

## INTERESTERIFIKASI ENZIMATIS MINYAK IKAN DENGAN ASAM LAURAT UNTUK SINTESIS LIPID TERSTRUKTUR

[Enzymatic Interesterification of Fish Oil with Lauric Acid for the Synthesis of Structured Lipid]

Edy Subroto<sup>1)</sup>, Chusnul Hidayat<sup>2)</sup>, dan Supriyadi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta 55281

<sup>2)</sup> Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian UGM, Yogyakarta 55281

Diterima 25 Agustus 2008 / Disetujui 17 Desember 2008

### ABSTRACT

Structured lipid (SL) containing of medium chain fatty acid (MCFA) at outer position and polyunsaturated fatty acid (PUFA) at sn-2 position has superior dietary and absorption characteristics. The most methods for the enzymatic synthesis of SL were through two steps process, so that it was inefficient. Caprylic acid was usually used as a source of MCFA. In this research, SL was synthesized by enzymatic interesterification between fish oil and lauric acid. The specific lipase from *Mucor miehei* was used as catalyzed. Factors, such as the incubation time, substrate mole ratio, and reaction temperature were evaluated. The incorporation and the position of lauric acid on glycerol backbone and glyceride profile were determined.

The results showed that SL containing of lauric acid at the outer position and PUFA at sn-2 was successfully synthesized, and it was done through one step process. From regiospecific determination, it showed that the position of lauric acid incorporation was only at the sn-1 and sn-3. Only 0.87% of lauric acid was incorporated at the sn-2. The optimum time and temperature of the reaction, and the substrate mole ratio were 12 h, 50 °C and 1:10, respectively, in which the incorporation of lauric acid was 62.8% (mol). Glyceride profile was affected by incubation time, substrate mole ratio and reaction temperature. Triglyceride concentration decreased with an increase in the incubation time (> 12 h). In contrast, the diglyceride concentration increased at longer incubation time (> 12 h). Beside, triglyceride concentration increased with an increase in substrate mole ratio to 1:10, but it decreased when mole ratio of substrate was 1:15. At higher temperature (50 °C), triglyceride decreased with an increase in the reaction temperature. In summary, the SL was successfully synthesized by the interesterification of fish oil and lauric acid using specific lipase of *Mucor miehei*.

**Key words :** *Intesterification, fish oil, lauric acid, structured lipids, lipase*

### PENDAHULUAN

Sintesis lipid terstruktur (SL) dengan memodifikasi susunan asam lemak pada *backbone* lipid telah berkembang pesat dalam satu dekade ini. Hal ini dilakukan terutama untuk meningkatkan sifat fungsional dan nutrisi suatu lemak atau minyak. SL dengan asam lemak rantai medium (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) pada posisi luar dan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada posisi sn-2 memiliki nilai gizi dan absorpsi yang sangat baik (Irimescu *et al.* 2001b). Residu MCFA dengan mudah terhidrolisis di dalam saluran pencernaan menghasilkan asam lemak yang diabsorpsi dengan cepat dan digunakan sebagai sumber energi yang tinggi di dalam tubuh. PUFA terabsorpsi sebagai 2-mono gliserida (2-MG) yang paling siap diabsorpsi diantara senyawa turunan PUFA. SL dengan residu jenuh pada posisi luar dan PUFA pada posisi sn-2 juga lebih tahan terhadap oksidasi (Endo *et al.* 1997).

SL dapat disintesis dengan interesterifikasi lipid baik secara ezimatis maupun kimia, tetapi metode enzimatik lebih diutamakan karena enzim memiliki aktivitas biokatalitik yang tinggi dan spesifik. Penggunaan enzim sebagai katalis juga lebih ramah lingkungan dibandingkan secara kimiawi karena limbah dari bahan kimia umumnya berbahaya bagi lingkungan (Akoh, 2002).

Berbagai metode sintesis lipid terstruktur spesifik secara enzimatik telah dilakukan diantaranya melalui pembentukan triasilgliserol (TAG) dari gliserol dan asam lemak (antara lain PUFA) yang dilanjutkan asidolisis dengan asam lemak tertentu, antara lain MCFA menggunakan lipase spesifik-1,3 (Kawashima *et al.* 2001). Sintesis lipid terstruktur spesifik juga telah diteliti dengan melakukan etanolisis pada minyak ikan untuk memperoleh 2-MG yang dilanjutkan dengan esterifikasi dengan asam kaprilat secara enzimatik sehingga diperoleh SL dengan asam kaprilat pada posisi luar dan PUFA pada posisi sn-2 (Irimescu *et al.* 2001b), tetapi proses tersebut kurang ekonomis dan perlu pengendalian proses yang lebih intensif.

Selama ini sintesis SL yang mengandung PUFA dan MCFA umumnya menggunakan asam kaprilat sebagai sumber MCFA dan dilakukan dengan dua tahap. Pada penelitian ini, sintesis SL dilakukan dengan metode interesterifikasi (asidolisis) antara minyak ikan dengan asam laurat yang dikatalisis lipase *Mucor miehei* yang bersifat spesifik 1,3 dalam satu tahap reaksi. Diharapkan bahwa asam laurat hanya akan menempati posisi 1,3 dari kerangka gliserol minyak ikan sedangkan PUFA tetap tertinggal dan berada pada posisi sn-2. Asam laurat dipilih karena banyak terdapat di Indonesia, khususnya dari minyak kelapa.

