STUDI STABILITAS MINYAK KAPANG *Mucor inaequisporus* M05 II/4 KAYA ASAM GAMMA LINOLENAT SELAMA PENYIMPANAN

(STORAGE STABILITY OF OIL OF *Mucor inaequisporus* M05 II/4 RICH IN GAMMA LINOLENIC ACID)

Slamet Budijanto[1], Lilis Nuraida [1], dan Andries Susanto [2]

[1] Staf pengajar di Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta, IPB
[2] Alumni Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta, IPB

ABSTRACT

Analysis of Mucor inaequisporus M05 II/4 oil stability that was kept at 60C, was done including the values of peroxide, thiobarbituric acid (TBA), total oxydation and the content of gamma linolenic acid. Determination of peroxyde value that was carried out using both the iodometric and ferrythiocyanic methods, resulted in a positive correlation with correlation factor of 0.9727. The linear equation of this correlation was y = 0.0361x + 0.1246, where y was the absorbance value obtained by ferry thiocyanate method and x was the millieguivalent per kg.

During storage from 0 to 9 days, oil kept without the addition of antioxidants showed accelerated peroxyde value that was not accompanied by high TBA value as well as by dramatic decrease of gamma linolenic acid. After 9 days of storage, peroxyde value in the oil appeared to reach the maximum value, which was accompanied by the increase in malonaldehide (MDA) and the decrease of gamma linolenic acid. Similar patterns were observed in oil added with antioxidants, but the increase of the peroxyde value was lesr. The result of antioxidant addition in the oil, showed that the mixture of α-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and lecithin was more effective than α-tocopherol alone. The result of this research revealed that the higher the peroxyde and MDA value, the higher its total oxydation value.

PENDAHULUAN

Masalah penyakit kelebihan gizi banyak mendapat perhatian dari para ahli mengingat adanya perubahan pola konsumsi pangan pada beberapa golongan masyarakat Indonesia. Salah satu dampak yang ditimbulkannya adalah penyakit jantung koroner. Dewasa ini penyakit jantung koroner menempati posisi teratas sebagai penyebab utama kematian.

Salah satu cara yang dianjurkan untuk mengatasi penyakit jantung koroner adalah dengan lebih banyak mengkonsumsi asam lemak tak jenuh ganda karena dapat menurunkan kadar kolesterol dalam serum darah.

Kebanyakan asam lemak tidak jenuh ganda merupakan asam lemak essensial yang sangat dibutuhkan oleh tubuh tetapi tidak dapat disintesis sendiri oleh tubuh sehingga harus disuplai dari makanan sehari-hari.

Terdapat dua golongan asam lemak essensial. Golongan pertama disebut asam alfa linolenat (C19:3 n-3) yang juga dikenal sebagai asam lemak omega-3, dan golongan kedua disebut asam linoleat (C18:2 n-6) atau dikenal sebagai asam lemak omega-6.

Di dalam tubuh manusia, asam linoleat akan diubah menjadi asam γ-linolenat (C18:3 n-6) dengan bantuan enzim δ-6 desaturase (Bajpai dan Bajpai, 1993). Diet yang mengandung asam γ-linolenat telah terbukti dapat meningkatkan kesehatan.

Melalui jalur bioteknologi, asam γ-linolenat dapat diproduksi oleh kapang dari ordo *Mucorales*. Salah satu spesies kapang ordo *Mucorales* yang dapat menghasilkan miselium atau minyak dengan kandungan asam γ-linolenat tinggi adalah *Mucor inaequisporus* M05 II/4 (Nuraida et al., 1995).

Selama masa penyimpanan, minyak yang banyak mengandung asam lemak tidak jenuh mudah mengalami kerusakan oksidatif. Hasil oksidasi primer dari proses oksidasi berupa peroksida yang bersifat reaktif dan labil sehingga mudah mengalami dekomposisi oleh proses polimerisasi atau isomerisasi membentuk persenyawaan aldehida dan asam lemak jenuh dengan berat molekul yang lebih rendah (Ketaren, 1986).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kestabilan minyak kapang *Mucor inaequisporus* M05 II/4 yang kaya kandungan asam γ-linolenat selama penyimpanan.

METODOLOGI

Kultur

Kapang *Mucor inaequisporus* M05 II/4 diperoleh dari badan Penelitian dan Pengembangan Mikrobiologi, LIPI, Bogor.

Metode

Persiapan Inokulum. Kapang ditumbuhkan pada agar miring PDA selama 5-7 hari. Spora kapang kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0.85% sehingga mencapai konsentrasi 10^6-10^7 spora per ml.

