

# PEMISAHAN DAN KRISTALISASI MONOASILGLISEROL KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3 LIMBAH MINYAK IKAN

HERI RISNAYADI MAHMUD<sup>1</sup>, PURWIYATNO HARIYADI<sup>2</sup>, KOMARI<sup>3</sup>, DAN SLAMET BUDIJANTO<sup>2</sup>

## Abstrak

Peran asam lemak omega-3 bagi kesehatan telah banyak diketahui. Salah satu sumber asam lemak omega-3 yang potensial di Indonesia adalah minyak ikan hasil pengolahan/pengalengan (limbah minyak ikan, LMI). Kandungan asam lemak omega-3 LMI dapat ditingkatkan melalui reaksi butanolisis yang mengkonversi triasilgliserol menjadi 2-monoasilgliserol (2-MAG) yang dikatalisis oleh lipase spesifik sn-1,3 karena asam lemak omega-3 terdistribusi lebih banyak pada sn-2 asilgliserol. Hasil reaksi tersebut kemudian dapat dipisahkan secara kromatografi untuk mengambil MAG kaya asam lemak omega-3 dan kristalisasi untuk menurunkan kandungan asam lemak jenuhnya. Hasil butanolisis minyak ikan netral (dengan kandungan total asam lemak omega-3 (TALO) 23,35%) selama 1 jam dalam reaktor *fluidized-bed* kontinyu adalah berupa campuran yang terdiri dari triasilgliserol (TAG) 6,69%, diasilgliserol (DAG) 17,22%, monoasilgliserol (MAG) 11,39%, butil ester (BE) 29,26%, butanol 28,45% dan komponen lain 6,99%. Hasil pemisahan dengan menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) menghasilkan minyak MAG dengan kemurnian MAG 93,21% dan *recovery* MAG 96,99%. Kandungan TALO minyak MAG adalah 42,68% (EPA 29,30% dan DHA 7,82%). *Recovery* TALO proses pemisahan tersebut adalah 36,98%. Hasil kristalisasi minyak MAG pada suhu -20°C, MAG yang terasilasi asam lemak jenuh dapat dipisahkan 44,51% dan kandungan TALO meningkat menjadi 46,26%. Dengan demikian proses butanolisis, pemisahan secara kromatografi dan kristalisasi dapat meningkatkan kandungan asam lemak omega-3 secara signifikan yaitu dari 23,35% menjadi 46,26%.

Kata kunci: butanolisis, monoasilgliserol (MAG), asam lemak omega-3

## PENDAHULUAN

Asam lemak omega-3, khususnya asam lemak rantai panjang (*Eicosapentaenoic acid* atau EPA dan *Docosahexaenoic acid* atau DHA), memegang peranan penting dalam gizi manusia. Asam lemak tersebut dibutuhkan untuk pertumbuhan janin, perkembangan otak dan retina, peningkatan ketebalan dan pencegahan resiko penyakit degeneratif. Konsumsi asam lemak omega-3 dapat meningkatkan profil lemak tubuh dan menurunkan agregasi platelet dengan cara menurunkan *endothelial leukocytes adhesion molecules* (de Caterina and Libby, 1996). Asam lemak omega-3 juga dapat menurunkan resiko, pertumbuhan dan perkembangan metastatik tumor (Zaks dan Akiva, 1998).

Salah satu sumber asam lemak omega-3 khususnya EPA dan DHA adalah minyak ikan dari limbah industri pengolahan ikan yang sangat potensial di Indonesia. Kandungan asam lemak omega-3 dalam minyak ikan tersebut cukup tinggi dan dapat dibuat suatu konsentrat. Produk konsentrat asam lemak omega-3 untuk keperluan pangan dan farmasi yang ada di pasaran umumnya dalam bentuk etil ester, metil ester atau asam lemak yang dienkapsulasi. Dalam bentuk etil ester, penyerapan EPA dan DHA oleh tubuh hanya sekitar 20% (Lawson dan Hughes, 1988). Sedangkan dalam bentuk asam lemak bebas, EPA dan DHA dapat diserap sempurna oleh tubuh (>95%), tetapi pembuatannya sangat sulit dan mudah

<sup>1</sup> Mahasiswa Ilmu Pangan IPB

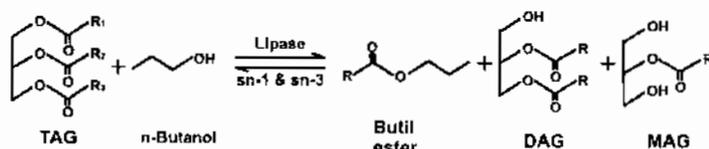
<sup>2</sup> Staf Teknologi Pangan dan Gizi IPB

<sup>3</sup> Staf Puslitbang Gizi Bogor



mengalami oksidasi. Sementara itu, dalam bentuk gliserida terutama dalam bentuk 2-monoasilgliserol (2-MAG), penyerapan EPA dan DHA masing-masing sebesar 68% dan 57%. Oleh karena itu, konsentrasi asam lemak omega-3 khususnya EPA dan DHA dalam bentuk 2-MAG dapat dipertimbangkan sebagai bentuk yang paling baik untuk nutrisi pangan.