Pengkajian dilakukan terhadap waktu reaksi, rasio substrat (minyak ikan : asam laurat) dan suhu reaksi sehingga diperoleh waktu reaksi dan kondisi proses yang optimal untuk sintesis SL secara enzimatis dengan lipase *Mucor miehei*. Keberhasilan sintesis SL ditentukan oleh banyaknya inkorporasi asam laurat pada minyak ikan dan dalam hal ini diharapkan inkorporasi laurat terjadi pada posisi sn-1 dan sn-3 dari kerangka gliserol.

## METODOLOGI

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah minyak ikan komersial (Prince Gold® Alaska Deep Sea Fish Oil) dan asam laurat dari Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Enzim yang digunakan adalah lipase teramobil dari *Mucor miehei* (Lipozyme®) dan lipase *Candida antarctica* teramobil (Lipozyme) dari Novo Nordisk Denmark. Pelarut organik yang digunakan antara lain heksana, aseton, etanol, petroleum eter, dietil eter, dan asam asetat yang dibeli dari Merck KGaA (Darmstadt, German). Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain KOH dan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, baik pelarut maupun bahan kimia memiliki spesifikasi *analytical grade* yang diperoleh dari Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

### Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai waktu reaksi

Interesterifikasi minyak ikan dengan asam laurat dilakukan mengacu pada metode Yankah dan Akoh (2000), serta Haman dan Shahidi (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 1.43 g minyak ikan dan 4 g asam laurat dengan rasio molar minyak ikan : asam laurat 1:10 dimasukkan kedalam erlenmeyer, lalu ditambahkan 0.54 g lipozyme® (10 % dari substrat) dan 8.1 ml heksana. Campuran diinkubasi dalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 40 °C sesuai dengan waktu yang ditetapkan (2, 4, 6, 12, 24, dan 48 jam). Larutan hasil reaksi disaring dengan kertas saring untuk memisahkan lipase teramobil. Filtrat ditambah 20 ml campuran etanol dan aseton dengan rasio 1:1 (v/v). Selanjutnya, larutan tersebut dititrisi dengan 0.5 M larutan KOH dengan indikator *phenolphthalein* (PP) sampai warna larutan menjadi merah jambu. Heksana (35 ml) ditambahkan ke dalam larutan untuk mengekstrak asilgliserol. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat ditambahkan ke dalam lapisan fraksi heksana untuk menghilangkan sisa air dan selanjutnya dievaporasi untuk menguapkan heksana, etanol, dan aseton sehingga diperoleh komponen asilgliserol (SL) yang digunakan untuk keperluan analisis.

### Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai rasio substrat

Interesterifikasi dilakukan pada berbagai rasio molar minyak : asam laurat (1:2; 1:5; 1:10; dan 1:15) untuk mengetahui pengaruh rasio molar substrat terhadap efisiensi inkorporasi dan profil gliserida yang diperoleh. Reaksi

dilakukan dalam erlenmeyer tertutup yang diinkubasikan dalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 40 °C selama 12 jam. Larutan hasil reaksi selanjutnya diperlakukan seperti pada prosedur interesterifikasi enzimatis pada berbagai waktu reaksi. Pengukuran pH dengan pH-meter dilakukan untuk mengetahui tingkat keasaman substrat.

### Interesterifikasi enzimatis minyak ikan dengan asam laurat pada berbagai suhu reaksi

Rasio molar substrat yang optimal kemudian digunakan untuk mengkaji pengaruh suhu reaksi dengan variasi suhu 30, 40, 50, 60, dan 70 °C. Minyak ikan (1.43 g) ditambahkan ke dalam 4 gram asam laurat (rasio molar minyak ikan : asam laurat 1:10) di dalam erlenmeyer. Sebanyak 0.54 g lipozyme® (10 % dari substrat) dan 8.1 ml heksana (1.5 kali berat substrat) ditambahkan ke dalam substrat, kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada berbagai suhu dengan kecepatan 120 rpm selama 12 jam. Larutan hasil reaksi selanjutnya diperlakukan seperti pada prosedur interesterifikasi enzimatis pada berbagai waktu reaksi.

### Analisis profil gliserida dengan kromatografi lapis tipis (TLC)

TLC *Plate Silica Gel GF 254* diaktifkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Sebagai larutan pengembang digunakan campuran petroleum eter : dietil eter : asam asetat (60:40:1). Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan TLC *Scanner CAMAG II* pada panjang gelombang 350 nm.

### Preparasi *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) dan analisis penentuan inkorporasi asam laurat

Preparasi FAME dilakukan sesuai dengan metode Park dan Goins (1994). Sebanyak 200 µl lipid terstruktur dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 50 µl (konsentrasi 0.1 g/ml) internal standar asam heptadekanoat, 100 µl metilen klorida dan 1 ml NaOH 0.5 N dalam metanol. Gas nitrogen diberikan ke dalam tabung sebelum dipanaskan pada suhu 90 °C selama 10 menit. Setelah dingin ditambah 1 ml BF<sub>3</sub> 14 % dalam metanol, kemudian dipanaskan lagi selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 1 ml aquades dan 200-500 µl heksana dan dicampur menggunakan vorteks untuk mengekstrak metil ester asam lemak. Fraksi heksana merupakan FAME dan siap untuk dianalisis dengan kromatografi gas (GC).

GC yang digunakan dilengkapi dengan kolom HP 5 (5 % Phenyl Methyl Siloxone) panjang 30 m. Temperatur kolom mula-mula 180°C ditahan selama 2 menit kemudian dinaikkan 10 °C/menit sampai suhu mencapai 280 °C. Temperatur injektor 280 °C dan detektor yang digunakan adalah FID dengan suhu 300 °C. Gas helium digunakan sebagai gas pembawa dengan aliran 10 ml/menit.

### Analisis distribusi posisi asam lemak dengan Etanolisis Lipase *Candida antarctica*

Distribusi posisi asam lemak pada SL dilakukan sesuai dengan metode Irimescu *et al.* (2001b; 2002). Sebanyak 0.5 g minyak ikan atau lipid terstruktur dilarutkan dalam 2 g etanol dan ditambah 0.2 g lipase *Candida antarctica*, kemudian diinkubasi pada 30 °C selama 3 jam. Larutan hasil reaksi dianalisa menggunakan TLC plate silica gel GF 254. Campuran kloroform : aseton (98:2) digunakan sebagai larutan pengembang dan visualisasi dilakukan dengan penyinaran pada panjang gelombang 254 nm. Spot yang sesuai untuk 2-MG diambil dan dilarutkan dalam heksana. Fraksi heksana digunakan untuk derivatisasi menjadi asam lemak metil ester untuk selanjutnya dianalisis dengan GC.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakterisasi minyak ikan

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa kadar air minyak ikan sangat rendah (0.05 %) dan angka peroksida juga cukup rendah dibandingkan dengan standar FAO/WHO/CAC/RS 19-1981 rev. 1 (1989) yaitu 0.2 % dan 10 meq/kg minyak. Kadar air yang tinggi dapat memacu terjadinya reaksi hidrolisis menghasilkan asam lemak bebas. Angka asam minyak ikan yang digunakan lebih tinggi dari yang dipersyaratkan FAO/WHO/CAC/RS 19-1981 rev.1 (1989) yaitu untuk *refined oil* angka asamnya maksimum 0.6.

Gliserida minyak ikan yang digunakan ternyata tidak semuanya berupa trigliserida (hanya 70.40 %) sedangkan sisanya berupa monogliserida dan digliserida. Hal ini sebenarnya kurang dikehendaki untuk keperluan reaksi asidolisis karena pada kerangka gliserol minyak ikan terkandung beberapa gugus -OH dan gugus ini dapat mengalami reaksi esterifikasi dengan asam laurat bebas yang menghasilkan air, selanjutnya air tersebut dapat mempengaruhi keseimbangan air dalam sistem untuk terjadinya reaksi hidrolisis lagi. Namun komposisi gliserida di atas menunjukkan jumlah mono- dan digliserida yang relatif kecil dibandingkan dengan trigliserida (Tabel 1) dan perlu diketahui bahwa reaksi asidolisis enzimatis juga memerlukan air untuk membentuk interface dalam jumlah sedikit sehingga kemungkinan kondisi di atas justru menguntungkan.

Pada asidolisis tristearin dengan asam oleat dan stearat, inkorporasi justru mencapai optimal ketika ditambahkan air masing-masing 10 % dan 8 % dari substrat (Yankah dan Akoh, 2000). Komponen gliserida ini juga akan mempengaruhi berat molekul rata-rata dari minyak ikan, karena penghitungan berat molekul didasarkan pada asam-asam lemak penyusunnya dan komponen gliseridanya. Semakin besar komponen trigliserida maka berat molekul minyak ikan akan relatif lebih besar. Pada penelitian ini diketahui bahwa berat molekul minyak ikan rata-rata adalah 715.47 g/mol. Berat molekul ini selanjutnya akan digunakan sebagai dasar untuk penghitungan rasio molar minyak ikan

dengan asam laurat yang digunakan sebagai substrat pada penelitian ini.

Tabel 1 Karakterisasi minyak ikan

Parameter	Nilai
Kadar air (%)	0.05
Angka asam	1.06
Asam lemak bebas (%)	0.55
Angka penyabunan	204.18
Angka peroksida	5.34
Komposisi gliserida	
-monogliserida (%)	14.50
-digliserida (%)	15.10
-trigliserida (%)	70.40
Berat molekul (g/mol)	715.47

Asam lemak yang terkandung dalam minyak ikan pada penelitian ini terutama didominasi oleh asam lemak tak jenuh rantai panjang termasuk EPA (20.38 %) dan DHA (11.71 %). Asam lemak tak jenuh seperti EPA dan DHA sering dikenal sebagai asam lemak  $\omega$ -3 yang memiliki fungsi penting untuk kesehatan. Secara teori asam lemak tak jenuh ini memiliki kecenderungan menempati posisi sn-2 dari kerangka gliserol sehingga diharapkan jika diasidolisis dengan asam laurat menggunakan lipase spesifik 1,3 maka asam lemak tak jenuh tersebut tetap tertinggal di posisi sn-2 sedangkan posisi sn-1 dan sn-3 terinkorporasi oleh asam laurat. Minyak ikan sendiri memiliki kandungan asam laurat tetapi sangat kecil yaitu hanya 0.17 %.

### Pengaruh waktu reaksi terhadap inkorporasi asam laurat ke dalam minyak ikan

Reaksi enzimatis berlangsung seiring dengan lama reaksi pada kondisi suhu tertentu. Pengaruh lama reaksi terhadap interesterifikasi minyak ikan dengan asam laurat ditunjukkan dengan banyaknya asam laurat yang terikat pada kerangka gliserol dari minyak ikan atau yang sering disebut sebagai tingkat inkorporasi asam laurat pada minyak ikan. Inkorporasi asam laurat sebagai fungsi dari waktu reaksi disajikan seperti pada Gambar 1.