Persiapan Medium. Komposisi medium mengacu pada komposisi medium Shaw yang dimodifikasi (1965). Komposisi medium berisi (g/L): molases (setara glukosa 30), dedak padi (10), KH_2PO_4 (5), $MgSO_4.7H_2O$ (2.05). Bahan-bahan tersebut dilarutkan dan pH ditepatkan menjadi 5.0. Sebanyak 100 ml medium ditempatkan pada erlenmeyer 300 ml dan disterilisasi. Setelah dingin, diinokulasikan dengan 1% suspensi spora dan diinkubasikan pada suhu 25°C selama 7 hari dengan kecepatan 150 rpm.

Pemanenan Miselium. Dilakukan dengan menyaring medium dengan bantuan pompa vakum. Padatan yang tersaring dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Selanjutnya padatan kering dihaluskan.

Ekstraksi Minyak. Sejumlah miselium halus dimasukkan dalam gelas piala dan ditambahkan pelarut heksana ke dalamnya. Lalu dihomogenisasi dan filtrat hasil ekstraksi disaring sebanyak 3 kali, sedangkan padatan yang tersaring diekstraksi kembali dengan sejumlah pelarut hingga 3 kali.

Pemurnian Minyak. Sampel minyak dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan arang aktif 2% (b/b). Tutup karet erlenmeyer diberi 2 lubang pipa dimana salah satu lubang pipa dihubungkan dengan gas N_2, dipanaskan selama 1 jam dan akhirnya disaring.

Penyimpanan Minyak. Minyak yang telah dimurnikan dibagi menjadi 3 bagian. Bagian pertama tidak diberi penambahan antioksidan. Bagian kedua diberi penambahan α-tokoferol 200 ppm. Bagian ketiga diberi penambahan campuran α-tokoferol 0.1% (b/b), asam askorbat 0.02% (b/b), asam sitrat 0.02% (b/b), lesitin 0.2% (b/b). Ketiga bagian minyak tersebut disimpan pada suhu 60°C.

Pengamatan

Kadar Air (AOAC, 1984). Cawan kosong yang telah diketahui beratnya diisi dengan sejumlah sampel dan dikeringkan pada suhu 105°C. Setelah 5 jam, cawan yang berisi sampel ditimbang.

Kadar Lemak (AOAC, 1984). Sejumlah sampel yang terbungkus dalam kertas saring dimasukkan ke dalam labu lemak yang telah diketahui beratnya. Kemudian diletakkan pada alat ekstraksi Soxhlet dan direfluks. Setelah 5 jam, pelarut yang ada dalam labu lemak didistilasi. Selanjutnya labu lemak berisi lemak hasil ekstraksi dipanaskan pada suhu 105°C. Berat labu lemak ditimbang hingga konstan.

Bilangan Peroksida (Metode Ferri Tiosianat) (Mitsuda et al., 1966). Sebanyak 50 µL sampel minyak dilarutkan dalam 2.35 ml alkohol 75%, dan ditambahkan 50 µL NH4SCN 30% dan 50 µL $FeCL_2$ dalam HCl 3.5 mM. Selang 3 menit, diukur absorbansi pada λ= 500 nm.

Bilangan Peroksida (Metode Iodometri) (AOAC, 1984). Sebanyak 5 gram sampel dilarutkan dalam 30 ml pelarut (asam asetat glasial : kloroform = 60% : 40%). Ditambahkan 0.5 ml KI jenuh dan didiamkan di ruang gelap. Lalu ditambah 30 ml air destilata dan kelebihan iod dititrasi dengan natrium tiosulfat. Dibuat pula penetapan blanko.

Penentuan Korelasi Bilangan Peroksida antara Metode Ferri Tiosianat dan Metode Iodometeri. Beberapa sampel minyak goreng diukur secara duplo dengan menggunakan metode ferri tiosianat dan metode iodometri.

Bilangan Asam Tiobarbiturat (AOAC, 1990). Sebanyak 50-200 mg sampel diencerkan hingga 25 ml dengan 1-butanol. Kemudian 5 ml campuran tadi ditambah 5 ml larutan TBA 200 mg/100 ml 1-butanol. Dipanaskan pada suhu 90°C selama 2 jam. Setelah dingin, diukur absorbansi pada λ= 532 nm.

Bilangan Total Oksidasi. Dihitung dari 2 X bilangan peroksida + bilangan TBA.

