

SINTESIS FOSFOLIPID MENGANDUNG ASAM LEMAK ω -3 DARI FOSFOLIPID KEDELAI DAN MINYAK KAYA ASAM LEMAK ω -3 DARI HASIL SAMPING PENGALENGAN TUNA

Synthesis of Phospholipid Containing ω -3 Fatty Acids from Soy Phospholipids
and Fish Oil Enriched with ω -3 Fatty Acids from Tuna Canning Processing

Teti Estiasih, Moch. Nur, Jaya Mahar Maligan, Satrio Maulana

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145
Email: teties@yahoo.co.id

ABSTRAK

Keunggulan fosfolipid dapat ditingkatkan dengan menggabungkan asam lemak ω -3, terutama EPA (*eicosapentaenoic acid*, C20:5 ω -3) dan DHA (*docosahexaenoic acid*, C22:6 ω -3), pada struktur fosfolipid sehingga diperoleh fosfolipid terstruktur. Strukturisasi fosfolipid kedelai komersial dilakukan dengan cara mengganti asam lemak dari fosfolipid kedelai dengan asam lemak ω -3 dari minyak kaya asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan tuna. Sintesis fosfolipid terstruktur dilakukan secara asidolisis enzimatis dengan menggunakan lipase dari *R. miehei*. Faktor yang dikaji pada proses sintesis ini adalah konsentrasi enzim dan lama sintesis. Tingkat inkorporasi EPA dan DHA pada struktur fosfolipid dipengaruhi oleh konsentrasi enzim. Pada konsentrasi enzim yang rendah, peningkatan lama reaksi setelah tingkat inkorporasi optimum tercapai cenderung menyebabkan penurunan tingkat inkorporasi EPA+DHA. Pada konsentrasi enzim yang tinggi, lama reaksi tampaknya tidak mempengaruhi tingkat inkorporasi. Tingkat inkorporasi DHA lebih tinggi dari EPA sehingga fosfolipid terstruktur yang dihasilkan sangat sesuai digunakan untuk produk pangan yang memerlukan kadar DHA tinggi. Ada preferensi inkorporasi EPA+DHA pada fosfatidiletanolamin dibandingkan jenis fosfolipid yang lain.

Kata kunci: Fosfolipid terstruktur, asam lemak ω -3, EPA, DHA, asidolisis enzimatis

ABSTRACT

The superiority of soy phospholipids could be obtained by incorporation of ω -3 fatty acids into phospholipids structure, especially EPA (*eicosapentaenoic acid*, C20:5 ω -3) and DHA (*docosahexaenoic acid*, C22:6 ω -3). Structurization of commercial soy phospholipids was conducted by replacement of natural fatty acids in soy phospholipids by ω -3 fatty acids from ω -3 fatty acids enriched fish oil from tuna canning processing using enzymatic acidolysis. Two factors were studied in enzymatic acidolysis, concentration of *R. miehei* lipase and time of reaction. The result showed that increasing reaction time tended to decrease degree of EPA and DHA incorporation at low enzyme concentration. Meanwhile, the reaction time did not affect degree of incorporation at high enzyme concentration. DHA incorporation was higher than EPA that obtained structured phospholipids is supposed to be suitable for high DHA food products. There was a preference of EPA and DHA to incorporate into phosphatidylethanolamine structure than other phospholipids.

Keywords: Structured phospholipids, ω -3 fatty acids, EPA, DHA, enzymatic acidolysis

PENDAHULUAN

Fosfolipid merupakan komponen struktural penting membran sel yang mempunyai peran penting di industri farmasi, pangan, kosmetik, dan industri lain karena aktivitas fisiologisnya selain perannya sebagai pengemulsi alami. Untuk tujuan praktis, seperti fosfolipid dengan stabilitas tinggi atau mempunyai sifat fungsional terhadap kesehatan, seringkali diinginkan fosfolipid dengan asam lemak tertentu. Perubahan komposisi asam lemak tersebut dapat dilakukan melalui reaksi hidrolisis, esterifikasi, atau transesterifikasi (Hara dkk., 1997).

Asam lemak ω -3 dalam struktur fosfolipid lebih stabil terhadap oksidasi dibandingkan dalam bentuk asam lemak bebas atau trigliserida (Lyberg dkk., 2005). Fosfolipid mengandung asam lemak ω -3 merupakan pembawa (*carrier*) asam lemak ω -3 yang potensial yang juga berperan sebagai pengemulsi dan antioksidan. Fosfolipid kaya asam lemak ω -3 dapat diperoleh dari ikan, akan tetapi proses ekstraksi rumit dan memerlukan teknik separasi yang kompleks. Sintesis fosfolipid terstruktur yang mengandung asam lemak ω -3 dengan menggunakan fosfolipid dari tanaman merupakan alternatif teknik yang memungkinkan (Haraldsson dan Thorarensen, 1999).

Perubahan struktur molekul fosfolipid ditujukan untuk mendapatkan sifat fosfolipid sesuai dengan sifat fungsional atau fisiologis yang diinginkan yang berbeda dari fosfolipid asal. Fosfolipid baru dengan sifat fisik dan kimia yang dihasilkan juga dapat diperoleh dengan cara mengubah jenis asam lemak dalam fosfolipid (Vikbjerg dkk., 2006). Perubahan struktur tersebut dilakukan melalui modifikasi secara enzimatis, fisik, atau kimiawi.

Dibandingkan dengan modifikasi kimiawi, modifikasi fosfolipid secara enzimatis menguntungkan karena enzim bersifat spesifik dan selektif (Vikbjerg dkk., 2005). Enzim mengkatalisis reaksi kimiawi di bawah kondisi sedang sehingga merupakan alternatif menjanjikan untuk sintesis fosfolipid terstruktur secara kimiawi. Sintesis enzimatis fosfolipid terstruktur dari bahan alami mempunyai beberapa keuntungan yaitu kondisi reaksi yang tidak ekstrim dan spesifitas yang tinggi. Enzim yang banyak digunakan adalah lipase atau fosfolipase (Reddy dkk., 2005). Lipase spesifik 1,3 dan fosfolipase A2 (PLA2) (EC 3.1.1.4) telah digunakan untuk memodifikasi asam lemak fosfatidilkolin (PC, *phosphatidylcholine*) pada posisi sn-1 dan sn-2. Lipase spesifik 1,3 digunakan terutama untuk mengubah asam lemak pada posisi sn-1 dari PC melalui reaksi asidolisis (Adlercreutz dan Wehtje, 2004). Lipase amobil dari *Rhizomucor meihe* (Lipozyme TM) yang bersifat regiospesifik 1,3 telah digunakan oleh Haraldsson dan Thorarensen (1999) dalam sintesis PC mengandung EPA dan DHA dengan sumber PC

adalah kuning telur dengan menggunakan konsentrat asam lemak ω -3 sebagai sumber asil.