Reaksi interesterifikasi berjalan cepat pada awal reaksi (sampai 12 jam). Peningkatan lama reaksi mengakibatkan penurunan inkorporasi asam laurat dari 44.27 % menjadi 38.28 % (24 jam). Inkorporasi kembali meningkat setelah 24 jam. Dengan demikian, tampak bahwa reaksi sudah mencapai equilibrium pada waktu 12 jam. Hasil penelitian Yankah dan Akoh (2000) pada inkorporasi asam kapilat pada tristearin menunjukkan hasil yang sama. Hal ini kemungkinan disebabkan kondisi dalam reaktor mengalami beberapa perubahan. Substrat yang digunakan pada penelitian ini berupa minyak ikan yang mengandung mono-, di-, dan tri-gliserida. Adanya mono-, dan di-gliserida memungkinkan terjadinya reaksi esterifikasi gugus -OH bebas dari gliserol dengan asam laurat bebas menghasilkan molekul air yang dapat memacu terjadinya reaksi hidrolisis kembali sehingga dengan penambahan waktu reaksi justru memberikan kesempatan terjadinya reaksi hidrolisis atau reaksi akan bergeser ke kiri. Namun hidrolisis parsial menyebabkan jumlah air menjadi berkurang dan reaksi

kembali bergeser ke kanan sehingga sistem relatif setimbang atau mencapai keseimbangan reaksi.

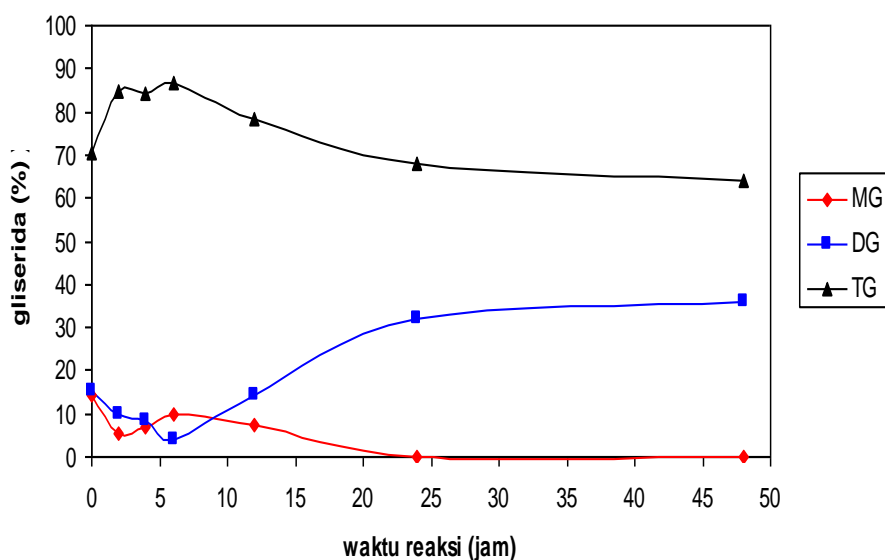
**Profil gliserida lipid terstruktur akibat pengaruh waktu reaksi**

Pada awal reaksi (sampai 6 jam) komponen TG meningkat 22.80 % yang diikuti dengan penurunan DG dan MG (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa reaksi tidak seluruhnya berjalan secara asidolisis, tetapi juga terjadi esterifikasi gugus -OH pada MG dan DG minyak ikan dengan asam laurat sehingga komponen MG dan DG berkurang sedangkan trigliserida meningkat. Setelah reaksi lebih dari 6 jam, komponen TG cenderung menurun yang diikuti dengan kenaikan DG dan menuju ke kondisi setimbang. Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan waktu reaksi maka reaksi didominasi oleh reaksi hidrolisis parsial trigliserida menjadi digliserida dan reaksi esterifikasi monogliserida menjadi digliserida. Menurut Wilis dan Marangoni (2002), triasilgliserol lebih mudah dihidrolisis daripada diasilgliserol dan diasilgliserol dihidrolisis lebih cepat daripada monoasilgliserol. Namun adanya asam lemak bebas yang berlebih di dalam larutan dapat mengakibatkan terbentuknya DG dari reaksi antara MG dan asam lemak bebas. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa triasilgliserol lebih mudah terhidrolisis sedangkan monoasilgliserol lebih mudah teresterifikasi sehingga reaksi mengarah pada pembentukan DG baik melalui hidrolisis parsial pada TG maupun esterifikasi parsial pada MG.

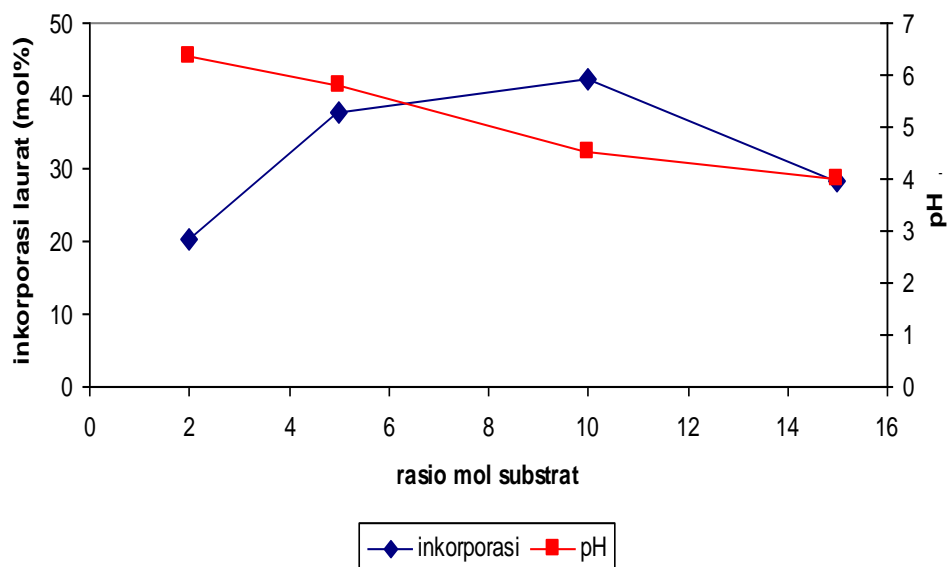
**Pengaruh rasio substrat terhadap inkorporasi asam laurat ke dalam minyak ikan**

Gambar 2 menunjukkan bahwa inkorporasi asam laurat pada lipid terstruktur (42 %) meningkat sampai rasio mol substrat 1:10. Peningkatan rasio mol substrat sampai 1:15 mengakibatkan penurunan sebesar 30 %. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain (i) kompetisi asam laurat dengan asam lemak bebas yang lain, (ii) penurunan pH larutan dengan penambahan asam laurat, (iii) substrat inhibitor dan (iv) desorpsi air pada interfase.

Pada prinsipnya reaksi interesterifikasi minyak ikan dengan asam laurat menggunakan lipase spesifik 1,3 membutuhkan 2 mol asam laurat dalam setiap mol trigliserida dari minyak ikan. Namun demikian, reaksi interesterifikasi berjalan secara kompetitif sehingga asam lemak yang dibebaskan dari minyak ikan akan berkompetisi dengan asam laurat untuk teresterifikasi kembali ke dalam kerangka gliserol minyak ikan. Oleh sebab itu agar reaksi inkorporasi asam laurat ke dalam minyak ikan berjalan baik diperlukan asam laurat dalam jumlah berlebih. Penambahan substrat akan meningkatkan produk selama *load* atau sisi katalitik enzim tersedia, tetapi ketika jumlah substrat telah melebihi *load* enzim yang ada maka kelebihan substrat tidak akan dikatalisis lagi sehingga tidak akan berpengaruh pada jumlah produk. Bahkan kelebihan substrat justru dapat menghambat aktivitas lipase yang disebut dengan *substrat inhibition* (Wilis dan Marangoni, 2002). Tingkat kejenuhan reaksi interesterifikasi pada tiap-tiap bahan berbeda-beda. Pada asidolisis tristearin dengan asam oleat pada rasio molar 1:1 sampai 1:8 inkorporasi masih terus meningkat tetapi asidolisis dengan asam kaprilat setelah rasio molar 1:6 inkorporasi tidak meningkat bahkan justru menurun (Yankah dan Akoh, 2000).



Gambar 1 Pengaruh waktu reaksi terhadap profil gliserida lipid terstruktur. MG: monogliserida, DG: digliserida, TG:trigliserida



Gambar 2 Pengaruh rasio molar substrat terhadap inkorporasi asam laurat pada minyak ikan. Jumlah minyak ikan tetap, sedangkan yang diubah jumlah asam laurat (misal: 2 artinya rasio mol m. ikan : as. laurat adalah 1:2). Reaksi dilakukan pada suhu 40 °C selama 12 jam dalam pelarut heksana. Enzim yang ditambahkan 10 % dari berat substrat.

Selain itu, perubahan kondisi lingkungan akibat penambahan asam lemak bebas yang terlalu tinggi menyebabkan lingkungan menjadi terlalu asam. Hasil pengukuran pH menunjukkan untuk rasio 1:15 pH sistem sebesar 4.0 sedangkan pH aktivitas lipase *Mucor miehei* amobil antara 3-11 (Yamane, 1987). Rendahnya pH tersebut mungkin sudah menyebabkan terjadinya denaturasi parsial pada enzim sehingga aktivitasnya akan berkurang meskipun pH 4.00 masih dalam pH aktivitasnya.

Aktivitas lipase juga akan berkurang ketika konsentrasi asam lemak bebas terlalu tinggi (Wilis dan Marangoni, 2002). Tingginya asam lemak bebas akan menghasilkan gugus asam karboksilat bebas atau terionisasi yang akan meningkatkan keasaman mikroaqueus di sekitar enzim atau menyebabkan desorpsi air dari interface. *Short chain fatty acid* (SCFA) dan *medium chain fatty acid* (MCFA) dapat mengambil bagian interface lapisan air di sekitar enzim dan meningkatkan kelarutannya dalam air, hal ini juga akan membatasi masuknya substrat pada interface. Kuo dan Parkin (1993) mendapatkan penghambatan lebih besar ketika menggunakan asam lemak rantai pendek (C5:0 – C9:0) daripada menggunakan asam lemak rantai yang lebih panjang (C13:0 – C17:0).

**Profil gliserida lipid terstruktur akibat pengaruh rasio substrat**

Pengaruh rasio substrat terhadap profil gliserida lipid terstruktur ditunjukkan pada Gambar 3. Komponen TG meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah asam laurat bebas sampai pada rasio 1 : 10 yang diikuti dengan penurunan DG. Hal ini disebabkan lipase dari *Mucor miehei* sangat spesifik untuk asam laurat (Weete, 2002; Wilis &

Marangoni, 2002) dan memiliki aktivitas yang relatif rendah terhadap PUFA terutama DHA (Irimescu *et al.* 2000). Ketika jumlah asam laurat relatif rendah maka kecenderungan reaksi berjalan ke kanan cukup lemah dan kemampuan asam laurat berkompetisi untuk teresterifikasi juga relatif kecil sehingga dengan peningkatan jumlah asam laurat di dalam larutan maka reaksi cenderung ke arah pembentukan TG. Komponen trigliserida justru menurun pada rasio substrat lebih besar dari 1 : 10. Hal ini mungkin berkaitan dengan aktivitas lipase yang menurun dengan semakin banyaknya asam lemak bebas. Asam lemak bebas menyebabkan desorpsi air dari interface kemudian mengambil bagian interface lapisan air disekitar enzim dan meningkatkan kelarutannya dalam air sehingga akan membatasi masuknya substrat pada interface. Penurunan aktivitas lipase tersebut menyebabkan terbentuknya produk intermediet dan reaksi interesterifikasi tak sempurna.

**Pengaruh suhu reaksi terhadap inkorporasi asam laurat ke dalam minyak ikan**

Pada suhu di bawah 40 °C inkorporasi laurat tidak berubah (42 %). Pada suhu 50 °C inkorporasi meningkat tajam dan relatif tidak berubah hingga suhu 60 °C (65 %). Hal tersebut menunjukkan kisaran suhu untuk reaksi interesterifikasi adalah pada suhu 50 °C – 60 °C. Kisaran suhu ini hampir sama dibandingkan dengan reaksi interesterifikasi dari penelitian lain yang menggunakan lipase *Mucor miehei* amobil. Yankah dan Akoh (2000) mengasidolisis tristearin dengan asam oleat dan asam kaprilat menggunakan lipase *Rhizomucor miehei* masing-masing suhu optimum reaksinya dicapai pada suhu 45 °C dan 55 °C. Rao *et al.* (2002) melakukan asidolisis minyak

kelapa dengan dengan asam lemak  $\omega$ -3 dalam pelarut heksana, diperoleh bahwa inkorporasi  $\omega$ -3 maksimal diperoleh pada suhu 54.1 °C dan waktu reaksi 34 jam. Namun inkorporasi  $\omega$ -6 maksimal diperoleh pada suhu 39 °C dan waktu reaksi 48.5 jam. Menurut Malcata *et al.* (1992), suhu optimal untuk kebanyakan lipase amobil adalah antara 30 – 62 °C, tetapi lipase amobil secara umum tahan terhadap pengaruh suhu terhadap terjadinya *unfolding* dan denaturasi daripada enzim bebas.

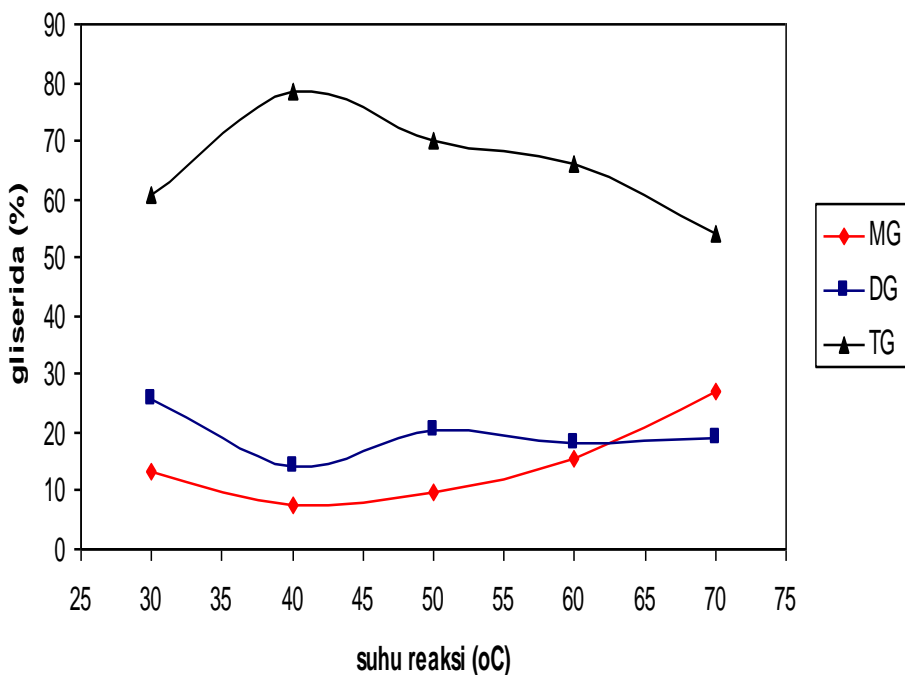
Secara umum, semakin tinggi suhu reaksi akan menurunkan viskositas sistem campuran reaksi dan hal ini tentu akan membantu molekul substrat lebih mudah melakukan mobilisasi. Suhu reaksi juga membantu sistem reaksi mencapai energi aktivasinya. Namun pada interesterifikasi ini ditambahkan pelarut organik berupa heksana yang dapat membantu menurunkan titik leleh substrat sehingga pada suhu rendah pun sebenarnya viskositas substrat sudah rendah. Penggunaan pelarut organik untuk sintesis enzimatis berfungsi dalam pelarutan substrat hidrofobik dan mengeliminasi penggunaan suhu tinggi (Yankah dan Akoh, 2000). Pelarut organik juga dapat memperbaiki stereoselektifitas lipase. Pelarut yang sangat baik untuk stereoselektifitas yang optimal adalah n-heksana (Chandler *et al.* 1998).

Kestabilan lipase juga dapat dipengaruhi oleh suhu reaksi, tetapi penggunaan pelarut heksana juga dapat berfungsi menjaga kestabilan lipase terhadap suhu, diketahui bahwa lipase lebih thermostabil dalam pelarut organik daripada dalam air (Yang *et al.* dalam Yankah dan Akoh,

2000). Hal ini juga tampak pada Gambar 3 yaitu sampai suhu 70 °C inkorporasi laurat masih tetap tinggi. Yankah dan Akoh (2000) mengasidolisis tristearin dengan asam oleat sampai suhu 70 °C menunjukkan inkorporasi masih tetap tinggi.

**Profil gliserida lipid terstruktur akibat pengaruh suhu reaksi**

Gambar 3 secara umum menunjukkan pada suhu di atas 40 °C komponen trigliserida menurun dengan peningkatan suhu reaksi. Penurunan tersebut menandakan terjadinya hidrolisis parsial komponen trigliserida menghasilkan 'produk antara' digliserida dan monogliserida. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh terjadinya migrasi asil yang menyebabkan reaksi interesterifikasi tidak sempurna (Xu, 2000). Migrasi asil merupakan berpindahnya asil dari trigliserida dari posisi sn-2 ke posisi sn-1 atau sn-3. Berpindahnya asil tersebut dapat menyebabkan posisi sn-2 kosong sehingga terbentuk digliserida ataupun monogliserida. Migrasi asil dapat dipicu oleh tingginya suhu reaksi, kadar air, dan rasio substrat. Selanjutnya juga diketahui bahwa suhu reaksi dan waktu reaksi memacu terbentuknya 1,3-diasilgliserol lebih besar daripada 1,2-diasilgliserol (Xu *et al.* 1999). Dengan terbentuknya ,3-diasilgliserol maka lipase spesifik 1,3 dari *Rhizomucor miehei* tentu tidak dapat atau sulit untuk mengkatalisis interesterifikasi pada posisi sn-2. Dengan demikian hal tersebut dapat menurunkan komponen trigliserida dan justru meningkatkan digliserida ataupun monogliserida.



Gambar 3 Pengaruh suhu reaksi terhadap profil gliserida lipid terstruktur

**Regiospesifitas posisi asam lemak lipid terstruktur**

Analisis regiospesifitas dilakukan dengan metode etanolisis minyak atau trigliserida secara spesifik 1,3 menggunakan lipase *Candida antarctica* sehingga dihasilkan 2-monogliserida dan etil ester. Hasil TLC dan scanning dengan TLC Scanner CAMAG ditunjukkan pada Gambar 4. MG merupakan komponen yang dominan pada larutan hasil etanolisis sedangkan DG kurang terlihat karena jumlahnya yang terlalu sedikit. Menurut Irimescu (2002a) lipase *Candida antarctica* akan bersifat spesifik 1,3 ketika berada dalam pelarut etanol dalam jumlah besar, sehingga ketika digunakan untuk etanolisis maka yang terlepas hanya posisi sn-1 dan sn-3 dengan meninggalkan 2-monogliserida. Irimescu *et al.* (2001b) juga melakukan etanolisis minyak ikan bonito dengan lipase *Candida antarctica* menghasilkan monogliserida dan hasil analisis TLC ternyata menunjukkan 100 % dari monogliserida berupa 2-monogliserida.

Hasil analisis GC menunjukkan bahwa asam laurat pada posisi sn-2 untuk minyak ikan hanya 0.90 % dari luas area, sedangkan untuk lipid terstruktur asam laurat yang ada pada posisi sn-2 hanya 0.87 % luas area sedangkan lainnya didominasi oleh asam lemak rantai panjang (PUFA). Interesterifikasi asam laurat pada minyak ikan diharapkan menghasilkan inkorporasi laurat hanya pada posisi sn-1 dan sn-3. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa sebagian besar dari asam laurat pada lipid terstruktur hanya menempati posisi sn-1 dan sn-3. Dengan demikian berarti

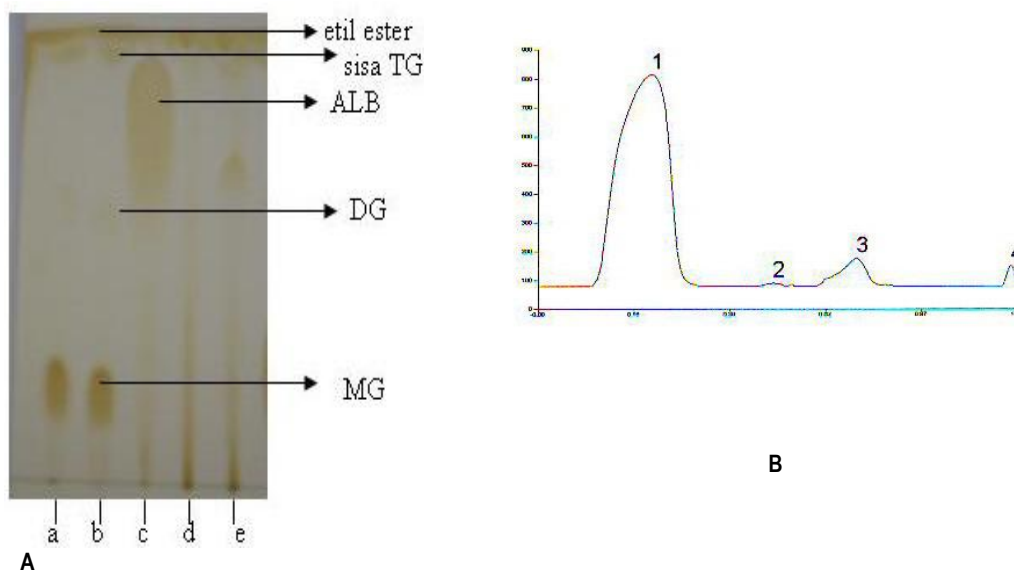
bahwa pada reaksi interesterifikasi tidak terjadi migrasi asil dan lipid terstruktur yang dihasilkan sebagian besar posisi sn-1,3 ditempati laurat sedangkan posisi sn-2 ditempati oleh PUFA.