Analisis Asam Lemak. Sebelum dianalisa dengan kromatografi gas, asam lemak pada minyak kapang dimetilasi dulu. Asam margarat (C17:0) digunakan untuk menghitung recovery ekstraksi dan ditambahkan sebagai standar internal. Asam lemak dimetilasi dengan larutan BF_3 - metanol (IUPAC, 1987 metode no. 2.301). Turunan metil ester dari asam lemak dipisahkan menggunakan kromatografi gas dengan kolom kapiler Carbowax 20M (30m, 0.25 mm i.d.), temperatur terprogram (140C selama 20 menit, 140 - 230°C dengan kenaikan 3°C per menit), detektor FID, dan gas carrier He. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan pola pemisahan dengan senyawa standar (GLC Reference Standard No. 411 d an 74X, NuCheck Prep., Inc., USA) berdasarkan nilai-nilai RRT (*relative retention time*) dan ECL (*equivalent chain length*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Miselium Kapang dan Minyaknya.

Miselium kapang yang diperoleh mempunyai kadar air sebesar 4.19% dan kadar lemak 10.48%. Komposisi asam lemak pada miselium kapang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Asam Lemak Miselium Kapang

AsamLemak	Persentase	Konsentrasi (mg/g)
C14:0	0.80	6.50
C16:0	18.55	150.44
C16:1	0.53	4.32
C18:0	4.01	33.09
C18:1	41.63	337.86
C18:2	19.67	159.60
C18:3	9.47	76.83
C18:3	0.55	4.45
C20:0	0.55	4.44
C20:1	0.52	4.19
C22:0	0.40	3.26

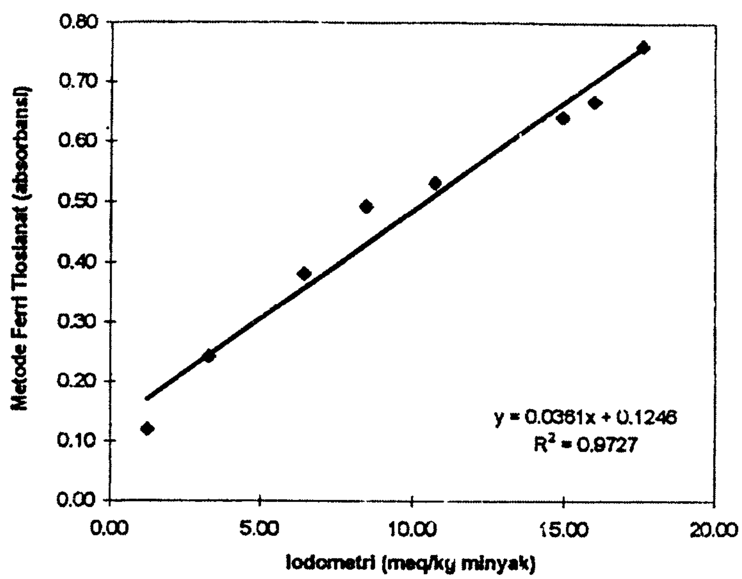
Berdasarkan Tabel 1, persentase asam γ-linolenat sekitar 9.47% dengan konsentrasi sekitar 76.83% mg/g. Kadar asam γ-linolenat ini lebih tinggi dibandingkan dengan minyak *evening primrose* komersial dari Sigma yang mengandung 60 mg/g.

Selanjutnya miselium yang diperoleh diekstraksi dengan pelarut heksana. Keuntungan penggunaan heksana adalah sifatnya yang mudah menguap sehingga mudah dihilangkan dari minyak, tidak meninggalkan residu yang berbahaya, bersifat *food grade*, dan *immiscible* dengan air. Sedangkan kekurangannya, heksana mudah sekali terbakar (Weiss, 1983).

Hubungan Metode Ferri Tiosianat dan Metode Iodometri

Penentuan bilangan peroksida dapat ditentukan dengan metode ferri tiosianat dan metode iodometri. Prinsip dari metode ferri tiosianat adalah pembentukan warna merah dari kompleks ferri tiosianat. Adanya peroksida, ion ferro akan teroksidasi menjadi ion ferri dan ion ferri yang terbentuk akan berikatan dengan ion tiosianat membentuk kompleks ferri tiosianat. Prinsip metode iodometri adalah jumlah iodin yang ibebaskan setelah minyak ditambahkan KI dan iodin yang bebas ini dititrasi dengan natrium tiosulfat.

Terdapat hubungan linier antara metode iodometri dan metode ferri tiosianat. Hal ini terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan Metode Iodometri dan Metode Ferri Tiosianat

Dengan adanya hubungan linier tersebut, maka nilai-nilai absorbansi yang diperoleh dari metode ferri tiosianat dapat diinterpretasikan ke dalam bentuk meq/kg minyak. Meskipun sampel minyak tersedia sedikit tetapi dapat ditentukan bilangan perosidanya dalam bentuk meq/kg minyak.