Hampir sebagian besar penelitian tentang reaksi asidolisis dalam sintesis fosfolipid menggunakan fosfolipid atau fosfatidilkolin murni sebagai substrat (Mustranta dkk., 1994; Hosokawa dkk., 1995; Aura dkk., 1995; Haraldsson dan Thorarensen, 1999; Adlercreutz dan Wehtje, 2004; Reddy dkk., 2005; Lin dkk., 2005). Pada penelitian ini dilakukan reaksi asidolisis antara minyak kaya asam lemak ω -3 dengan fosfolipid kedelai komersial. Fosfolipid alami biasanya merupakan campuran dari fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, dan fosfatidilinositol (Vikbjerg dkk., 2005).

Inkorporasi asam lemak pada fosfolipid dapat dikendalikan selama reaksi (Vikbjerg dkk., 2005). Hasil penelitian Haraldsson dan Thorarensen (1999) menunjukkan bahwa kecepatan reaksi interesterifikasi hampir setara dengan reaksi asidolisis. Reaksi asidolisis sangat tergantung konsentrasi lipase. Inkorporasi EPA dan DHA tinggi diperoleh pada konsentrasi lipase 70% dengan hasil maksimal pada konsentrasi 100%. Hasil reaksi asidolisis ini sangat dipengaruhi oleh lama reaksi.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi sintesis fosfolipid terstruktur dari minyak kaya asam lemak ω -3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna sebagai sumber asil dan fosfolipid/lesitin kedelai komersial. Kondisi sintesis yang dikaji adalah konsentrasi enzim lipase *R. miehei* dan lama reaksi asidolisis.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan baku yang digunakan adalah lesitin kedelai komersial, minyak hasil samping pengalengan tuna dari PT. Aneka Tuna Indonesia, Pasuruan, Jawa Timur, dan lipase *Rhizomucor meihe* (Sigma Co.). Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah standar campuran asam lemak, standar fosfolipid (fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinositol (PI), asam fosfatidat (PA), lisofosfatidilkolin (LPC), lisofosfatidiletanolamin (LPE), fosfatidilgliserol (PG), difosfatidilgliserol (DPG), dan BF₃-metanol 14% dari Sigma Co.; metilenklorida, NaOH, benzena, KOH, HCl, aseton, heksana, asam sulfat, plat TLC (silika gel G60 F254 sebagai adsorben), kloroform, dan metanol bersifat *pro analysis* dari Merck; etanol, heksana, aseton (teknis); akuades; es kering; dan gas nitrogen.

Peralatan yang digunakan adalah *shaker water bath*, kromatografi gas (Shimadzu), *TLC Scanner* (Shimadzu), *TLC development tank*, oven, lampu UV, alat-alat gelas, pengaduk magnet, buret, dan rotavapor (Buchi).

Preparasi Minyak Kaya Asam Lemak ω -3 dengan Teknik Kristalisasi Pelarut Suhu Rendah

Pada tahap ini dilakukan pembuatan minyak kaya asam lemak ω -3 dalam kadar tinggi dengan bentuk kimia minyak adalah asam lemak bebas yang diperoleh dari hasil hidrolisis menggunakan NaOH. Proses pembuatan minyak kaya asam lemak ω -3 dilakukan dengan metode kristalisasi pelarut suhu rendah (Ahmadi, 2006) yang dimodifikasi.

Sintesis Fosfolipid Terstruktur Mengandung Asam Lemak ω -3 Dari Fosfolipid Kedelai dan Minyak Kaya Asam Lemak ω -3

Penghilangan minyak dari fosfolipid kedelai komersial (Nasir dkk., 2007). Proses penghilangan minyak ditujukan untuk mendapatkan fosfolipid kedelai yang lebih murni. Lesitin/fosfolipid kedelai sebanyak 25 g dilarutkan dalam aseton 150 mL dan diaduk dengan pengaduk magnet selama 1 jam. Pelarut yang mengandung lipid netral yang berwarna kuning dipisahkan dengan dekantasi, kemudian proses diulang sampai pelarut tidak berwarna. Minyak yang masih mengkontaminasi fosfolipid dicek dengan menggunakan TLC. Jika masih terdapat banyak minyak, maka dilakukan kembali pencucian seperti sebelumnya. Lipid polar/fosfolipid yang diperoleh digunakan untuk sintesis fosfolipid terstruktur.

Reaksi asidolisis minyak asam lemak ω -3 dengan fosfolipid kedelai secara asidolisis enzimatis (modifikasi Haraldsson dan Thorarensen, 1999). Pada tahap reaksi asidolisis enzimatis ini faktor yang dikaji adalah lama reaksi dan konsentrasi enzim lipase *Rhizomucor miehei* yang digunakan. Minyak kaya asam lemak ω -3 dan fosfolipid kedelai yang sudah dihilangkan minyaknya (rasio minyak atau asam lemak: fosfolipid 3,5:1 atau 280 mg:80 mg) dimasukkan tabung reaksi tertutup. Enzim Lipozyme (*Rhizomucor meihei*) ditambahkan dengan konsentrasi 20, 30, 40% (terhadap substrat, sesuai perlakuan), air 10%, dan heksana 3 mL. Campuran digoyang perlahan dalam *water-bath* kecepatan 300 rpm pada suhu 40 °C selama waktu tertentu sesuai perlakuan yaitu 18, 24, dan 36 jam. Setelah inkubasi, campuran reaksi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan fosfolipid terstruktur. Kemudian dilakukan pencucian menggunakan 1 mL heksana. Fosfolipid yang dihasilkan kemudian dimetilasi dengan metode Park dan Goin (1994). Selanjutnya dilakukan analisis profil asam lemak dengan menggunakan kromatografi gas.

Rancangan Percobaan dan Analisis

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap 2 faktor dua kali ulangan dengan faktor yang dikaji adalah lama reaksi (18, 24, dan 36 jam) serta konsentrasi enzim terhadap substrat (20, 30, dan 40% b/b). Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam dilanjutkan dengan uji DMRT jika perlakuan menunjukkan pengaruh yang signifikan.

Analisis yang dilakukan pada tahap penelitian ini adalah profil fosfolipid dengan kromatografi lapis tipis (Nzai dan Proctor, 1998); profil asam lemak dan kadar asam lemak ω -3 dengan kromatografi gas (transmetilasi *in situ* metode Park dan Goin, 1994); serta profil asam lemak pada masing-masing jenis fosfolipid dalam fosfolipid terstruktur terbaik dengan separasi fosfolipid menggunakan kromatografi lapis tipis (Nzai dan Proctor, 1998), masing-masing spot dikerok dan diekstrak dengan metode Christie (1982), dilanjutkan dengan metilasi metode Park dan Goin (1994) untuk dianalisis dengan kromatografi gas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Asam Lemak Minyak Kaya Asam Lemak ω -3 dan Fosfolipid Kedelai

Fosfolipid yang digunakan dalam penelitian ini adalah fosfolipid atau lesitin kedelai yang sudah dihilangkan minyaknya (*deoilting*). Tujuan penghilangan minyak adalah untuk menghilangkan trigliserida yang dapat mengganggu proses esterifikasi asam lemak ω -3. Pada proses sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak ω -3 digunakan enzim lipase dari *Rhizomucor miehei*. Hasil penelitian sebelumnya (Harraldsson dan Thorarensen, 1999) menunjukkan bahwa enzim lipase mempunyai preferensi yang lebih tinggi pada trigliserida dibandingkan fosfolipid. Oleh karena itu proses penghilangan minyak dilakukan karena pada lesitin kedelai biasa ditambahkan minyak untuk menurunkan viskositas lesitin yang terlalu kental.

Fosfolipid kedelai komersial mengandung asam lemak yang didominasi oleh asam linoleat, diikuti oleh asam stearat dan oleat. Kedelai merupakan sumber asam linoleat. Hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2011) menunjukkan bahwa kedelai dari varietas unggul Anjasmoro mempunyai komposisi asam lemak yang didominasi asam linoleat dengan kadar 48-52%. Sanibal dan Mancini-Pilho (2004) menjelaskan bahwa kadar asam linoleat dalam minyak kedelai mencapai 55,83%. Penelitian Wang dan Wang (2008) menunjukkan asam lemak paling dominan penyusun fosfolipid kedelai adalah asam linoleat. Fosfolipid kedelai komersial tidak mengandung asam lemak ω -3 (Tabel 1). Menurut Das dan

Bhattacharyya (2006), fosfolipid kedelai mengandung asam palmitat 27,3%, asam stearat 1,6%, asam oleat 14,7%, asam linoleat 52,5%, asam asam linolenat 3,8%, dan asam lemak lain 0,1%.

Asam lemak ω-3 yang dibutuhkan untuk sintesis fosfolipid terstruktur dalam bentuk asam lemak bebas sehingga pada penelitian ini minyak hasil samping pengalengan tuna dihidrolisis kemudian dikristalisasi dengan menggunakan pelarut pada suhu rendah. Tabel 1 menunjukkan bahwa minyak kaya asam lemak ω-3 didominasi oleh DHA. Keunggulan minyak ikan tuna adalah mempunyai kadar DHA yang lebih tinggi dari EPA (Howe dkk., 2002). Minyak hasil samping pengalengan tuna mempunyai kadar DHA 35,52% dan EPA 6,68%. Teknik kristalisasi pelarut suhu rendah yang digunakan pada penelitian ini dapat meningkatkan kadar EPA+DHA sebesar 1,37 kali yaitu kadar EPA+DHA 57,99% (Tabel 1).

Tabel 1. Profil asam lemak minyak kaya asam lemak ω-3 dan fosfolipid (lesitin) kedelai komersial

Jenis asam lemak	Kadar (%)	
	Minyak kaya asam lemak ω-3	Fosfolipid kedelai komersial
C12:0	0,11	0,13
C14:0	3,82	0,21
C16:0	4,01	2,99
C18:0	2,12	26,08
C18:1	27,98	17,19
C18:2	2,20	46,00
C18:3	1,01	4,98
C20:4	0,75	1,37
EPA	9,61	0
DHA	48,38	0
EPA+DHA	57,99	0

Jenis-jenis Fosfolipid Kedelai

Fosfolipid kedelai komersial hasil penghilangan minyak dianalisis profil atau jenis-jenis fosfolipid penyusunnya. Penghilangan minyak dilakukan dengan menggunakan aseton sampai diperoleh fosfolipid tanpa minyak yang diuji menggunakan TLC. Tabel 2 menunjukkan jenis-jenis fosfolipid yang terdapat dalam fosfolipid kedelai komersial.

Fosfolipid kedelai komersial yang digunakan pada penelitian ini didominasi oleh fosfatidilinositol. Menurut Wu dan Wang (2007), lesitin kedelai mengandung PC (fosfatidilkolin) 18%, PE (fosfatidiletanolamin) 14%, PI (fosfatidilinositol) 9%, PA (asam fosfatidat) 2%, PL (fosfolipid) minor 2%, glikolipid 11%, gula kompleks 5%, dan lipid netral 37%. Judde dkk. (2003) menunjukkan bahwa komposisi fosfolipid beberapa lesitin kedelai komersial beragam dengan kadar PC berkisar 12,5-74,6%, PE berkisar

17,4-44,6%, PI berkisar 3,1-26,6%, PA berkisar 3,2-21,9%, dan fosfolipid lain berkisar 1,3-7,7%. Hasil penelitian ini menunjukkan fosfolipid kedelai didominasi oleh PI, diikuti PC, PE, dan PA. Distribusi jenis-jenis fosfolipid dalam fosfolipid kedelai komersial yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan literatur (Judde dkk., 2003; Wu and Wang, 2007) yang menunjukkan fosfolipid kedelai didominasi oleh PC. Lesitin atau fosfolipid kedelai komersial biasa mengalami fraksinasi dan modifikasi untuk mendapatkan kesesuaian sifat fungsionalnya dengan produk pangan tertentu sehingga seringkali disebut *tailored-made lecithins* (Colbert, 1998).

