomas SU

ABSTRACT

Several lipases from **microbial and plant**, i.e. *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Candida antarctica*, rice bran, and *Carica papaya latex* (CPL) were examined for synthesis of **omega-3 (n-3) PUFA-rich glyceride** by hydrolysis and acidolysis reaction. Tuna oil was used in hydrolysis reaction, whereas tuna and palm oils were used as source of triglyceride (TAG) molecules and n-3 PUFA concentrate from tuna oil as source of EPA and DHA in acidolysis reaction.

For hydrolysis reaction, the rice bran and CPL lipases showed the lowest hydrolytic activity of the tuna oil, whereas the *R. miehei* lipase showed the highest hydrolytic activity but was unable to hydrolyze EPA and DM. On the contrary, the *C. antarctica* and *Pseudomonas* sp. lipases acted stronger on hydrolysis of DHA ester bond than EPA.

For acidolysis reaction, all the lipases showed ability to incorporate n-3 PUFA into tuna and palm oils. *C. antarctica* lipase had the maximum DHA incorporation into tuna and palm oils, rice bran lipase had relatively similar ability with *R. miehei* lipase, and the CPL lipase had the lowest ability. This study proved that rice bran and CPL lipases also had transesterification activity and showed the feasibility of the rice bran lipase to be a biocatalyst for n-3 PUFA-rich glyceride production. Increasing the substrate ratio, of n-3 PUFA concentrate and tuna or palm oil, could increase the EPA and DHA incorporation. The *R. miehei*, rice bran, and CPL lipases unable to incorporate DHA into DHA-containing glyceride molecule, whereas *C. antarctica* lipase had the capability in high ratio of n-3 PUFA concentrate to oil. Therefore, the lipases were easier to incorporate n-3 PUFA into palm oil than tuna oil since the TAG molecules of palm oil was not as complex as tuna oil. It could be suggested that the lipases did not only have acyl chain and positional specificity, but also the whole glyceride structure specificity.

Keywords : acidolysis, lipase, n-3 PUFA, palm oil, specificity, tuna oil

PENDAHULUAN

Peranan asam lemak omega-3 (n-3), yakni EPA (eicosapentaenoic acid) dan DHA (docosahexaenoic acid) terhadap kesehatan telah banyak diketahui. Disamping mencegah penyakit kardiovaskuler, berpengaruh terhadap fungsi kekebalan tubuh, inflamasi, dan kadar lipid darah, asam lemak n-3 juga dibutuhkan untuk pertumbuhan jaringan otak dan retina manusia (Simopoulos, 1989; Connor et al., 1992; dan Nettleton, 1993).

Telah banyak penelitian yang dilakukan dalam mengembangkan metode sintesis produk gliserida kaya asam lemak n-3. Dalam bentuk ini maka asam lemak n-3 dapat digunakan sebagai bahan nutrisi pangan, karena memiliki ketersediaan hayati dan stabilitas oksidatif yang relatif baik. Metode yang dikembangkan diantaranya adalah hidrolisis selektif minyak ikan (Tanaka et al., 1992 dan Shimada et al., 1997a), esterifikasi selektif minyak ikan (Shimada et al., 1997b), enrichment asam lemak n-3 pada minyak ikan dengan transesterifikasi (Yamane et al., 1992), atau modifikasi minyak nabati dengan menginkorporasikan asam lemak n-3 dari minyak ikan (Huang dan Akoh, 1994; Huang et al., 1994; Akoh et al., 1996, dan Elisabeth et al., 1998).

Umumnya metode yang digunakan dalam sintesis gliserida kaya asam lemak n-3 menggunakan reaksi enzimatik dengan lipase sebagai biokatalisator. Proses enzimatik ini memiliki beberapa keunggulan dibandingkan proses kimia

konvensional, diantaranya penggunaan suhu dan tekanan yang relatif rendah, sehingga kerusakan asam lemak n-3 dapat dicegah.