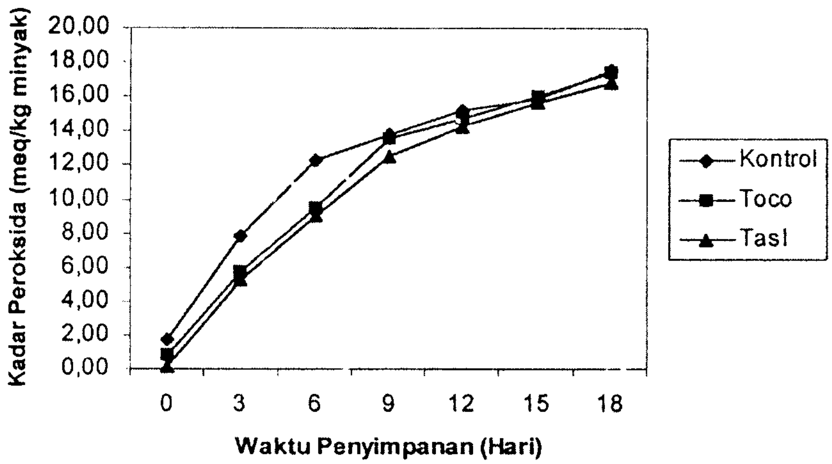
Pemurnian Minyak

Sebelum proses penyimpanan dimulai, minyak kapang dimurnikan terlebih dahulu untuk menurunkan kadar peroksida dalam minyak kapang. Sebelum dimurnikan kadar peroksida mencapai nilai absorbansi sebesar 0.421 atau sekitar 8.21 meq/kg dan setelah dimurnikan nilai absorbansinya turun menjadi 0.128 atau 0.094 meq/kg.

Analisa Stabilitas Minyak

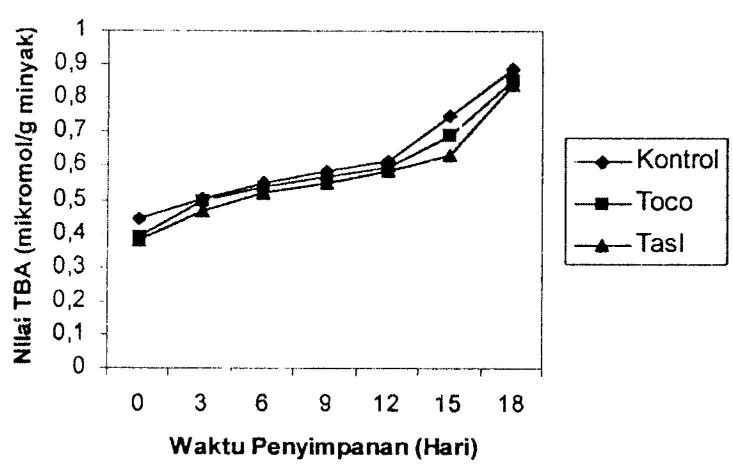
Analisa stabilitas minyak yang dilakukan meliputi penentuan bilangan peroksida, bilangan TBA, bilangan total oksidasi, dan kadar asam linolenat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan 0 hari hingga 9 hari, pada minyak yang tidak diberi penambahan antioksidan terjadi laju kenaikan kadar peroksida yang cukup tinggi namun laju kenaikan malonaldehida dan laju penurunan persentase asam γ-linolenat cukup rendah. Pada saat melewati penyimpanan 9 hari hingga 18 hari, laju kenaikan kadar malonaldehida maupun laju penurunan persentase asam γ-linolenat dikatakan cukup tinggi. Hal ini dikarenakan pada saat yang sama laju kenaikan kadar peroksida mulai terlihat konstan dan hal ini dimungkinkan bahwa kadar peroksida pada minyak kapang sudah mencapai taraf maksimum. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2, 3, dan 4.



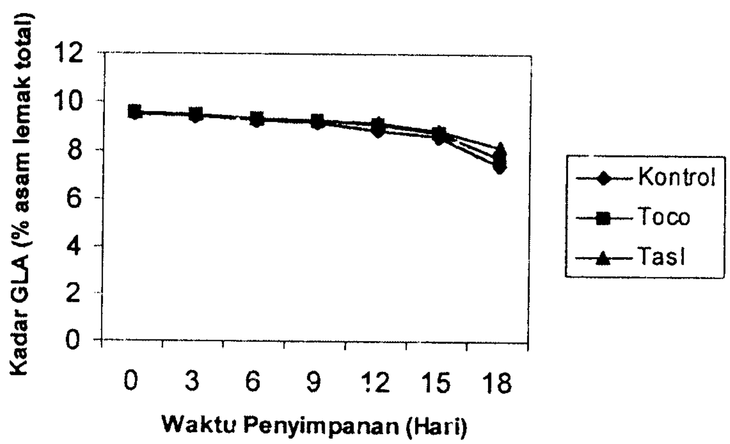
Keterangan :
kontrol = minyak tanpa penambahan antioksidan
toco = minyak diberi tokoferol 200 ppm
tasl = minyak diberi campuran tokoferol 0.1% (b/b), asam askorbat 0.02% (b/b), asam sitrat 0.02% (b/b), dan lesitin 0.2% (b/b).