Jenis-jenis fosfolipid pada fosfolipid kedelai komersial mempunyai asam lemak seperti dapat dilihat pada Tabel 3. Dari Tabel 3 terlihat bahwa jenis fosfolipid yang berbeda mempunyai komposisi asam lemak yang terikat pada strukturnya yang berbeda pula. Asam lemak dominan pada masing-masing jenis fosfolipid berbeda-beda yaitu asam palmitat pada PI, asam oleat pada PC dan PA, serta asam linoleat pada PE. Wang dan Wang (2008) menyatakan bahwa jenis asam lemak dominan pada PE dan PC kedelai adalah asam linoleat. Pada penelitian ini, PC didominasi oleh asam oleat sedangkan PE didominasi oleh asam linoleat.

Tabel 2. Jenis-jenis fosfolipid dalam fosfolipid kedelai

No. Spot	Nilai Rf	Jenis fosfolipid	Kadar fosfolipid (%)
1	0,22	Fosfatidilinositol (PI)	51,1
2	0,42	Fosfatidilkolin (PC)	21,9
3	0,47	Fosfatidiletanolamin (PE)	14,3
4	0,54	Asam Fosfatidat (PA)	12,5

Tabel 3. Komposisi asam lemak (%) pada jenis-jenis fosfolipid pada fosfolipid kedelai

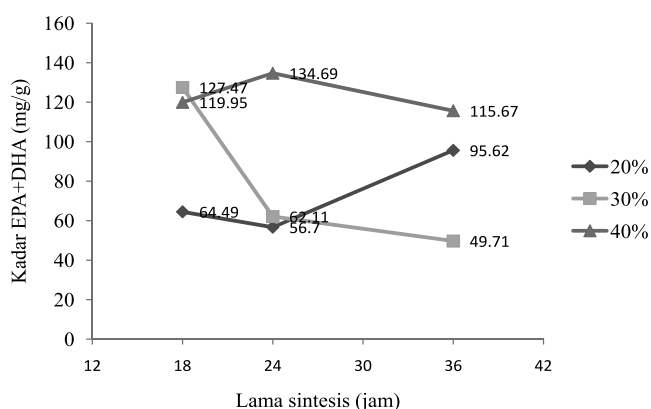
Jenis Asam lemak	PI	PC	PE	PA	PE*	PC*
C12:0	9,33	4,54	3,64	3,87	-	-
C14:0	11,29	4,31	4,67	6,88	-	-
C16:0	23,95	11,27	22,73	17,40	20,5	16,6
C16:1	20,43	7,18	8,77	8,24	-	-
C18:0	10,16	3,57	-	7,22	6,4	3,0
C18:1	13,19	31,71	7,01	27,35	10,0	10,9
C18:2	2,35	24,62	39,36	10,05	56,2	59,9
C18:3	4,43	-	3,45	1,28	6,9	6,6
C20:0	-	2,63	-	2,76	-	-
C22:0/C22:1	-	10,18	8,57	12,34	-	-
C24:0	4,88	-	1,80	2,61	-	-

Keterangan: PI = fosfatidilinositol
 PC = fosfatidilkolin
 PE = fosfatidiletanolamin
 PA = asam fosfatidat

*Sumber: Wang and Wang (2008)

Kadar EPA dan DHA pada Fosfolipid Terstruktur

Fosfolipid terstruktur disintesis dari minyak kaya asam lemak ω -3 dan fosfolipid kedelai komersial yang tidak mengandung asam lemak ω -3 (Tabel 1). Fosfolipid terstruktur yang dihasilkan diharapkan mengandung asam lemak ω -3 sehingga diperoleh fosfolipid sebagai pengemulsi yang sekaligus sebagai sumber asam lemak ω -3. Sintesis fosfolipid terstruktur dilakukan dengan memodifikasi metode Haraldsson dan Thorarensen (1999). Profil asam lemak fosfolipid terstruktur dianalisis untuk mengetahui kadar EPA+DHA. Tingkat inkorporasi yang diukur adalah kadar EPA+DHA dalam fosfolipid terstruktur dalam satuan mg/g (Gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi enzim dan lama asidolisis enzimatis terhadap tingkat inkorporasi EPA+DHA pada fosfolipid

Hasil analisis ragam terhadap kadar EPA dan DHA (mg/g) yang terinkorporasi dalam fosfolipid terstruktur menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi enzim berpengaruh nyata ($\alpha=5\%$), sedangkan lama reaksi dan interaksi antar perlakuan berpengaruh tidak nyata ($\alpha=5\%$). Hasil penelitian Haraldsson dan Thorarensen (1999) menunjukkan reaksi asidolisis sangat tergantung konsentrasi lipase. Tabel 4 menunjukkan pengaruh konsentrasi enzim terhadap tingkat inkorporasi EPA dan DHA (mg/g).

Tabel 4. Kadar EPA+DHA fosfolipid terstruktur akibat perlakuan konsentrasi enzim

Konsentrasi Enzim (%)	Kadar EPA+DHA (mg/g)	BNT 5%
20%	72,266 a	
30%	79,758 ab	49.03
40%	123,435 b	

Nilai rerata yang didampingi notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($\alpha=5\%$)

Dari Gambar 1 terlihat bahwa pada konsentrasi enzim 20%, peningkatan lama reaksi asidolisis enzimatis menyebabkan kadar EPA dan DHA (mg/g) menurun sampai lama reaksi 24 jam. Peningkatan lama reaksi menyebabkan jumlah EPA+DHA yang diinkorporasikan meningkat. Ada dugaan bahwa pada konsentrasi enzim yang rendah, proses hidrolisis asam lemak dari struktur fosfolipid asal terjadi pada awal reaksi dilanjutkan esterifikasi asam lemak ω -3. Reaksi sampai 24 jam menyebabkan tingkat inkorporasi menurun. Kemungkinan sampai lama reaksi 24 jam terjadi proses hidrolisis sehingga asam lemak ω -3 yang sudah terinkorporasi menjadi terhidrolisis dari struktur fosfolipid terstruktur. Penambahan lama reaksi menyebabkan peningkatan kembali jumlah asam lemak ω -3 yang digabungkan pada struktur fosfolipid.