Lipases (triacylglycerol hydrolases, E.C.3.1.1.3) merupakan enzim yang mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan ester pada trigliserida. Berdasarkan sifat spesifisitasnya, lipase dapat dibedakan atas (i) lipase nonspesifik; (ii) lipase stereospesifik, yang menghidrolisis asam lemak pada posisi tertentu dari trigliserida, dan (iii) tiposelektif, yang menghidrolisis jenis asam lemak tertentu dan tidak tergantung pada posisinya pada molekul trigliserida (Iwai dan Tsujisaka, 1984). Dalam kondisi jumlah air yang terbatas, lipase diketahui juga mengkatalisa reaksi-reaksi sintesis (reaksi pemindahan ataupun pertukaran asam lemak) pada minyak dan lemak.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari sifat spesifisitas beberapa jenis lipase terhadap asam lemak n-3, baik pada reaksi hidrolisis maupun sintesis, untuk memperoleh gliserida kaya asam lemak n-3. Reaksi hidrolisis dilakukan pada minyak ikan tuna, sedangkan reaksi sintesis, yakni asidolisis, dilakukan antara minyak ikan atau minyak sawit dengan konsentrat asam lemak n-3.

METODOLOGI

Bahan

Minyak ikan tuna, yang merupakan *tuna pre-cook oil*, diperoleh dari PT Aneka Tuna, Gempol, Jawa Timur. Dari minyak ikan tuna juga dilakukan isolasi asam lemak n-3 dengan metode kristalisasi urea untuk memperoleh konsentrat asam lemak n-3 (Elisabeth et al., 1994). Minyak sawit yang digunakan adalah minyak sawit merah yang dipreparasi di Pusat Penelitian Kelapa Sawit. Jenis-jenis lipase yang diteliti adalah lipase mikrobial imobil *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) dan *Candida antarctica* (Novozym-435) dari Novo Nordisk Bioindustrial Ltd. (Denmark), *Pseudomonas sp.* dari Sigma Chem. Co., USA, serta lipase nabati yakni dedak padi varietas Merah Munte yang diperoleh dari penggilingan padi di Pancur Batu - Sumut, dan getah pepaya kering dari Sigma Chem. Co., USA.

Reaksi hidrolisis enzimatis

Reaksi hidrolisis dilakukan antara minyak ikan tuna dan air de-ion yang mengandung 1 mM CaCl_2 dengan rasio berat minyak/air 1:2. Sebagai katalis digunakan 5% lipase mikrobial (dari berat substrat campuran) atau 10% dedak padi atau 0.003% lipase *Pseudomonas sp.* Campuran direaksikan pada suhu 30°C dengan pengadukan *magnetic stirrer* 600 rpm selama 24 jam, dan udara dalam bejana digantikan dengan gas N_2 . Pada akhir reaksi dilakukan proses filtrasi atau inaktivasi lipase dengan penambahan aseton/etanol 1:1 (v/v). Fraksi lipida diekstraksi dengan heksana sebanyak 2 kali, dan kemudian pelarut dievaporasi vakum.

Reaksi asidolisis enzimatis

Reaksi asidolisis dilakukan antara minyak tuna atau minyak sawit merah dengan konsentrat asam lemak n-3, menggunakan lipase mikrobial (5% dari berat substrat campuran) atau lipase nabati (10% dari berat substrat campuran) sebagai katalisator. Campuran diinkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam dengan kecepatan pengadukan 300 rpm. Udara dalam bejana digantikan dengan gas N_2 . Pada akhir reaksi, dilakukan proses filtrasi/inaktivasi lipase, ekstraksi fraksi lipida, dan penghilangan asam lemak bebas dengan menggunakan NaOH metanolik 0,5 N. Lapisan atas kemudian dipisahkan dan dievaporasi vakum.

Analisis

Analisis komposisi asam lemak dilakukan setelah proses metilasi sampel dengan BF_3 -metanol (14%b/v), menggunakan asam lemak C17:0 sebagai standar internal dan alat kromatografi gas Perkin Elmer 8420 yang dilengkapi dengan detektor FID dan kolom kapiler DB-225 (30m x 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA). Suhu injektor dan detektor sebesar 260°C, sedangkan suhu oven isothermal 220°C dan tekanan gas H_2 sebagai gas pembawa sebesar 15 psig.