Gambar 2. Grafik kadar peroksida selama penyimpanan pada suhu 60°C



Keterangan:
kontrol = minyak tanpa penambahan antioksidan
toco = minyak diberi tokoferol 200 ppm
tasl = minyak diberi campuran tokoferol 0.1% (b/b), asam askorbat 0.02% (b/b), asam sitrat 0.02% (b/b), dan lesitin 0.2% (b/b).

Gambar 3. Kadar malonaldehida selama penyimpanan suhu 60°C



Keterangan:
kontrol = minyak tanpa penambahan antioksidan
toco = minyak diberi tokoferol 200 ppm
tasl = minyak diberi campuran tokoferol 0.1% (b/b), asam askorbat 0.02% (b/b), asam sitrat 0.02% (b/b), dan lesitin 0.2% (b/b).

Gambar 4. Persentase asam linolenat selama penyimpanan suhu 60°C

Semakin tinggi kadar peroksida dan malonaldehida, maka bilangan total oksidasi yang diperoleh akan semakin tinggi pula.

Hal yang sama juga terjadi pada minyak yang diberi penambahan antioksidan α-tokoferol 200 ppm ataupun campuran α-tokoferol 0,1% (b/b), asam askorbat 0.02% (b/b), asam sitrat 0.02% (b/b), dan lesitin 0.2% (b/b). Namun dengan adanya penambahan antioksidan, laju kenaikan peroksida lebih rendah dibandingkan dengan minyak tanpa antioksidan.

Dilihat dari penambahan antioksidan maka campuran α-tokoferol 0.1% (b/b), asam askorbat 0.02% (b/b), asam sitrat 0.02% (b/b), dan lesitin 0.2% (b/b) lebih efektif dalam menghambat terjadinya oksidasi dibandingkan dengan penambahan α-tokoferol saja. Hal ini dikarenakan adanya efek sinergisme antara α-tokoferol dengan asam sitrat.

KESIMPULAN

Stabilitas minyak kapang sangat dipengaruhi oleh kandungan asam γ-linolenat yang sangat mudah teroksidasi selama penyimpanan. Semakin lama penyimpanan, maka kadar peroksida akan semakin tinggi dan pada suatu saat akan mencapai maksimum. Demikian juga halnya dengan malonaldehida yang semakin tinggi dan persentase asam gamma linolenat yang semakin menurun.

Penambahan antioksidan dapat menghambat dan atau memperlambat terjadinya suatu proses oksidasi.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 14th ed. AOAC, Inc., Washington.

AOCS. 1990. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 14th ed., Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Illinois.

Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati, dan S. Budijanto. 1988. Analisis Pangan. IPB, Bogor.

Bajpai, P. dan P. K. Bajpai. 1993. Eicosapentaenoic acid production from microorganism : a review. J. of Biotechnol. 30:161 183.

IUPAC. 1987. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, Commission on Oils, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.

Ketaren, S. 1986. Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan. UI Press, Jakarta.

Nuraida, L., N.L. Puspitasari, Winarno, G.A. Swandoko, dan F. Kusnandar. 1995. Pengaruh asam γ-linolenat oleh kapang *Mucor inaequisporus* M05 II/4. Bul. Teknol. dan Industri Pangan. Vol. VI no. 3.

Nuraida, L., N.L. Puspitasari, Winarno, G.A, Swandoko, dan A. Rahman. 1996. Pengaruh kondisi fermentasi terhadap produksi minyak kapang *Mucor inaequisporus* M05 II/4. Bul. Teknol. dan Industri Pangan. Vol. VII no. 1.

Ratledge, C. 1988. Biotechnology of oil and fats. Di dalam Ratledge, C. dan S.G. Wilkinson (Eds). Microbial Lipids. Vol. 2. Academic Press, London.

Shaw, R. 1965. The occurance of γ-linolenic acid in fungi. Biochemical at Biophysica Acta 98: 230-237.

Weiss, T.J. 1983. Food Oils and Their Uses. AVI Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut.