

**PENAMBAHAN PELARUT ORGANIK PADA MEDIA UNTUK HIDROLISIS ENZIMATIK MINYAK IKAN MENGGUNAKAN LIPASE DARI *Aspergillus niger***

**ADDITION OF ORGANIC SOLVENTS TO THE MEDIA FOR THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF FISH OIL BY USING *Aspergillus niger* LIPASE**

Sapta Raharja<sup>1)\*</sup>, Ono Suparno<sup>1</sup>, Djumali Mangunwidjaja<sup>1</sup>, Alamanda Herdiyani<sup>2</sup>,  
Teni Oktavia<sup>3</sup>, Zulfatun Najah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
Kampus IPB Darmaga Bogor, PO BOX 220 BOGOR 16001

Email: saptaraharja@ipb.ac.id

<sup>2</sup>PT. Bank HSBC

<sup>3</sup>Dinas Pertanian Kabupaten Kudus

**ABSTRACT**

*Fish oil is one of important fatty acid sources that contains Omega-3 polyunsaturated fatty acid such as eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA). Omega-3 fatty acid in acylglycerol form (monoester) is considered better as food chemical form because it is digested easily by human digestive system. In this research, monoester was produced using Aspergillus niger lipase which cut the acylglycerol chain in the sn (1) and (3). Organic solvent especially hydrophobic solvent was used in the hydrolysis to increase the catalytic activity of the enzyme. The hydrophobic solvent used in this research had hydrophobicities between 2 until 4, such as toluene, hexane, and heptane. The objective of this research was to determine temperature, pH, and percentage of water added which produce the highest degree of hydrolysis in the presence of organic solvent. The correlation between the yield and the amount of omega-3 was also investigated. The variables used were temperature (25-65°C), pH (5-9) and water addition (1-5%V/V). In the toluene media, the highest degree of enzymatic hydrolysis reached 15.69% at 45°C, pH 5, and water addition of 1%V/V. In the hexane media, it reached 75.12% at 45°C, pH 5, and water addition of 5%V/V, and in the presence of heptane, it reached 23.94% at 25°C, pH5, and water addition of 1%V/V. Meanwhile, in the presence of toluene, it showed 3, 01% of total omega-3 that all of them was EPA. In the hexane media, total omega-3 was 21.93% with EPA amount of 17.75% and DHA of 1.21% and in the heptane media, total omega-3 was 12.1% with amount of EPA of 10.23%, and DHA of 1.87%. According to degree of hydrolysis, it can be concluded that hexane gave the best result for the enzymatic hydrolysis of fish oil by the lipase with addition of organic solvent.*

*Keywords: fish oil, lipase, organic solvent, Omega-3, EPA, DHA*

**ABSTRAK**

Minyak ikan merupakan sumber asam lemak penting yang mengandung asam lemak tak jenuh (ikatan rangkap) seperti asam eikosapentanoat (EPA) dan asam dokosaheksanoat (DHA). Dalam penelitian ini, asam lemak dihidrolisis menggunakan lipase dari *Aspergillus niger* yang memotong ikatan asilgliserol pada *sn* (1) dan (3). Pelarut organik khususnya pelarut hidrofobik digunakan pada reaksi hidrolisis ini untuk meningkatkan aktivitas katalitik enzim. Pelarut organik yang digunakan pada penelitian ini memiliki tingkat hidrofobisitas antara 2 sampai 4 seperti toluena, heksana, dan heptana. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan suhu, pH, dan persentase penambahan air yang dapat menghasilkan tingkat hidrolisis tertinggi pada reaksi yang ditambahkan pelarut organik. Penelitian ini juga bertujuan untuk menganalisis hubungan antara tingkat hidrolisis dengan total omega-3. Variabel yang digunakan adalah suhu (25-65°C), pH (5-9) dan penambahan air (1-5% V/V). Tingkat hidrolisis tertinggi pada reaksi yang ditambahkan toluena mencapai 15,69% pada suhu 45°C, pH 5, dan penambahan air 1%. Pada media yang ditambahkan heptana, tingkat hidrolisis mencapai 23,94% pada suhu 25°C, pH 5, dan penambahan air 1% V/V, namun pada penambahan heksana mencapai 75,12% pada suhu 45°C, pH 5, dan penambahan air 5% V/V. Konsentrasi total asam lemak omega-3 pada media yang ditambahkan toluena menunjukkan 3,01% total omega-3 yang semuanya adalah asam eikosapentanoat (EPA). Pada media yang ditambahkan heksana, total omega-3 sebanyak 21,93% dengan konsentrasi EPA 17,75% dan DHA 1,21%. Pada media heptana, total omega-3 sebanyak 12,1% dengan konsentrasi EPA 10,23% dan DHA 1,87%. Berdasarkan tingkat hidrolisis minyak ikan pada media yang direkayasa, maka pelarut organik yang terpilih adalah heksana.