Analisis komposisi lipida dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis pada plat yang dilapisi dengan silika gel 60, dilulusi dengan pelarut petroleum eter/dietil eter/asam asetat (90:10:1 v/v/v), dan visualisasi spot dilakukan dengan

penyemprotan 2',7'-diklorofluoresens 0,2% (b/v) dalam etanol. Masing-masing spot fraksi gliserida dan asam lemak dikerok, diekstraksi dengan pelarut dan kemudian pelarut dievaporasi vakum. Berat masing-masing fraksi ditimbang dan diambil sekitar 15-25 mg untuk dimetilasi dan dianalisis komposisi asam lemaknya.

Komposisi lipida dihitung berdasarkan % berat relatif dari masing-masing ekstrak fraksi gliserida dan asam lemak yang diperoleh. *Recovery* EPA dan DHA pada fraksi trigliserida (TG) dan gliserida produk hasil hidrolisis minyak ikan tuna dihitung berdasarkan kandungan EPA dan DHA awal pada minyak tuna, yakni dengan persamaan $R (\%) = F_h \times WF_h / F_i \times WF_i$, di mana F_h adalah % berat fraksi TG atau gliserida pada produk hasil hidrolisis, WF_h adalah % mol asam lemak pada fraksi TG atau gliserida, F_i adalah % berat fraksi TG pada minyak tuna, dan WF_i adalah % mol asam lemak pada fraksi TG minyak tuna.

HASIL DAN PEMBAHASAN

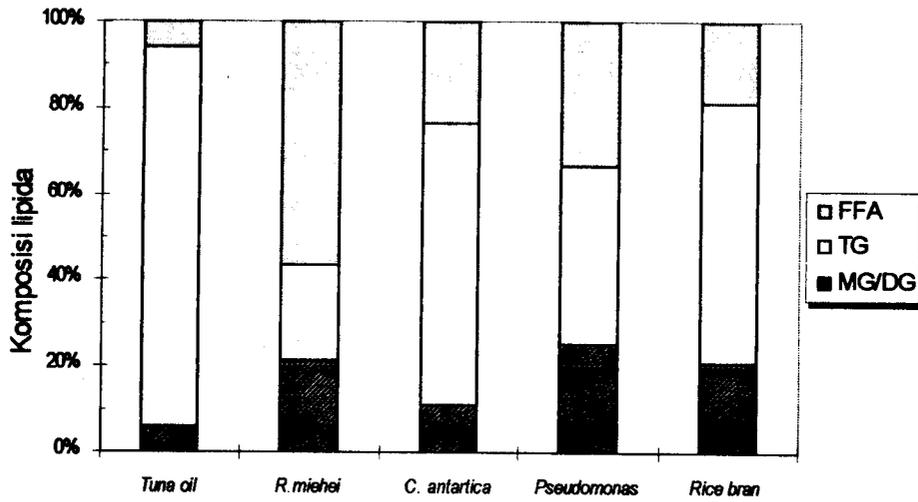
Spesifisitas beberapa lipase terhadap EPA dan DHA pada reaksi hidrolisis

Jumlah asam lemak dan TG pada produk hidrolisis minyak tuna dapat menggambarkan aktivitas hidrolitik masing-masing jenis lipase. Lipase *R. miehei* menunjukkan aktivitas hidrolitik tertinggi dengan kandungan asam lemak bebas sebesar 56.5% dan kandungan trigliserida sebesar 22.0%, diikuti dengan lipase *Pseudomonas sp.* yang mengandung TG sebesar 41.3%, dedak padi 60.0%, dan *C. antarctica* 65.2% (Gambar 1).

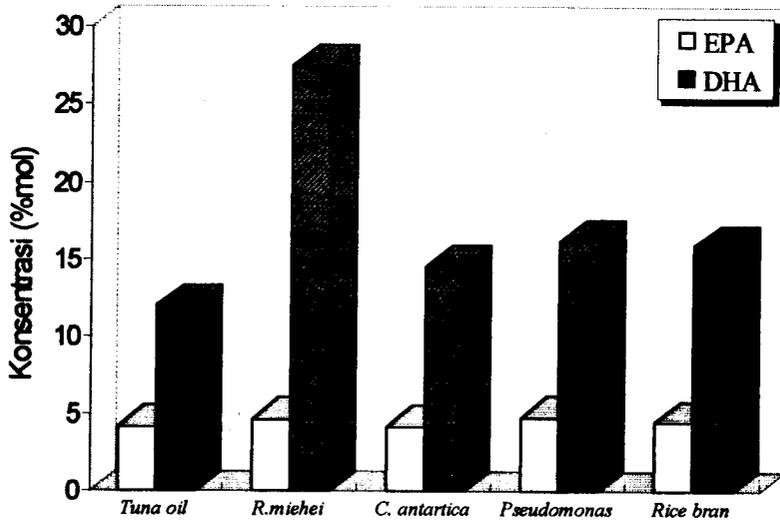
Kandungan EPA dan DHA pada minyak tuna masing-masing adalah 4.2 dan 12.0 %mol. Adapun kandungan EPA dan DHA pada minyak tuna dan produk hidrolisisnya dengan berbagai jenis lipase ditampilkan pada Gambar 2.

Setelah proses hidrolisis, kandungan EPA pada produk hidrolisis tidak mengalami perubahan yang nyata, sedangkan kandungan DHAnya cenderung meningkat. Kandungan DHA tertinggi pada minyak tuna terhidrolisis diperoleh pada penggunaan lipase *R. miehei*, yakni sebesar 27.5 %mol, diikuti dengan *Pseudomonas sp.*, dedak padi, dan *C. antarctica*.

Untuk mempelajari sifat spesifitas lipase yang digunakan lebih lanjut, maka *recovery* EPA dan DHA pada molekul TG dan fraksi gliserida (mono-, di-, dan trigliserida) dihitung berdasarkan kandungan awalnya pada minyak tuna. Seperti yang terlihat pada Tabel 1, maka *recovery* EPA dan DHA pada penggunaan lipase dedak padi mencapai 100% dan lebih dari 60%nya terdapat pada fraksi TG. Hal ini berarti bahwa lipase dedak padi hanya menghidrolisis asam-asam lemak bukan EPA dan DHA, dan aktivitas hidrolitiknya yang relatif rendah disebabkan karena sifat spesifitasnya tersebut. Dapat juga dinyatakan bahwa pengaruh sifat tiposelektif lipase dedak padi terhadap jenis asam lemak lebih besar dibandingkan sifat stereospesifiknya, meskipun hingga saat ini belum ditemukan informasi tentang kedua karakteristik ini.



Gambar 1. Komposisi lipida pada minyak tuna dan produk hidrolisisnya dengan menggunakan beberapa jenis lipase sebagai katalisator.



Gambar 2. Kandungan EPA dan DHA pada minyak tuna dan produk hidrolisisnya dengan menggunakan beberapa jenis lipase sebagai katalisator.



Tabel 1. Recovery EPA and DHA (berdasarkan jumlah mol) pada fraksi TG dan gliserida hasil hidrolisis minyak tuna.

Jenis lipase	Recovery asam lemak n-3 pada fraksi TG (%)		Recovery asam lemak n-3 pada fraksi gliserida (%)	
	EPA	DHA	EPA	DHA
<i>Rhizomucor miehei</i>	35.0	56.8	48.0	80.0
<i>Candida antarctica</i>	63.5	49.8	84.2	73.9
<i>Pseudomonas sp</i>	50.8	32.5	75.1	72.4
Dedak padi	69.2	60.9	100	100

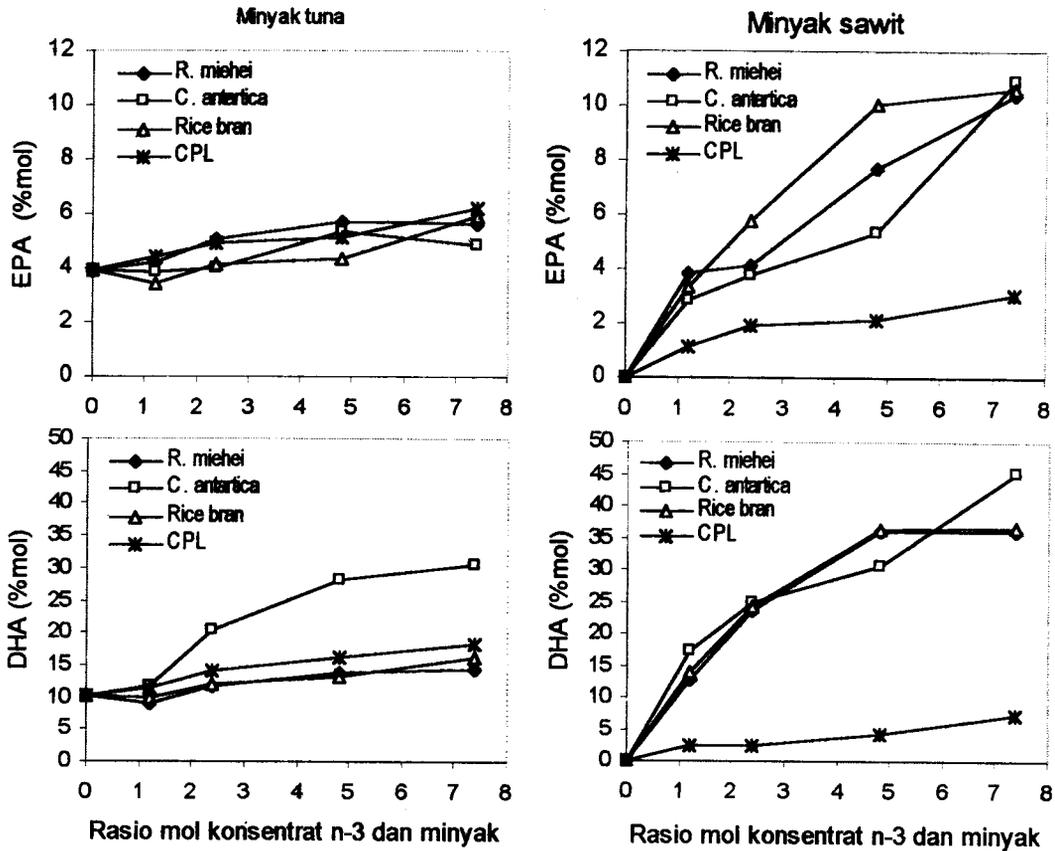
Recovery EPA dan DHA pada fraksi gliserida dengan penggunaan lipase *R. miehei* masing-masing adalah 48.0 dan 80.0%. Dengan aktivitas hidrolitik yang relatif tinggi dan recovery DHA yang tinggi pula maka dapat dinyatakan bahwa lipase *R. miehei* memiliki sifat spesifisitas yang relatif rendah terhadap DHA dan spesifisitasnya terhadap EPA lebih tinggi dibandingkan DHA. Hasil ini memperkuat hasil penelitian Langholz et al. (1989) serta Pedersen and Holmer (1995) yang membuktikan bahwa spesifisitas lipase *R. miehei* terhadap DHA sangat rendah pada reaksi esterifikasi dan hidrolisis.

Telah diketahui bahwa lipase *R. miehei* memiliki sifat stereospesifik sn1,3-. EPA dan DHA pada minyak ikan banyak terdapat pada posisi sn2- dari molekul TG, sehingga EPA dan DHA yang terhidrolisis adalah yang terdapat pada posisi sn1,3-. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa sifat stereospesifik dari lipase *R. miehei* berperan lebih tinggi dalam menghidrolisis asam lemak n-3 pada minyak tuna dibandingkan dengan sifat tiposelektifnya.

Lipase *C. antarctica* dan *Pseudomonas sp.* menunjukkan kemampuan hidrolitik terhadap DHA yang lebih tinggi dibandingkan lipase *R. miehei* dan dedak padi. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa kedua jenis lipase memiliki kemampuan menghidrolisis DHA yang lebih tinggi dibandingkan EPA, karena recovery EPA lebih tinggi dibandingkan DHA. Hal ini menunjukkan sifat spesifisitas yang berbeda dengan lipase *R. miehei* dan membuktikan bahwa tidak semua jenis lipase memiliki sifat spesifisitas yang lebih rendah dengan meningkatnya derajat ketidak-jenuhan asam lemak.

Spesifisitas beberapa lipase terhadap EPA dan DHA pada reaksi asidolisis

Minyak tuna dan minyak sawit digunakan sebagai sumber molekul TG dalam reaksi asidolisis dengan konsentrat asam lemak n-3 untuk melihat pengaruh struktur TG terhadap inkorporasi EPA dan DHA, seperti yang ditampilkan pada Gambar 3. Semua jenis lipase memiliki kemampuan yang hampir sama dalam menginkorporasikan EPA pada minyak ikan, sedangkan tingkat inkorporasi DHA tertinggi diperoleh pada penggunaan lipase *C. antarctica*. Di sisi lain, lipase getah pepaya memiliki aktivitas inkorporasi asam lemak n-3 yang rendah pada minyak sawit, sedangkan lipase *R. miehei* memiliki aktivitas yang hampir sama dengan dedak padi. Tingkat inkorporasi asam lemak n-3 pada minyak sawit lebih tinggi dibandingkan minyak tuna, yang mengindikasikan bahwa bentuk molekul TG dari masing-masing jenis minyak mempengaruhi aktivitas lipase. TG pada minyak tuna lebih kompleks dibandingkan minyak sawit, karena jenis asam lemak yang terdapat pada minyak sawit jauh lebih banyak dengan struktur asam lemak yang juga lebih kompleks.

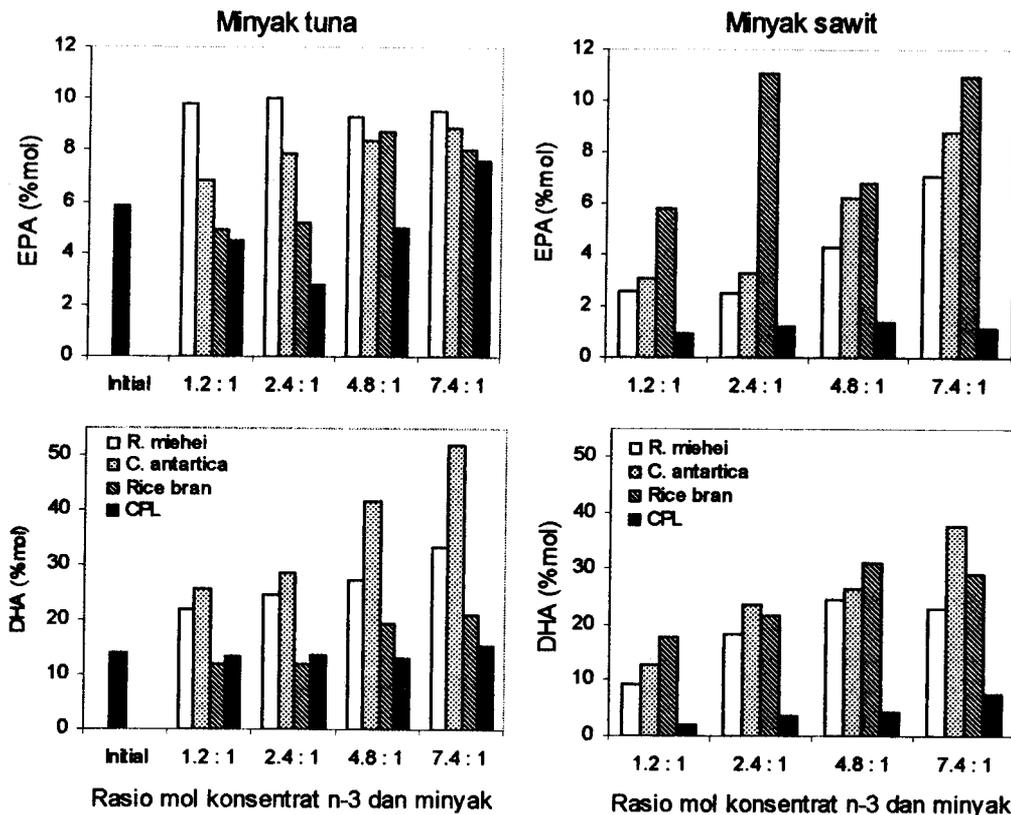


Gambar 3. Pengaruh rasio substrat pada inkorporasi EPA dan DHA pada minyak tuna dan minyak sawit dengan menggunakan beberapa jenis lipase sebagai biokatalisator

Semakin tinggi rasio substrat yang digunakan maka tingkat inkorporasi asam lemak n-3 cenderung meningkat. Tingkat inkorporasi DHA juga lebih tinggi dibandingkan EPA, yang berhubungan dengan jumlah kandungan DHA pada konsentrat asam lemak n-3 yang tinggi dan meningkatkan peluang DHA untuk berinteraksi dengan molekul lipase.

Kandungan DHA pada fraksi MG hasil asidolisis minyak tuna dengan lipase *R. miehei* pada rasio substrat 4.8:1 dan 7.4:1 masing-masing adalah 55 dan 60 %mol dan pada fraksi DG sekitar 50%. Data ini mengindikasikan bahwa lebih separuh dari molekul MG mengandung DHA pada kerangka gliserolnya. Di sisi lain, terdapat 2 kemungkinan tentang kandungan DHA pada fraksi DG, bahwa pada setiap molekul DG terdapat 1 buah DHA atau terdapat molekul DG yang memiliki 2 buah DHA dan molekul DG lain yang tidak mengandung DHA. Adapun kandungan EPA dan DHA pada fraksi TG ditampilkan pada Gambar 4.

Kandungan DHA pada fraksi TG produk asidolisis minyak tuna yang menggunakan lipase *R. miehei* pada tingkat rasio substrat tertinggi adalah 33,3 %mol, sedangkan dengan menggunakan lipase *C. antarctica* mencapai 51,9 %mol. Dengan 3 buah asam lemak yang terdapat pada setiap molekul TG dan kandungan DHA pada fraksi TG tersebut adalah 33,3 %mol, diduga bahwa setiap molekul TG pada produk hasil asidolisis minyak tuna dengan lipase *R. miehei* memiliki 1 buah DHA. Di sisi lain, dengan kandungan DHA sebesar 51,9 %mol pada fraksi TG produk asidolisis minyak tuna dengan lipase *C. antarctica* maka setiap molekul TG ada yang memiliki 2 buah DHA. Demikian pula halnya dengan 50 %mol kandungan DHA pada fraksi DG hasil asidolisis minyak tuna yang memiliki 2 buah molekul asam lemak, diduga bahwa masing-masing molekul DG memiliki 1 buah DHA. Dengan demikian dari hasil penelitian ini dapat dinyatakan bahwa lipase *R. miehei* tidak dapat menginkorporasikan DHA pada molekul-molekul gliserida yang telah memiliki DHA. Fenomena ini juga ditemukan pada lipase dedak padi, tetapi tidak pada lipase *C. Antartica*.



Gambar 4. Kandungan EPA dan DHA pada fraksi TG minyak tuna, produk asidolisis minyak tuna dan minyak sawit menggunakan beberapa jenis lipase dan pada beberapa tingkat rasio substrat.