Diduga enzim mempunyai preferensi untuk menghidrolisis dan menginkorporasikan asil dari dan ke dalam struktur fosfolipid. Pada kadar asil yang berlebihan, reaksi terdorong ke arah sintesis. Akan tetapi peningkatan asil lebih lanjut menyebabkan kemungkinan hidrolisis yang terbatas akibat kondisi asil berlebih. Ada kemungkinan asil berfungsi sebagai inhibitor proses hidrolisis, sehingga keterbatasan jumlah asil yang dihidrolisis menyebabkan keterbatasan posisi dalam struktur fosfolipid yang dapat diinkorporasi oleh asam lemak ω -3. Vikbjerg dkk. (2006) menunjukkan bahwa jumlah asil yang berlebihan telah digunakan untuk mendorong pembentukan produk.

Haraldsson dan Thorarensen (1999) menyebutkan bahwa reaksi asidolisis sangat bergantung pada dosis enzim. Inkorporasi EPA dan DHA tinggi tercapai pada lama reaksi 72 jam dengan dosis lipase 70%, akan tetapi inkorporasi tertinggi tercapai pada dosis enzim 100%. Dosis enzim yang tinggi dibutuhkan pada proses asidolisis fosfolipid karena adanya *zwitter ion* pada gugus kepala fosfolipid dapat menghambat aktivitas enzim.

Hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009) menunjukkan bahwa tingkat inkorporasi asam lemak ω -3 pada struktur fosfolipid mencapai maksimum pada lama reaksi 23-28 jam bergantung pada jenis konsentrat asam lemak ω -3 yang digunakan. Peningkatan lama reaksi lebih lanjut menyebabkan penurunan tingkat inkorporasi. Ada dugaan setelah melewati lama reaksi maksimum, peningkatan lama reaksi lebih lanjut menyebabkan reaksi berubah ke arah hidrolisis sehingga asam lemak ω -3 dapat mengalami hidrolisis dari struktur fosfolipid yang sudah diinkorporasinya. Reaksi enzimatis merupakan reaksi hidrodinamis. Ketersediaan air yang cukup dalam sistem reaksi akan mendorong reaksi ke arah hidrolisis. Hasil penelitian Reddy dkk. (2005) menunjukkan bahwa tingkat inkorporasi asam palmitat dan stearat pada PC maksimum

pada lama reaksi 24 jam. Peningkatan lama reaksi lebih lanjut tidak menyebabkan peningkatan tingkat inkorporasi.

Pada konsentrasi enzim 30% terjadi penurunan tingkat inkorporasi asam lemak ω-3 dengan bertambahnya waktu reaksi asidolisis enzimatis. Diduga kondisi optimum inkorporasi asam lemak ω-3 pada konsentrasi enzim 30% tercapai sebelum 18 jam. Hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009) menunjukkan bahwa kondisi optimum tercapai pada lama reaksi 24 jam 28 menit pada konsentrasi enzim 20% dengan fosfolipid yang digunakan adalah fosfolipid serat sawit dan konsentrat asam lemak ω-3 yang digunakan berasal dari minyak hasil samping pengalengan tuna. Jenis fosfolipid yang berbeda tampaknya mempengaruhi tingkat inkorporasi EPA+DHA pada struktur fosfolipid.

Derajat inkorporasi EPA dan DHA dari penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009) dengan fosfolipid serat sawit dan konsentrat asam lemak ω-3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna adalah 11,11% dan 19,34% dengan derajat inkorporasi EPA+DHA 30,45%. Prediksi respon pada kondisi optimum dari penelitian tersebut adalah 412,41 mg/100 g. Pada penelitian ini, tingkat inkorporasi EPA+DHA pada struktur fosfolipid lebih rendah yaitu 127,47 mg/g pada konsentrasi enzim 30% dan lama reaksi 18 jam. Perbedaan jenis fosfolipid dan jenis konsentrat asam lemak ω-3 yang digunakan tampaknya mempengaruhi tingkat inkorporasi.

Lipase dari *Rizomucor meihei* yang digunakan pada sintesis asidolisis enzimatis ini mempunyai preferensi untuk menggabungkan asam lemak sangat tidak jenuh pada struktur fosfolipid dan mempunyai preferensi untuk menghidrolisis asam lemak jenuh dan monoenoat. Tingkat inkorporasi EPA dan DHA yang tinggi disebabkan kedua jenis asam lemak ini mempunyai kadar yang paling tinggi pada minyak kaya asam lemak ω-3 sebagai sumber asil. Derajat inkorporasi DHA lebih tinggi dari EPA karena kadar DHA dalam minyak kaya asam lemak ω-3 lebih tinggi.

Fenomena yang berbeda terjadi pada konsentrasi enzim 40% yaitu peningkatan lama reaksi asidolisis enzimatis menyebabkan kadar EPA+DHA (mg/g) meningkat kemudian menurun. Konsentrasi enzim 40% dan lama reaksi 24 jam menghasilkan tingkat inkorporasi EPA+DHA yang paling tinggi berdasarkan berat (Gambar 1) tetapi bukan yang paling tinggi berdasarkan persentase relatif asam lemak (Tabel 5). Kadar enzim 40% cukup memfasilitasi reaksi asidolisis enzimatis sehingga asam lemak bebas pada awal reaksi cepat terhidrolisis dari struktur fosfolipid yang kemudian diikuti dengan esterifikasi atau sintesis asam lemak ω-3 pada struktur fosfolipid atau lisofosfolipid yang sudah terhidrolisis. Hal ini yang diduga menyebabkan tingkat inkorporasi asam lemak ω-3 menjadi tinggi.