Kata kunci: minyak ikan, lipase, pelarut organik, Omega-3, EPA, DHA

**PENDAHULUAN**

Minyak ikan mengandung asam lemak tak jenuh dengan ikatan rangkap banyak (PUFA) atau

lebih dikenal dengan nama asam lemak omega-3. Asam lemak tersebut diantaranya adalah asam eikosapentanoat (EPA, 20:5) dengan ikatan rangkap pada posisi *cis* -5,8,11,14,17 dan asam dokosa-

heksanoat (DHA, 22:6) dengan ikatan rangkap pada posisi cis 4,7,10,13,16,19. Asam lemak omega-3 bermanfaat untuk kesehatan diantaranya mencegah penyumbatan pembuluh darah, hipertensi, kanker, arthritis, jantung koroner, inflamasi, efek *hypotriglyceridemic* dan diabetes. Selain itu, asam lemak omega-3 juga sangat penting untuk membantu fungsi kerja otak, terutama untuk proses pertumbuhan dan perkembangan otak (De Busk, 2007).

Untuk pemanfaatan obat-obatan dan makanan, PUFA omega-3 dibuat dalam bentuk yang berbeda seperti asam lemak bebas (FFA), etil ester, atau sebagai asilgliserol. Bentuk asilgliserol dari asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) seperti omega-3 dalam ilmu nutrisi dipertimbangkan lebih baik daripada etilester karena bentuk alkil ester tidak mudah diserap oleh usus, sedangkan asam lemak bebas (FFA) mudah teroksidasi dan tidak dapat dikonsumsi manusia secara langsung. Asilgliserol lebih dipertimbangkan karena lebih mudah diserap dalam sistem pencernaan (Wanasundara dan Shahidi, 1998).

Asilgliserol asam lemak omega-3 diperoleh dari hasil reaksi hidrolisis parsial minyak ikan oleh enzim lipase pada *stereochemical numbering* (*sn*) 1 dan 3. Menurut Haraldson *et al.* (1997), keuntungan penggunaan enzim sebagai katalis dibanding metode fisik atau kimia diantaranya efisiensi katalitik lipase tinggi sehingga jumlah enzim yang dibutuhkan sedikit. Selain itu, daerah selektivitas yang luas di dalam asam lemak, sehingga dikenal baik dan penting untuk diaplikasikan lebih mendalam. Menghilangkan penggunaan katalis anorganik dan bahan kimia berbahaya lainnya, dan bekerja optimal pada kondisi lingkungan ringan, sehingga dapat menghemat energi. Produk yang dihasilkan menggunakan katalis lipase juga lebih tinggi tingkat kemurnian dan kualitasnya baik rasa maupun warnanya.