**KESIMPULAN**

Kondisi optimum reaksi inkorporasi asam laurat ke dalam minyak ikan pada reaksi interesterifikasi dicapai pada suhu 50 °C, rasio mol minyak ikan dan asam laurat 1:10 dengan waktu reaksi 12 jam. Waktu reaksi, rasio substrat, dan suhu reaksi juga berpengaruh terhadap profil gliserida lipid terstruktur. Lipid terstruktur yang dihasilkan diduga sebagian besar posisi sn-1,3 ditempati oleh asam laurat sedangkan pada posisi sn-2 didominasi oleh PUFA

**UCAPAN TERIMAKASIH**

Ditjen dikti atas pemberian dana penelitian hibah pasca tahun 2007. Almarhum Prof. Tranggono, Ph.D, atas ide dasar dan inspirasi penelitian yang sekarang ini telah dapat diwujudkan.



Gambar 4 Hasil etanolisis lipid terstruktur pada TLC dibandingkan dengan senyawa standar. a & b= hasil etanolisis SL, c= asam oleat, d & e= metil ester. (MG= monogliserida, DG= digliserida, TG= trigliserida, ALB= asam lemak bebas). A= visualisasi dengan iodin, B= hasil TLC scanner CAMAG, monogliserida (1), digliserida (2, 3) dan trigliserida (4)

## DAFTAR PUSTAKA

- Akoh CC. 2002. Structured lipids. Di dalam: *Food Lipids, Chemistry, nutrition, and Biotechnology*. West Virginia: Marcel Dekker Inc.
- AOCS. 1989. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemistry Society*. Ed ke-4. Illinois: Broadmaker Drive.
- Chandler IC, Quinlan PT, dan McNeill GP. 1998. Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides. *J Am Oil Chem Soc* 75: 1513 – 1518.
- Endo Y, Hoshizaki S, dan Fujimoto K. 1997. Autoxidation of synthetic isomers of triacylglycerol containing eicosapentaenoic acid. *J Am Oil Chem Soc* 74: 543-548.
- FAO/WHO/CAC/RS 19 1981 rev 1. 1989. Di dalam: *Guidelines for Characterizing Food-Grade Fish Oil. Inform Vol 9 no 5: 473-481*.
- Irimescu R, Yasui M, Iwasaki Y, Shimidzu N, dan Yamane T. 2000. Enzymatic Synthesis of 1,3-Dicapryloyl-2-Eicosapentaenoylglycerol. *J Am Oil Chem Soc* 78: 743 – 748.
- Irimescu R, Furihata K, Hata K, Iwasaki Y, dan Yamane T. 2001a. Utilization of reaction medium-dependent regiospecificity of *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435) for the synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol. *J Am Oil Chem Soc* 78: 285 – 289.
- Irimescu R, Furihata K, Hata K, Iwasaki Y, dan Yamane T. 2001b. Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* 78: 743 – 748.
- Irimescu R, Iwasaki Y, dan Hou CT. 2002. Study of ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *J Am Oil Chem Soc* 79: 879 – 883.
- IUPAC. 1979. *Standard Methods for the Analysis for Oil, Fats and Derivates*. Oxford: Pergamon Press.
- Kawashima A, Shimada Y, Yamamoto M, Sugihara A, Nagao T, Komemushi S, dan Tominaga Y. 2001. Enzymatic synthesis of high-purity structured lipids with caprylic acid at 1,3-positions and polyunsaturated fatty acid at 2-position. *J Am Oil Chem Soc* 78: 611 – 616.
- Kuo SJ, dan Parkin KL. 1993. Substrat preference lipase-mediated acyl-exchange reaction with buteroil are concentration-dependent. *J Am Oil Chem Soc* 70: 393 – 399.
- Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Amundson Jr dan CH. 1992. Kinetics and mechanisms of reaction catalized by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 14: 426-446.
- Martati E. 1998. Hidrolisis Minyak Hati Ikan Cod dengan Lipase Teramobil dari *Mucor miehei* [Tesis]. Yogyakarta: Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Park PW dan Goins RE. 1994. In situ preparation of fatty acids metil ester for analysis of fatty acids composition in food. *J Food Sci* 59: 1262 – 1266.
- Rao R, Manohar B, Sambiah K, dan Lokesh BR. 2002. Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil: optimization of reactions by response surface methodology. *J Am Oil Chem Soc* 70: 885 – 890.
- Weete JD. 2002. Microbial lipases. Di dalam: *Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. West Virginia: Marcel Dekker Inc.
- Willis WM, dan Marangoni AG. 2002. *Enzymatic Interesterification*. In: *Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. West Virginia: Marcel Dekker Inc.
- Xu X, Mu H, Skands ARH, Hoy CE, dan Nissen JA. 1999. Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. *J Am Oil Chem Soc* 76: 175-181.
- Xu X. 2000. Enzymatic production of structured lipids: process reaction and acyl migration. *Inform* 11: 1121-1131.
- Yamane T. 1987. Di dalam: Hidrolisis Minyak Hati Ikan Cod dengan Lipase Teramobil dari *Mucor miehei*. [Tesis]. Yogyakarta: Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Yankah VV, dan Akoh C. 2000. Lipase-catalyzed acidolysis of tristearin with oleic or caprilic acids to produce structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 77: 495-500.