Tabel 5. Komposisi asam lemak (%) fosfolipid terstruktur pada berbagai konsentrasi enzim dan lama reaksi

Jenis	18 jam			24 jam			36 jam		
	20%	30%	40%	20%	30%	40%	20%	30%	40%
C12:0	0,09	0,10	0,07	0,15	0,34	0,05	0,54	-	0,06
C14:0	3,83	3,36	3,97	3,75	4,29	5,79	3,92	3,89	3,64
C16:0	7,25	7,36	8,09	7,56	7,65	8,68	8,14	7,53	7,17
C18:0	2,00	1,73	1,86	1,87	2,02	1,93	2,09	1,66	1,86
C18:1	24,80	23,77	25,37	24,30	21,48	25,30	25,12	24,00	24,63
C18:2	9,20	9,63	10,17	10,22	10,13	10,11	10,49	10,80	10,31
C18:3	1,75	1,78	1,49	1,58	1,87	1,97	1,45	1,67	1,62
C20:4	0,51	1,23	0,70	0,77	0,63	0,13	1,86	0,63	0,76
EPA	8,86	8,40	8,31	8,93	9,62	8,34	8,15	9,03	8,42
DHA	41,72	42,64	39,96	40,86	41,96	37,70	38,24	40,79	41,52
EPA+DHA	50,57	51,04	48,27	49,79	51,58	46,04	46,39	49,82	49,94

Tabel 5 menunjukkan komposisi asam lemak fosfolipid terstruktur pada berbagai lama reaksi dan konsentrasi enzim. Tingkat inkorporasi EPA+DHA berkisar antara 48-52%. Jika dibandingkan hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009), tingkat inkorporasi EPA+DHA yang menggunakan konsentrat asam lemak ω-3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna pada fosfolipid serat sawit adalah 30,45%, lebih rendah dari hasil penelitian ini. Kemungkinan komposisi atau jenis-jenis fosfolipid yang menyusun fosfolipid kedelai dan serat sawit berbeda sehingga derajat inkorporasi juga berbeda.

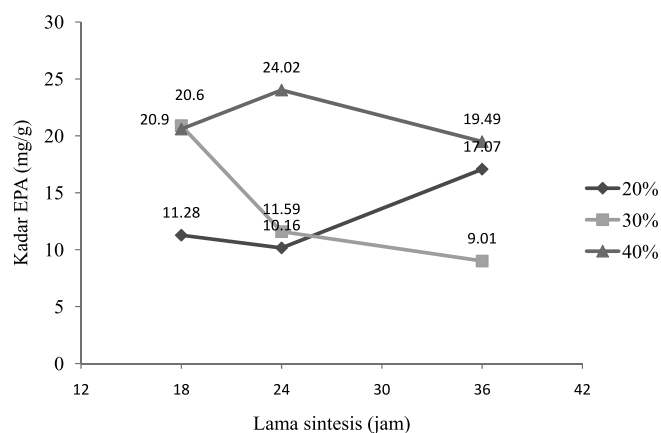
Dari Tabel 5 terlihat bahwa tingkat inkorporasi tertinggi berdasarkan persentase asam lemak adalah pada konsentrasi enzim 30% dan lama reaksi 24 jam. Hal ini berbeda dengan tingkat inkorporasi tertinggi berdasarkan kadar EPA+DHA (mg/g) yang telah dijelaskan sebelumnya. Perbedaan tersebut disebabkan persentase relatif dipengaruhi oleh jenis-jenis asam lemak yang teridentifikasi dalam kromatogram.

Gambar 2 dan 3 menunjukkan bahwa tingkat inkorporasi DHA (berdasarkan berat atau mg/g) lebih tinggi dibandingkan EPA. Pada konsentrat asam lemak ω-3 yang digunakan, kadar DHA lebih tinggi dibandingkan EPA. Demikian pula pada minyak ikan asal. Menurut Howe dkk. (2002), minyak ikan tuna mengandung DHA yang lebih tinggi dari EPA.

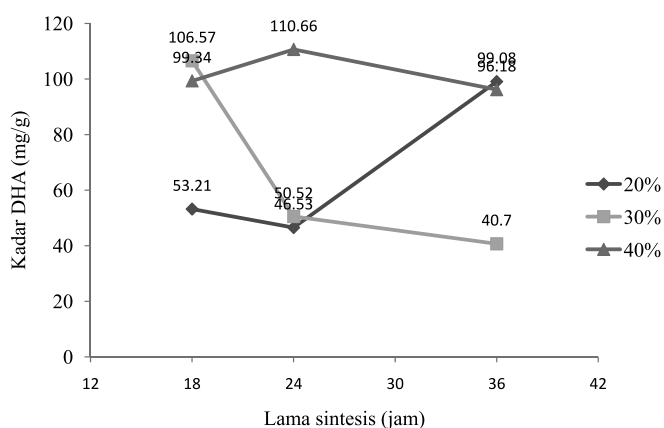
Kadar DHA yang lebih tinggi dari EPA menyebabkan kemungkinan penggunaan fosfolipid terstruktur yang dihasilkan menjadi spesifik untuk mendapatkan asupan DHA. EPA dan DHA mempunyai fungsi dalam tubuh yang sedikit berbeda. DHA merupakan asam lemak ω-3 yang paling banyak terdapat dalam jaringan otak dan retina yang tidak dapat diganti oleh asam lemak yang lain. Perkembangan otak manusia membutuhkan jumlah DHA yang berlimpah (Spector, 1999; Crawford dkk., 1999; Rotstein dkk., 1999) untuk perkembangan yang optimum (Nettleton, 1995). Pada

masa balita DHA bersifat esensial untuk perkembangan otak dan retina (Uauy dan Hoffman, 2000).

EPA berperan pada pembentukan eikosanoid yaitu perannya dengan cara mengganti asam arakhidonat sebagai substrat eikosanoid sehingga mengubah ekspresi gen peradangan. Mekanisme ini digunakan untuk percepatan pemulihan pasien pasca operasi yang kritis melalui nutrisi enteral dan parenteral (Calder, 2004), kesehatan kardiovaskular, fungsi kekebalan, pencegahan peradangan, penglihatan, kesehatan mental, dan beberapa kondisi kronis lainnya (Huang dkk., 2004; Nettleton, 2005). EPA juga dapat menurunkan gejala depresi (Tiemeier dkk., 2003). Dengan demikian rekomendasi penggunaan fosfolipid terstruktur dari hasil penelitian ini jika digunakan sebagai suplemen pangan atau pengembangan pangan fungsional adalah sesuai dengan fungsi DHA.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi enzim dan lama asidolisis enzimatis terhadap tingkat inkorporasi EPA pada fosfolipid



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi enzim dan lama asidolisis enzimatis terhadap tingkat inkorporasi DHA pada fosfolipid

Profil Asam Lemak Jenis-jenis Fosfolipid dalam Fosfolipid Terstruktur

Hasil pemisahan fosfolipid terstruktur dari kondisi reaksi terbaik, yaitu lama reaksi 18 jam dan konsentrasi enzim 30%, menunjukkan terdapat empat jenis fosfolipid. Masing-masing jenis fosfolipid tersebut adalah fosfatidilinositol (PI), fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), dan asam fosfatidat (PA). Dari Tabel 6 terlihat perbedaan derajat inkorporasi asam lemak ω -3 (EPA+DHA) pada masing-masing jenis fosfolipid. Jika dibandingkan tingkat inkorporasi EPA+DHA dari fosfolipid terstruktur hasil sintesis 18 jam dengan konsentrasi enzim 30% yaitu 51,04%, terlihat bahwa tingkat inkorporasi EPA+DHA pada masing-masing jenis fosfolipid lebih rendah. Rendahnya tingkat inkorporasi pada masing-masing jenis fosfolipid, diduga disebabkan sebagian asam lemak ω -3 diinkorporasikan pada struktur trigliserida atau tetap ada dalam asam lemak bebas yang tidak terbuang pada proses pencucian. Hal ini yang menyebabkan kadar EPA+DHA lebih tinggi dalam fosfolipid terstruktur karena ketika jenis asam lemak dianalisis trigliserida dan asam lemak bebas yang tersisa ikut teranalisis walaupun sebelumnya telah dilakukan penghilangan keduanya.

Tabel 6. Profil asam lemak jenis-jenis fosfolipid terstruktur dari lama reaksi asidolisis enzimatis 18 jam dan konsentrasi enzim 30%

Jenis Asam Lemak	PI	PC	PE	PA
C12:0	13,20	3,29	4,03	4,21
C14:0	10,19	3,60	5,46	5,52
C16:0	10,95	23,52	12,10	12,93
C16:1	6,52	4,08	7,25	6,65
C18:0	2,18	5,74	4,63	4,12
C18:1	17,32	23,43	17,85	19,66
C18:2	7,34	7,32	6,52	7,07
C18:3	-	1,28	1,55	1,22
C22:0	1,99	1,85	3,13	2,65
C22:1	-	-	0,45	0,49
EPA	5,10	4,53	7,46	7,05
C24:0	1,77	1,76	2,34	2,20
DHA	23,43	19,61	27,24	26,25
EPA+DHA	28,52	24,14	34,70	33,30

Keterangan: PI = fosfatidilinositol
 PC = fosfatidilkolin
 PE = fosfatidiletanolamin
 PA = asam fosfatidat

Dari hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009) EPA dan DHA juga diinkorporasikan pada struktur lipid netral atau trigliserida dengan derajat inkorporasi yang lebih tinggi dibandingkan inkorporasi pada jenis-jenis fosfolipid, kecuali jika sumber asil adalah konsentrat asam lemak ω -3

dari hasil samping penepungan lemuru. Menurut Harraldsson dan Thorarensen (1999), kecepatan reaksi asidolisis fosfolipid lebih rendah dibandingkan fosfolipid. Hal ini disebabkan fosfolipid mempunyai *zwitter ion* pada gugus kepalanya.

Dari Tabel 6 terlihat bahwa tingkat inkorporasi tertinggi terdapat pada fosfatidiletanolamin (PE). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009) dengan jenis fosfolipid yang digunakan adalah fosfolipid serat sawit. Vikbjerg dkk. (2005) menyatakan bahwa jenis fosfolipid mempengaruhi kemampuannya untuk diinkorporasi asam kaprilat untuk reaksi asidolisis yang dikatalis Lipozyme TL IM. Reaktivitas tersebut mengikuti urutan PC>PE>PI>PS. Dari hasil penelitian ini dengan menggunakan fosfolipis kedelai komersial ada perbedaan preferensi jenis fosfolipid untuk diinkorporasi oleh EPA atau DHA. Secara umum, inkorporasi pada PE menempati urutan tertinggi diikuti PA, PI, dan PC. Inkorporasi yang terendah terdapat pada PC. Hasil penelitian sebelumnya (Estiasih dkk., 2009), fosfolipid terstruktur dari fosfolipid serat sawit dan konsentrat asam lemak ω -3 dari minyak hasil samping penepungan lemuru tidak terdeteksi inkorporasi pada PC. Kemungkinan sifat PC yang bermuatan positif pada gugus kolin menyebabkan ada hambatan untuk inkorporasi pada strukturnya. Ada perbedaan preferensi jenis fosfolipid untuk diinkorporasi oleh EPA atau DHA. Secara umum, inkorporasi pada PE menempati urutan tertinggi diikuti PG dan PA.

Tampaknya penggabungan EPA dan DHA pada struktur fosfolipid kedelai bersifat acak dengan preferensi penggabungan pada PE. Gugus kepala pada PE adalah etanolamin. Gugus kepala ini dapat mengion menjadi bermuatan positif. Dibandingkan dengan PC, gugus kepala PE lebih sederhana. Diduga, susunan geometri molekul mempengaruhi kemudahan EPA dan DHA untuk diinkorporasikan pada struktur fosfolipid. Adanya gugus kepala ini yang menjadi alasan mengapa derajat inkorporasi pada fosfolipis lebih rendah dibandingkan lipid netral.