Salah satu cara untuk memproduksi 2-MAG dari minyak ikan adalah melalui reaksi transesterifikasi triasilgliserol (TAG) minyak ikan dengan biokatalis enzim lipase spesifik sn-1,3 sehingga akan dihasilkan 2-monoasilgliserol (2-MAG). Reaksi transesterifikasi minyak ikan dapat dilakukan dalam suatu medium alkohol misalnya butanol (Gambar 1).



Gambar 1. Persamaan Reaksi Butanolisis TAG Minyak Ikan untuk Memproduksi 2-MAG Menggunakan Lipase Spesifik sn-1,3

Produk 2-MAG yang dihasilkan dari reaksi butanolisis dengan biokatalis enzim lipase yang spesifik sn-1,3 lebih kaya akan asam lemak omega-3 karena asam lemak omega-3 minyak ikan terdistribusi lebih banyak pada posisi sn-2 dari asilgliserol minyak ikan (Zaks dan Akiva, 1999). Menurut Myher et al. (1996), EPA dan DHA terdistribusi pada sn-2 masing-masing sebesar 6,81% mol dan 43,57% mol, pada sn-1 3,34% mol dan 9,07% mol dan pada sn-3 masing-masing sebesar 11,69% mol dan 39,26% mol.

Jika enzim lipase yang digunakan dalam bentuk terimobilisasi seperti Lpzyme®TL IM, produksi 2-MAG melalui reaksi butanolisis tersebut dapat dilakukan dalam suatu reaktor *packed-bed* atau *fluidized-bed* kontinyu agar produksi 2-MAG lebih efisien. Namun disamping produk 2-MAG dalam reaksi butanolisis tersebut juga dihasilkan DAG, butilester asam lemak bebas dan sisa reaktan yang tidak bereaksi (TAG dan butanol). Oleh karena itu perlu setelah reaksi butanolisis perlu dilakukan suatu proses pemisahan 2-MAG dari produk-produk samping tersebut sehingga diperoleh suatu produk minyak (*oil-based*) 2-MAG murni yang kaya dengan asam lemak omega-3. Pemisahan MAG dari produk-produk samping butanolisis dengan kemurnian tinggi dapat dilakukan antara lain dengan menggunakan kromatografi preparatif.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh suatu cara produksi 2-MAG kaya asam lemak omega-3 dengan kemurnian yang tinggi melalui reaksi butanolisis enzimatik limbah minyak ikan dan memisahkannya dengan cara kromatografi preparatif dengan menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) serta mengkristalkannya untuk memisahkan MAG-jenuh (MAG yang terasilasi asam lemak jenuh).

## METODA PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah minyak ikan (LMI) yang diperoleh dari PT Aneka Tuna Indonesia, Gempol Pasuruan, Jawa Timur. Pada minyak ikan ditambahkan antioksidan 200 ppm BHT/BHA (1/1 b/b). Sedangkan enzim yang digunakan adalah lipase (Lipozyme®TL IM) yang diperoleh dari Novo Nordisk Bioindustrial Ltd., Denmark. Bahan kimia untuk substrat adalah n-butanol (Merck), sedangkan bahan-bahan kimia untuk analisis adalah standar monooleoin, 1,2-diolein, 1,3-diolein, triolein (Mono-, Di- and Triglyceride Mix, Supleco-USA), standar metil ester asam lemak (FAME mix C4-C24, Supleco-USA), standar internal n-heptadekanat (*margaric acid*), heksana, 2-propanol, dietil eter, asam formiat, gas helium, gas nitrogen, BF<sub>3</sub> dalam metanol (14% b/v), NaOH, bentonit, metanol, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat. Sedangkan bahan-bahan untuk kromatografi lapis tipis dan MPLC adalah heksana, dietil eter, metanol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etil asetat, *silica gel 60 for column* dan plat kromatografi lapis tipis.

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat reaktor kontinyu (*fluidized-bed*), timbangan analitik, rotavapor, pompa vakum, sentrifuse, *stirring hot plate*, vortex, kertas saring, *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor *Evaporative Light-Scattering Detection* (ELSD), *Gas Chromatography Flame Ionization Detector* (GC-FID), seperangkat *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) Buchi, lemari pendingin/freezer yang dapat diset suhunya, dan peralatan gelas.

### Netralisasi dan *Bleaching* LMI

Netralisasi LMI dilakukan dengan menggunakan NaOH berdasarkan kadar asamnya. Dari nilai kadar asam tersebut ditentukan jumlah mol asam lemak bebas sebagai DHA (BM 328). Jumlah asam lemak tersebut dinetralkan dengan NaOH 20°Be (1,67 g/10 ml). Selanjutnya minyak disentrifus 3000 rpm selama 10 menit dan diambil fraksi minyaknya. Minyak dijernihkan dengan menambahkan bentonit 8% (b/v) dan disentrifus kembali 3000 rpm selama 10 menit dan diambil fraksi minyaknya.

### Reaksi Butanolisis Dalam Reaktor *Fluidized-bed* Kontinyu

Reaksi butanolisis LMI dilakukan dalam suatu reaktor *fluidized-bed* kontinyu (Gambar 2) yang didisain sedemikian rupa supaya: (1) Aliran substrat *steady state* dimana substrat mengalir dari bagian bawah kolom ke bagian atas kolom secara konstan; (2) Kecepatan alir substrat dapat diatur sehingga *space time* (waktu kontak substrat dengan enzim) dapat diatur; (3) Enzim dapat terfluidisasi secara konstan; dan (4) Suhu reaksi (suhu substrat dalam kolom reaktor) dapat diatur.

Perangkat reaktor *fluidized-bed* kontinyu disiapkan dengan suhu jaket sekitar 65-67°C (untuk suhu reaksi sekitar 60°C). Jumlah enzim Lipozyme®TL IM dalam kolom adalah 6% b/b dari volume kerja substrat 400 ml yaitu 21,36 gram. Substrat LMI-butanol (1:8 mol/mol) dipompakan ke dalam reaktor dengan laju alir 6,67 ml/menit (400 ml/jam) sehingga *space time substrat* kontak dengan enzim adalah 1 jam. Untuk mempertahankan enzim tetap terfluidisasi digunakan aliran gas nitrogen ke dalam kolom reaktor.



## Pemisahan MAG dari LMI Produk Butanolisis

Pemisahan MAG dari LMI produk butanolisis dilakukan dengan menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) Buchi. Kolom MPLC berukuran panjang 46 cm dan diameter dalam 2,5 cm (Gambar 3). Kolom diisi dengan *silica gel 60 for column* sebanyak 150 g yang kemudian dipadatkan (packed). Silika gel sebelumnya telah diaktifkan dengan cara memanaskannya suhu 150°C. Kolom selanjutnya diequilibrasi dengan heksana dan kolom siap digunakan.

Sebanyak 31 g LMI hasil butanolisis *space time* 1 jam diencerkan dengan heksana sampai 150 ml kemudian diaplikasikan ke dalam kolom *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC). Kolom selanjutnya ditiup dengan gas nitrogen untuk mengeluarkan butanol dari LMI (tahap praelusi). Setelah butanol dikeluarkan dari LMI, kolom dielusi dengan pelarut 600 ml heksana/dietil eter 100/0, 90/10, 80/20, 70/30 dan 60/40 (v/v) untuk mengelusi komponen-komponen selain MAG (tahap elusi-1). Selanjutnya kolom dielusi dengan 600 ml dietil eter untuk mengeluarkan MAG (elusi-2). Setelah semua pelarut pada elusi-1 dan elusi-2 diuapkan eluat minyak dianalisis komposisi asilgliserolnya menggunakan HPLC-ELSD (Liu et al., 1993) dan komposisi asam lemaknya dengan GC-FID (AOCS Official Method Ce 1-62, 1990). Untuk memperoleh perlakuan terbaik digunakan uji statistik Rancangan Acak Kelompok (RAK) dimana ulangan sebagai kelompok.

## Kristalisasi MAG

MAG hasil kromatografi terdiri dari campuran MAG yang terasilasi asam lemak jenuh (MAG jenuh) dan MAG yang terasilasi asam lemak tak jenuh (MAG tak jenuh). Pemisahan MAG tak jenuh dapat dilakukan melalui kristalisasi MAG jenuh dalam medium heksana pada suhu (-12°C, -16°C dan -20°C) yang diinkubasi semalam (10 jam) sehingga terbentuk fraksi padatan (kristal) dan fraksi cairan. Fraksi padatan dipisahkan dari fraksi cairan. Pelarut heksana kemudian diuapkan untuk menghasilkan fraksi minyak MAG. Selanjutnya fraksi minyak tersebut dianalisis komposisi asam lemaknya menggunakan GC-FID. Untuk memperoleh perlakuan yang optimal, maka digunakan uji statistik Rancangan Acak Kelompok (RAK) dimana ulangan (sebagai kelompok atau blok dalam RAK).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Netralisasi dan *Bleaching* Limbah Minyak Ikan

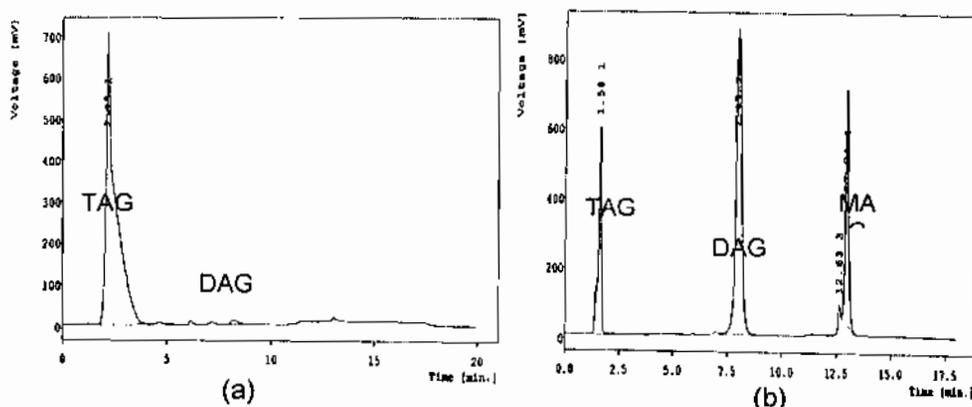
Berdasarkan hasil analisis HPLC-ELSD, komposisi bobot asilgliserol LMI setelah dinetralisasi dan *bleaching* adalah 95,84% (b/b) TAG dan 3,74% (b/b) DAG. Komposisi ini menunjukkan bahwa kandungan TAG yang tinggi untuk dikonversi menjadi MAG. Hasil netralisasi dan *bleaching* 1000 g LMI diperoleh LMI netral dan jernih sebanyak 645 g yang terdiri dari 618,2 g (0,716 mol) TAG dan 24,12 g (0,040 mol) DAG. Dengan demikian *yield* dari proses netralisasi dan *bleaching* ini adalah 64,5%. Komposisi asam lemak omega-3 dalam 645 g LMI netral berdasarkan analisis GC-FID adalah total asam lemak omega-3 dalam 645 g LMI netral berdasarkan analisis GC-FID adalah total asam lemak omega-3 (TALO) 23,35% (150,59 g), EPA 15,98% (103,06 g) dan DHA 3,85% (24,83 g).



## Reaksi Butanolisis LMI

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, lama reaksi butanolisis dalam reaktor *fluidized-bed* kontinu dengan kondisi suhu reaksi 60°C, jumlah enzim lipase Lipozyme® TL IM 6% dari substrat dan perbandingan minyak ikan dan butanol 1:8 (mol/mol) yang optimal dari segi jumlah MAG yang diproduksi dan lamanya waktu operasi adalah 1 jam (*space time* 1 jam). Hasil reaksi butanolisis 645 g LMI netral (1096,5 g substrat setelah ditambah butanol) selama 1 jam tersebut adalah berupa substrat yang terdiri dari DAG 17,22%, MAG 11,39%, butilester 29,26% dan reaktan yang tidak bereaksi TAG 6,69% dan butanol 28,45.

$$\begin{aligned}\text{Konversi TAG menjadi MAG} &= (\text{mol produksi MAG})/(\text{mol TAG yang bereaksi}) \\ &= 0,348/(0,708 - 0,084) = 55,77\%\end{aligned}$$



Gambar 2. Kromatogram HPLC-ELSD LMI Netral sebelum Reaksi Butanolisis (a) dan sesudah Reaksi Butanolisis (b)

## Proses Pemisahan MAG Pada Produk Butanolisis

Untuk memperoleh produk MAG murni, maka MAG dipisahkan dengan menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) dengan kolom yang diisi adsorben silikagel 60. MAG dapat terpisahkan dari produk-produk butanolisis lainnya terutama dikarenakan adanya perbedaan polaritas. MAG yang relatif polar akan tertahan dalam adsorben silika gel ketika produk butanolisis diaplikasikan ke dalam kolom dan dielusi dengan pelarut yang relatif non polar. Selanjutnya MAG dikeluarkan dari kolom dengan dielusi pelarut yang relatif lebih polar. Jumlah produk butanolisis yang diaplikasikan ke dalam kolom MPLC adalah sebanyak 31 g. Dengan demikian untuk memisahkan substrat produk butanolisis sebanyak 1096,5 g diperlukan 35,37 kali ( $\approx 36$  kali) pemisahan.

Berdasarkan hasil analisis komponen asilgliserol pada eluat-2, dapat dikatakan bahwa proses pemisahan MAG tersebut cukup efektif karena nilai *recovery* MAG yang tinggi (lebih dari 90%) dan kemurnian MAG yang tinggi (lebih dari 90%). Perlakuan yang terbaik pada proses pemisahan ini adalah perlakuan elusi pertama heksana-dietileter 80/20 (v/v) (Tabel 1) karena selain menghasilkan eluat-2 berupa MAG dengan kemurnian tertinggi (93,74% b/b) juga *recovery* MAG yang tertinggi



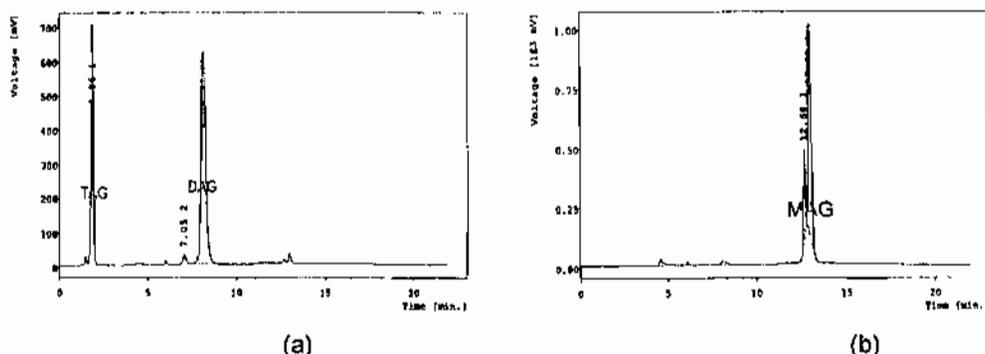
(98,30% b/b) sehingga MAG yang tidak terambil oleh proses pemisahan ini hanya 1,70% saja.

Tabel 1. Jumlah Komponen pada Eluat kedua setelah Perlakuan Komposisi Pelarut Heksana-dietil eter (v/v) pada Elusi Pertama

Heksana/ dietil eter elusi-1	Jumlah minyak (g)	Komposisi dan jumlah komponen pada eluat-2							
		TAG		DAG		MAG		Butil ester dan yang lain (g)	
		(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)
100/0 (v/v)	3,79 b	0,00	0,00 a	9,07	0,345 a	90,58	3,433 b	0,35	0,013 a
90/10 (v/v)	3,80 b	0,00	0,00 a	9,37	0,357 a	90,21	3,427 b	0,41	0,016 a
80/20 (v/v)	3,68 b	0,00	0,00 a	6,73	0,251 a	93,21	3,472 b	0,06	0,002 a
70/30 (v/v)	3,63 b	0,00	0,00 a	7,97	0,290 a	91,13	3,310 b	0,89	0,033 a
60/40 (v/v)	3,36 a	0,00	0,00 a	9,07	0,304 a	90,18	3,025 a	0,75	0,025 a

Huruf yang sama disamping angka massa komponen menunjukkan pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$

Kurva kromatogram HPLC-ELSD eluat-1 dan eluat-2 tampak pada Gambar 3, tampak bahwa TAG dan DAG efektif terpisahkan pada eluat-1 dan MAG terkonsentrasi pada eluat-2.



Gambar 3. Kurva Kromatogram HPLC-ELSD eluat-1 (a) dan eluat-2 (b) Hasil Pemisahan MAG dengan MPLC pada Perlakuan elusi-1 heksana/dietileter 80/20 (v/v).

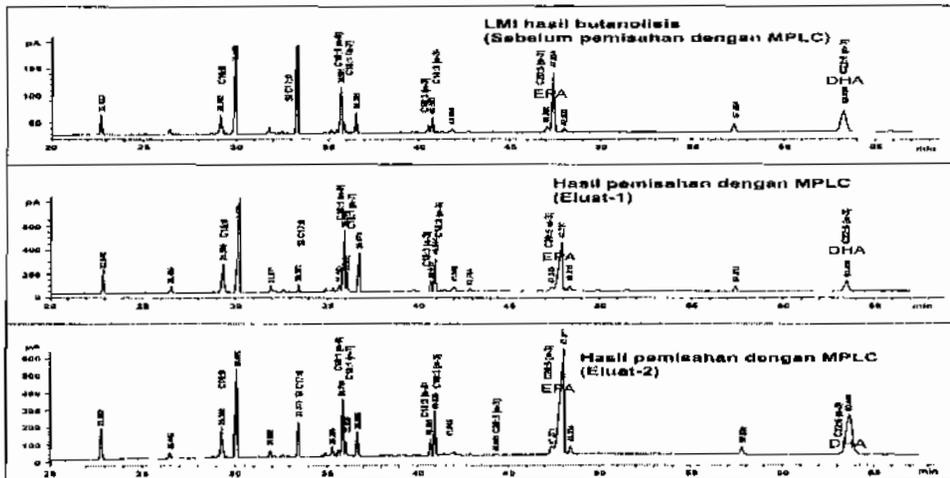
Komposisi heksana-dietil eter 80/20 (v/v) pada elusi pertama mempunyai kekuatan pelarut (*solvent strength*) yang optimal untuk mengelusi sebagian besar komponen non polar (TAG, DAG dan butil ester) tanpa mengelusi komponen yang relatif polar (MAG). Pada komposisi fase gerak yang relatif lebih non polar dari pada heksana-dietil eter 80/20 (v/v) mempunyai *solvent* yang lebih kecil sehingga kurang efektif untuk mengelusi DAG seperti pada perlakuan heksana-dietil eter 100/0 dan 90/10 (v/v) menghasilkan komponen DAG yang tinggi pada eluat-2. Sedangkan pada komposisi fase gerak yang relatif lebih polar dari pada heksana-dietil eter 80/20 (v/v) mempunyai *solvent* yang terlalu besar sehingga MAG ikut terelusi pada eluat-1 dan mengakibatkan kandungan MAG pada eluat-2 berkurang, seperti pada perlakuan heksana-dietil eter 70/30 dan 60/40 (v/v) dimana MAG ikut terelusi pada eluat-1 dan kandungan MAG pada eluat-2 menjadi berkurang.

## Komposisi Asam Lemak Proses Pemisahan MAG

Proses pemisahan MAG dari suatu reaksi butanolisis enzimatis spesifik sn-1,3 dapat menghasilkan 2-MAG, sedangkan asam lemak rantai panjang tak jenuh banyak terdapat pada posisi sn-2 (Zaks dan Akiva,1998; Myher et al., 1996). Berdasarkan analisis GC-FID (Gambar 4), terlihat bahwa pemisahan MAG dengan MPLC dapat meningkatkan komposisi asam lemak tak jenuh dan asam lemak omega-3 khususnya EPA dan DHA (eluat-2). Hal ini menunjukkan bahwa asam-asam lemak rantai panjang khususnya EPA dan DHA terdistribusi lebih banyak pada posisi sn-2. Komposisi asam lemak jenuh (ALJ), asam lemak tak jenuh (ALTJ), total asam lemak omega-3 (TALO), EPA dan DHA produk sebelum dan sesudah pemisahan MAG dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kelompok Asam Lemak pada LMI Butanolisis sebelum dan sesudah Proses Pemisahan MAG dengan MPLC (eluat-1 dan eluat-2).

Kelompok Asam Lemak	LMI butanolisis	Eluat-1	Eluat-2
	(g / 100 g)	(g / 100 g)	(g / 100 g)
ALJ	29,41	38,7	15,8
ALTJ	33,33	30,1	57,7
TALO	19,12	16,0	42,7
EPA	13,09	11,9	29,3
DHA	3,15	2,1	7,8



Gambar 4. Kromatogram GC-FID LMI Hasil Butanolisis sebelum dan sesudah Pemisahan MAG dengan MPLC Buchi (eluat-1 dan eluat-2). Elusi Pertama Menggunakan 600 ml heksana/dietil eter (80/20 v/v), sedangkan Elusi Kedua Menggunakan 600 ml dietil eter.

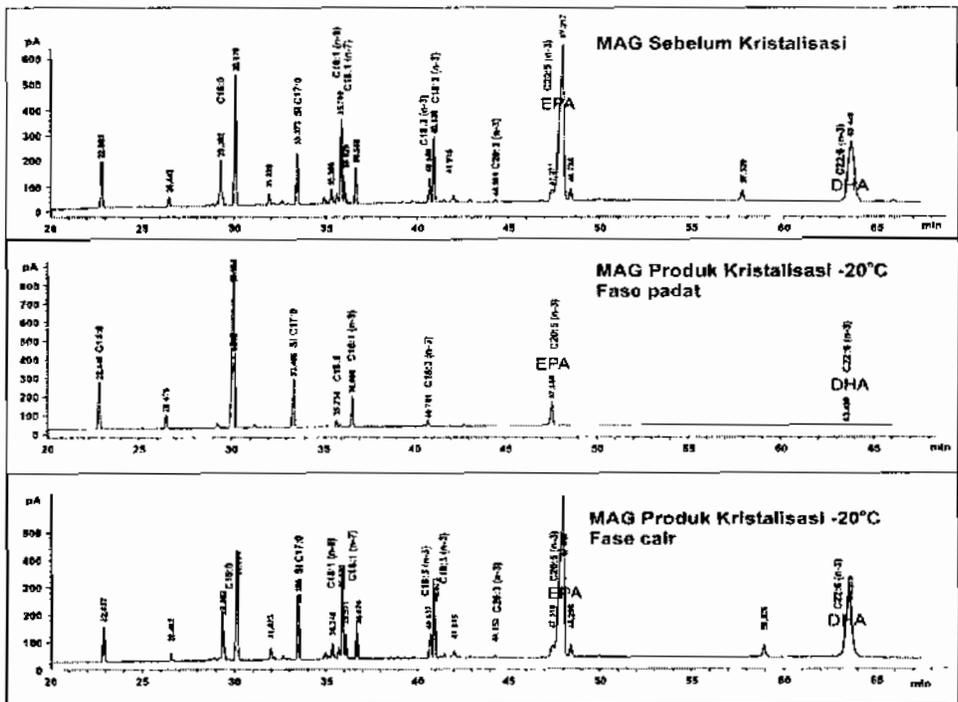
## Kristalisasi MAG

Kristalisasi minyak MAG bertujuan untuk memisahkan MAG jenuh, sehingga diharapkan diperoleh MAG tak jenuh karena kelarutan MAG jenuh dalam heksana



lebih rendah dari pada MAG tak jenuh dan pada suhu rendah MAG jenuh dapat mengkristal. Dari sampel minyak MAG sebanyak 5 g yang dikristalisasi pada suhu -12, -15 dan -20 °C diperoleh fraksi cair berturut-turut 4,87 g (97,48%), 4,78 g (95,53%) dan 4,57 g (91,46%). Berdasarkan analisis GC-FID (Gambar 5 dan Tabel 4), tampak bahwa setelah proses kristalisasi terjadi penurunan asam lemak jenuh pada fraksi cair dari 15,55% menjadi 8,99%-14,71%. Dengan demikian kemampuan untuk memisahkan MAG jenuh melalui proses kristalisasi 6,65-42,91% dari total MAG jenuh sebelum kristalisasi sehingga masih terdapat sisa MAG jenuh dalam produk MAG sebesar 57,09-93,35%. Perlakuan suhu kristalisasi (-12, -16 dan -20°C) menunjukkan perbedaan yang nyata untuk memisahkan MAG-J (Tabel 9), terutama pada suhu -20°C. Hal ini membuktikan bahwa proses kristalisasi dapat memisahkan asam lemak jenuh dari produk MAG, terutama pada suhu yang lebih rendah.

Penurunan ALJ pada produk MAG setelah dikristalisasi berdampak pada peningkatan ALTJ, TALO, EPA dan DHA dimana, suhu kristalisasi -20°C (suhu yang paling rendah) menghasilkan pemisahan yang terbaik karena dapat menurunkan ALJ paling rendah dan meningkatkan ALTJ, TALO, EPA dan DHA paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan suhu kristalisasi -12°C dan -16°C. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa pemisahan kristal MAG jenuh lebih baik dilakukan pada suhu yang rendah. Meskipun secara statistik berbeda nyata kristalisasi minyak MAG pada suhu tersebut masih belum efektif untuk memisahkan sebagian besar MAG jenuh. MAG jenuh yang dapat terpisahkan tertinggi adalah 44,51% dari total MAG jenuh sebelum kristalisasi yaitu pada suhu kristalisasi paling rendah -20°C, sehingga masih terdapat sisa MAG jenuh dalam produk MAG sebesar 55,49 %.



Gambar 5. Kromatogram GC-FID Produk MAG sebelum dan sesudah Kristalisasi - 20°C (Fase Padat dan Fase Cair).



Tabel 4. Pengelompokan Asam Lemak Produk Kristalisasi MAG Fraksi Cair pada Berbagai Suhu Kristalisasi.

Suhu kristalisasi (oC)	Jumlah fraksi cair (g)	Komposisi asam lemak				
		ALJ (g/100 g)	ALTJ (g/100 g)	TALO (g/100 g)	EPA (g/100 g)	DHA (g/100 g)
Kontrol	5,00 b	15,76 b	57,73 a	42,68 a	29,30 a	7,82 a
-12	4,89 b	14,34 b	57,32 a	42,91 a	29,74 b	7,92 a
-16	4,68 ab	14,71 b	59,79 a	44,32 a	30,81 c	8,04a
-20	4,53 a	8,99 a	61,88 a	46,26 a	31,55 d	8,62 b

Keterangan: Kontrol adalah minyak MAG yang tidak dikristalisasi. Huruf yang sama disamping angka menunjukkan pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

### KESIMPULAN DAN SARAN

1. Minyak MAG kaya asam lemak omega-3 dapat diproduksi dari limbah minyak ikan (LMI) melalui reaksi butanolisis enzimatis dengan menggunakan lipase spesifik sn-1,3 karena asam lemak omega-3 terdistribusi lebih banyak pada sn-2 dari asilgliserol minyak ikan. Untuk mendapatkan MAG dengan kemurnian yang tinggi, produk butanolisis dapat dipisahkan menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) dan kristalisasi untuk mengurangi asam lemak jenuh.
2. LMI netral dengan kandungan 95,84% (b/b) TAG dan total asam lemak omega-3 (TALO) 23,35% (EPA 15,98%, DHA 3,85% dan asam lemak omega-3 lain 3,52%) yang direaksikan dengan butanol dengan perbandingan 1/8 (mol/mol) dalam reaktor *fluidized bed* kontinyu dengan volume kerja substrat 400 ml dimana biokatalis yang digunakan adalah lipase Lipozyme® TL IM sebanyak 6% (b/b) substrat, suhu reaksi 60°C, dan *space time* 1 jam menghasilkan produk butanolisis berupa campuran TAG 6,69%, DAG 17,22%, MAG 11,39%, butil ester 29,26%, butanol 28,45% dan komponen lain 6,99%.
3. Komponen MAG dari campuran produk butanolisis tersebut dipisahkan dengan menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) dan adsorben yang digunakan adalah *silica gel 60 for column*. Pemisahan MAG pada tahap praelusi, hampir semua butanol dapat dikeluarkan tetapi sedikit mengelusi fraksi minyak yaitu sebanyak 2,10% dari total produk butanolisis yang diaplikasikan ke kolom MPLC. Pada tahap elusi-1, komponen non MAG (TAG, DAG, dan butilester) secara efektif dapat dipisahkan dengan menggunakan pengelusi 600 ml heksana/dietil eter (100/0, 90/10, dan 80/20 v/v) tanpa mengelusi komponen MAG, sedangkan pada pengelusi heksana/dietil eter 70/30, dan 60/40 (v/v) komponen MAG sedikit terelusi. Pada tahap elusi-2 komponen MAG secara efektif dapat dipisahkan dengan menggunakan 600 ml dietil eter. Hasil terbaik dari proses pemisahan MAG tersebut adalah pada perlakuan pengelusi-1 heksana/dietil eter 80/20 (v/v) karena menghasilkan eluat-2 dengan kemurnian MAG tertinggi (93,21%) dan *recovery* MAG tertinggi (96,99%). Kandungan total asam lemak omega-3 (TALO) produk pemisahan tersebut adalah 42,68% (EPA 29,30%, DHA 7,82% dan asam lemak omega-3 lain 5,57%). *Recovery* TALO proses pemisahan tersebut adalah 36,98% sedangkan *recovery* TALO dari LMI netral adalah 36,83%.
4. Penerapan suhu yang tinggi dan kontak LMI dengan udara dan cahaya selama proses butanolisis dan pemisahan ternyata mengakibatkan tingkat oksidasi



minyak ikan meningkat (bilangan peroksida dan TBA LMI netral 2,95 mg O<sub>2</sub>/100 g dan 1,57 mmol/g, sedangkan produk MAG 4,36 mg O<sub>2</sub>/100 g dan 1,78 mmol/g). Oleh karena itu penggunaan suhu yang lebih rendah dan disain alat yang dapat melindungi minyak ikan dari kontak dengan udara dan cahaya serta penggunaan antioksidan yang tepat diharapkan dapat meminimalkan oksidasi produk MAG yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- American Oil Chemists' Society. 1990. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Champaign, Illinois, USA.
- Bimbo, A.P. 1990. Processing of Fish Oil. Di Dalam Fish Oil in Nutrition. Stansby, M.E., editor. New York : Van Nostrand Reinhold.
- de Catarina, R. dan P. Libby. 1996. Control of Endothelial Leukocyte Adhesion Molecules by Fatty Acids. *Lipid* 31s:57-63.
- Gritter, R.J., J.M. Bobbit, dan A.E. Schwarting. 1991. Pengantar Kromatografi (Terjemahan K. Padmawinata). ITB, Bandung.
- Handaruwati, R.R. 2000. Produksi Fraksi Minyak Ikan Tuna Kaya Asam Lemak Omega-3 Melalui Reaksi Alkoholisis Enzimatik menggunakan Lipase *Rhizomucor miehei*. Thesis. Program Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- Irimescu, R., Y. Iwasaki dan C.T. Hou. 2002. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by Immobilized *Candida antarctica* Lipase and Synthesis of Symmetrically Structured TAG. *JAOCS*, Vol. 79, no. 9:879-883.
- Kelly, D.S., G.J. Nelson, C.M. Serrato P.C. Schmidt and L.B. Branch. 1988. Effect of Type of Dietary Fat on Indices of Immune Status of Rabbits. *J. Nutr.* 118:1376-1384.
- Lawson, L.D. and B.G. Hughes. 1988. Human Absorption of Fish Oil Fatty Acids as Triacylglycerol, Free Fatty Acids or Ethyl Ester. *Biochem. Biophys. Res. Common* 152 (1):328-335.
- Liu, J., T. Lee, E. Bobik Jr., M. Guzman-Harty, dan C. Hastilow. 1993. Quantitative Determination of Monoglycerides and Diglycerides by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-Scattering Detection. *JAOCS* 70:343-347.
- Myher, J.J., A. Kuksis, K. Geher P.W. Park, dan D.A. Diersen-Schade. 1996. Stereospecific Analysis of Triacylglycerols Rich in Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Lipids* 31:207-215.
- Novozymes. 2003. Enzymatic Isteresterification Using Lipozyme® TL IM in Laboratory Scale Batch Reactors. Information Sheet. Oils&Fats/2003-08063-01.pdf.
- Xu, X., T. Porsgaard, H. Zhang, L. Adler-Nissen, dan C.E. Hoy. 2002. Production of Structured Lipids in a Packed-Bed Reactor with *Thermomyces lanuginosa* Lipase. *JAOCS* 79 : 561-565.
- Zaks, A. and G. Akiva T. 1999. Enzymatic Production of Monoglycerides Containing Omega-3 Unsaturated Fatty Acids. United States Patent No. 5,935,828.