Menurut Carvalho *et al.* (2009), salah satu jenis lipase yang memberikan hasil hidrolisis selektif terbaik dihasilkan oleh *Aspergillus niger*. Hal tersebut dikarenakan lipase dari *Aspergillus niger* mempunyai spesifisitas posisional memutus ikatan triasilgliserol pada posisi (*sn*)1 dan 3, sehingga dapat menjaga PUFA berupa omega-3 dalam bentuk asilgliserol yang umumnya terletak pada *sn* 2.

Lipase memiliki sisi aktif yang ditutup oleh *lid*. *Lid* lipase khususnya yang berasal dari *Aspergillus niger* tersusun oleh triptofan yang cenderung bersifat hidrofobik. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu pelarut organik yang mempunyai sifat non polar (hidrofobik) sehingga dapat meningkatkan kontak antara pelarut organik hidrofobik dan *lid* lipase yang mampu meningkatkan pembukaan *lid* lipase tersebut. Gupta (2007) menyatakan bahwa penambahan pelarut organik juga meningkatkan termostabilitas, enantio-selektivitas, dan aktifitas lipase. Baharum (2003)

menyatakan bahwa untuk menentukan hidrofobisitas pelarut, beberapa parameter yang dapat digunakan adalah parameter kelarutan *hydrobran*, *solvatochromism of dye*, konstanta dielektrika, momen dipol dan logaritma koefisien partisi ( $\log P$ ). Pelarut organik bersifat hidrofobik dengan nilai kepolaran berada pada rentang penerimaan aktivitas dan stabilitas lipase yaitu antara 2-4 antara lain toluena, heksana, dan heptana. Toluena memiliki nilai  $\log P$  2,5. Heksana memiliki nilai  $\log P$  3,5. Heptana memiliki nilai  $\log P$  4.

Keberhasilan proses hidrolisis menggunakan katalis lipase sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan yang sesuai dan ringan yang dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, penambahan air, konsentrasi substrat, dan adanya senyawa penghambat (Zarevucka dan Wimmer, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan suhu, pH, dan persentase jumlah penambahan air yang menghasilkan tingkat hidrolisis tertinggi pada hidrolisis dengan penambahan pelarut organik serta menentukan hubungan tingkat hidrolisis dengan banyaknya asam lemak omega-3 pada minyak ikan. Medina *et al.* (2003) menyatakan bahwa sedikit air diperlukan untuk mencapai aktivitas maksimal enzim pada pelarut hidrofobik daripada pelarut hidrofilik. Ketika aktivitas katalitik diplotkan terhadap banyaknya air yang terikat dengan enzim, suatu pola muncul untuk beberapa pelarut yang berbeda. Enzim juga sangat sensitif terhadap perlakuan pH media, karena memungkinkan perubahan status ionisasi enzim. Status protonasi sisi rantai asam amino pada sisi aktif kompleks enzim substrat (ES) mungkin akan berubah dan hasilnya adalah perubahan kemampuan enzim substrat untuk menjadi produk. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Saxeena *et al.* (2009), titik isoelektrik lipase dari *Aspergillus niger* adalah 4,3. Termostabilitas enzim merupakan faktor utama pada aplikasi industri. Pada suhu tinggi menyebabkan terjadinya migrasi alkil secara non enzimatik, oksidasi, isomerisasi dan denaturasi enzim.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan antara lain minyak ikan sarden murni yang diperoleh dari PT Muncar, Banyuwangi, Jawa Timur serta lipase dari *Aspergillus niger* yang diperoleh dari Amano Pharmaceutical Manufacturing Co, buffer fosfat (0,1M), nitrogen, pelarut organik heksana, toluena, heptana, dan metanol. Bahan yang digunakan untuk analisis terdiri dari KOH alkohol, toluena, aquades, isopropil alkohol, KOH 0,1N, indikator phenolphthalein, dan HCl 0,5N.

Alat yang digunakan dalam proses hidrolisis antara lain reaktor gelas bertutup karet, *syringe*, dan *shaker waterbath*. Alat pendukung antara lain pH meter, *vortex*, *magnetic stirrer*, *hot*

plate, neraca analitik, shaker tube, dan Gas Chromatography Mass Spectrometry (Agilent Technologies 7890A GC system dengan detector Agilent Technologies 5975C.MSD).