KESIMPULAN

Kondisi terbaik untuk sintesis fosfolipid terstruktur dari fosfolipid kedelai komersial dan minyak kaya asam lemak ω -3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna adalah lama reaksi 18 jam dan konsentrasi enzim 30%. Konsentrasi enzim berpengaruh terhadap tingkat inkorporasi EPA dan DHA, sedangkan lama reaksi tidak berpengaruh. Pada konsentrasi enzim yang rendah, tingkat inkorporasi menurun kemudian meningkat dengan bertambahnya waktu reaksi asidolisis. Sebaliknya pada konsentrasi enzim tinggi, tingkat inkorporasi meningkat kemudian menurun dengan bertambahnya lama

reaksi asidolisis. Tingkat inkorporasi DHA lebih tinggi dari EPA karena kadar DHA yang lebih tinggi dibandingkan EPA dalam minyak kaya asam lemak ω -3. Tingkat inkorporasi DHA yang lebih tinggi dari EPA menyebabkan fosfolipid terstruktur yang dihasilkan sangat sesuai digunakan untuk produk pangan yang memerlukan kadar DHA tinggi. EPA dan DHA mempunyai preferensi untuk digabungkan pada struktur fosfatidiletanolamin dibandingkan jenis-jenis fosfolipid yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Adlercreutz, D. dan Wehtje, E. (2004). An enzymatic method for the synthesis of mixed-acid phosphatidylcholine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **81**: 553-557.
- Ahmadi, K. (2006). Optimasi kristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan minyak kaya asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *Agritek* **XIV**: 580-593.
- Aura, A.-M., Forsell, P., Mustranta, A. dan Poutanen, K. (1995). Transesterification of soy lecithin by lipase and phospholipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72**: 1375-1379.
- Calder, P.C. (2004). n-3 fatty acids, inflammatory, and immunity relevance to post-surgical and critically ill patients. *Lipids* **39**: 1147-1161.
- Christie, W.W. (1982). *Lipid Analysis*. 2nd ed Pergamon Press, USA.
- Colbert, L.B. (1998). Lecithin tailored to your emulsification needs. *INFORM* **43**: 686-688.
- Crawford, M.A., Bloom, M., Broadhurst, C.I., Schmidt, W.F., Cunnane, S.C., Galli, C., Gehbremeskel, K., Linseisen, F., Llyod-Smith, J. dan Parkington, J. (1999). Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids* **34**: S39-S45.
- Das, S. dan Bhattacharyya, D.K. (2006). Preparation and surface- active properties of hydroxy and epoxy fatty acid-containing soy phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**: 1015-1020.
- Estiasih, T., Ahmadi, K. dan Nisa, F.C. (2009). *Sintesis Pengemulsi Mengandung Asam Lemak ω -3 dari Hasil Samping Pengolahan Ikan dan Kelapa Sawit*. Laporan Tahun II, Insentif Riset Dasar. LPPM Universitas Brawijaya, Malang.

- Estiasih, T., Ahmadi, K., Sunarharum, W.B. dan Destryana, R.A. (2011). Saponifikasi dan ekstraksi satu tahap untuk ekstraksi minyak tinggi linoleat dan linolenat dari kedelai varietas lokal. *Agritech* **31**: 36-45.
- Hara, F., Nakashima, T. dan Fukuda, H. (1997). Comparative study of commercially available lipases in hydrolysis reaction of phosphatidylcholine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**: 1129-1132.
- Haraldsson, G.G. dan Thorarensen, A. (1999). Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **76**: 1143-1149.
- Hosokawa, M., Takahashi, K., Miyazaki, N., Okamura, K. dan Hatano, M. (1995). Application of water mimics on preparation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid containing glycerolipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72**: 421-425.
- Howe, P.R.C., Downing, J.A., Grenyer, B.F.S., Grigonis-Deane, E.M. dan Bryden, W.L. (2002). Tuna fishmeal as a source of DHA for n-3 PUFA enrichment of pork, chicken, and eggs. *Lipids* **37**: 1067-1076.
- Huang, M.T., Ghai, G. dan Ho, C.T. (2004). Inflammatory process and molecular targets for anti-inflammatory nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **3**: 127-139.
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Casteraa, A. dan Guillou, A.L. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **80**: 1209-1215.
- Lin, J-T., Wani, S., He, X., Nguyen, T. dan McKeon, T.A. (2005). Incorporation of laurate and hydroxylaurate into phosphatidylcholines and acylglycerols in castor microsomes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **82**: 495-499.
- Lyberg, A-M., Fasoli, E. dan Adlercreutz, P. (2005). Monitoring the oxidation of docosahexaenoic acid in lipids. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **40**: 969-979.
- Mustranta, A., Suorti, T. dan Poutanen, K. (1994). Transesterification of phospholipids in different reaction conditions. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **71**: 1415-1419.
- Nasir, M.I., Bernards, M.A. dan Charpentier, P.A. (2007). Acetylation of soybean lecithin and identification of components for solubility in supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **55**: 1961-1969.
- Nettleton, J.A. (1995). *Omega-3 Fatty Acids and Health*. Chapman & Hall, New York.
- Nettleton, J.A. (2005). Omega-3 fatty acids in food and health. *Food Technology* **59**:120.
- Nzai, J.M. dan Proctor, A. (1998). Phospholipids determination in vegetable oil by thin layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chemistry* **63**: 571-576.
- Park, P.W. dan Goins, R.E. (1994). In situ preparation of fatty acids methyl ester for analysis of fatty acids composition in foods. *Journal of Food Science* **59**: 1262-1266.
- Reddy, J.R.C., Vijeeta, T., Karuna, M.S.L., Ra, B.V.S.K. dan Prasad, R.B.N. (2005). Lipase-catalyzed preparation of palmitic and stearic acid-rich phosphatidylcholine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **82**: 727-730.
- Sanibal, E.A.A. dan Mancini-Filho, J. (2004). Frying oil and fat quality measured by chemical, physical, and test kit analyses. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **81**: 847-852.
- Spector, A.A. (1999). Essentiality of fatty acids. *Lipids* **34**: s1-s3.
- Tiemeier, H., van Tuije, H.R., Hofman, A., Kilian, A.J. dan Breteler, M.M.B. (2003). Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **78**: 40-46.
- Uauy, R. dan Hoffman, D.R. (2000). Essential fat requirements of preterm infants. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**: 245S-250S.
- Vikbjerg, A.F., Mu, H. dan Xu, X. (2005). Monitoring of monoctanoylphosphatidylcholine synthesis by enzymatic acidolysis between soybean phosphatidylcholine and caprylic acid by thin-layer chromatography with a flame ionization detector. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **53**: 3937-3942.
- Vikbjerg, A.F., Rusig, J-Y., Jonsson, G., Mu, H. dan Xu, X. (2006). Comparative evaluation of the emulsifying properties of phosphatidylcholine after enzymatic acyl modification. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **54**: 3310-3316.
- Wang, G. dan Wang, T. (2008). Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **56**: 11424-11431.

Wu, Y. dan Wang, T. (2004). Fractionation of crude soybean lecithin with aqueous ethanol. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **81**: 697–704.