KESIMPULAN

Lipase dedak padi memiliki aktivitas hidrolitik yang sangat rendah pada minyak ikan dan tidak memiliki kemampuan untuk menghidrolisis EPA dan DHA, sedangkan lipase *R. miehei* menunjukkan kemampuan menghidrolisis DHA yang rendah. Sebaliknya *C. antarctica* dan *Pseudomonas sp.* memiliki kemampuan menghidrolisis DHA yang lebih tinggi dibandingkan EPA.

Sifat spesifisitas lipase terhadap asam lemak berbeda pada reaksi hidrolisis dan transesterifikasi. Lipase *R. miehei*, *C. antarctica*, dan dedak padi menginkorporasikan EPA dan DHA pada minyak sawit yang lebih tinggi dibandingkan minyak ikan, sedangkan aktifitas lipase getah pepaya sangat rendah dalam menginkorporasikan EPA dan DHA pada minyak sawit. Lipase *R. miehei* dan dedak padi tidak memiliki kemampuan untuk menginkorporasikan DHA pada molekul gliserida yang telah memiliki DHA, dan sebaliknya dengan lipase *C. antarctica*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek Penelitian Doktor Baru Batch III tahun 1998/2000.

DAFTAR PUSTAKA

Akoh, C.C., B.H. Jennings, and D.A. Lillard. 1996. Enzymatic modification of evening primrose oil : Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. . J.Am. Oil Chem. Soc., 73(8):1059-1062.

Connor, W.E., M. Neuringer and S. Reisbick. 1992. Essential fatty acid: the importance of n-3 fatty acid in the retina and brain. Nutr. Rev. 50(4): 21-29.

Elisabeth, J., F.G. Winamo, M.A. Wirakartakusumah and D. Fardiaz. 1994. Extraction of omega-3 fatty acids from pre-cook oil, the canned tuna industries by product. Paper on International Seminar on Fisheries, Oceanography and Remote Sensing. Bogor, Indonesia, November 18-19.

- Elisabeth, J., A. Jatmika, K. Sinaga, and H. Sembiring. 1998. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 PUFA into palm oil. Proceeding of International Oil Palm Conference. Bali, September 23-35, 1998.
- Huang, K.H. and C.C Akoh. 1994. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 71(11):1277-1280.
- Huang, K.H., C.C. Akoh and M.C. Erickson. 1994. Enzymatic modification of melon seed oil : Incorporation of eicosapentaenoic acid. J. Agric. Food Chem., 42(11):2646-2648.
- Iwai, M. and Y. Tsujisaka. 1984. Fungal lipase in B. Borgstrom and H.L. Brockman (eds). Lipases. Elsevier, Amsterdam.
- Langholz P., P.Andersen, T. Forskov, and W. Schmidtsdorff. 1989. Application of a specificity of *Mucor miehei* lipase to concentrate docosahexaenoic acid (DHA). J. Am. Oil Chem. Soc., 66(8): 1120-1123.
- Nettleton, J.A. 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? J. Am. Diet. Assoc. 93(1):59-64.
- Pedersen, S.B. and G. Holmer. 1995. Studies of the fatty acid specificity of the lipase from *Rhizomucor miehei* toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. J. Am. Oil Chem. Soc., 72(2):239-243.
- Shimada, Y., K. Maruyama, A. Sugihara, S. Moriyama, and Y. Tomimaga. 1997. Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic method : hydrolysis and selective esterification. J. Am. Oil Chem. Soc., 74(11):1441-1446.
- Shimada, Y., A. Sugihara, H. Nakano, T. Kuramoto, T. Nagao, M. Gemba, and Y. Tomimaga. 1997. Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc., 74(2):97-101.
- Simopoulos, A.P. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary ω -3 and ω -6 fatty acids : Biological effects and nutritional essentials. Am. Ins. of Nutr. 22:521-527.
- Tanaka, Y., J. Hirano, and T. Funada. 1992. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindraceae* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc., 69(12):1210-1214.
- Yamane, T., T. Suzuki, Y. Sahashi, L. Vikersveen, and T. Hoshino. 1992. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil by lipase-catalyzed acidolysis without solvent. J. Am. Oil Chem. Soc., 69(11):1104-1107.