### Karakterisasi Minyak Ikan

Karakterisasi minyak ikan dilakukan untuk mengetahui kondisi awal bahan baku yang akan digunakan dalam proses hidrolisis dengan katalis lipase dari *Aspergillus niger*. Analisa yang dilakukan meliputi pengujian sifat fisiko kimia minyak ikan yaitu bilangan asam dan kadar asam lemak bebas (AOCS Cd 3d-63, 1997) dan bilangan penyabunan (AOCS Cd 3-25, 1997).

### Pengukuran Aktivitas Lipase dengan Metode Spektrofotometri (Sigma Aldrich, 1994)

Pengukuran ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas lipase dari *Aspergillus niger* dalam satuan Unit. Satu Unit aktivitas lipase pada metode spektrofotometri didefinisikan sebagai kemampuan sejumlah enzim untuk membebaskan satu umol *p-nitrophenol* dari *pNP butyrate* sebagai substrat dalam waktu 30 menit pada kondisi pH, komposisi buffer dan suhu 37°C.

Sebanyak 0,45 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup ulir. Kemudian ditambahkan larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7 sebanyak 0,54 mL, dan dikocok dengan shaker tube hingga larutan bercampur rata. Setelah itu, memasukkan ke dalam tabung 0,01 mL larutan *p-nitrophenyl butyrate* 0,2 M, kocok kembali dengan shaker tube hingga larutan bercampur rata. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 410 nm. Blanko dibuat sesuai dengan prosedur untuk sampel tanpa penambahan larutan enzim. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Unit / mL enzim} = \frac{\frac{(A-B)x1}{t}xVtxfp}{KxVe}$$

dimana:

- A = Nilai absorbansi sampel
- B = Nilai absorbansi blanko
- t = Lama inkubasi (menit)
- Vt = Volume total larutan sampel (mL)
- fp = Faktor pengencer
- K = Nilai konversi standar *p-nitrophenyl butyrate* (0,0148 µmol)
- Ve = Volume larutan enzim (mL)

### Hidrolisis Enzimatis Minyak Ikan (Modifikasi dari Metode Wanasundara dan Shahidi, 1998)

Pada penelitian ini dilakukan hidrolisis terhadap minyak ikan dengan katalis lipase dari *Aspergillus niger* dalam dua tahap. Hidrolisis enzimatis yang pertama dilakukan pada media tanpa penambahan pelarut organik dan hanya

menggunakan air sebagai pereaksinya. Pada hidrolisis tahap pertama ini ditentukan suhu dan pH yang memberikan hasil tingkat hidrolisis tertinggi yang akan digunakan pada hidrolisis enzimatis tahap kedua. Variasi suhu yang digunakan adalah 25, 35, 45, 55, 65°C, sedangkan variasi pH yang digunakan adalah pH 5, 6, 7, 8, 9. Setelah diperoleh suhu dan pH yang memberikan hasil terbaik dari penelitian tahap 1, dilakukan penelitian untuk menentukan penambahan air yang memberikan hasil terbaik pada hidrolisis dengan penambahan pelarut menggunakan suhu dan pH dari penelitian tahap pertama. Variasi volume air yang ditambahkan sebanyak 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% terhadap volume total reaksi

Hidrolisis enzimatis tahap kedua dilakukan dengan penambahan pelarut organik pada medianya. Minyak ikan sebanyak 4 g dimasukkan ke dalam wadah gelas (tinggi 7 cm dan diameter 4 cm) dan ditambahkan pelarut organik 2 mL serta air. Pelarut organik yang digunakan adalah toluena, heksana, dan heptana. Persentase penambahan air yang ditambahkan sesuai dengan hasil hidrolisis tahap pertama. Perbandingan antara larutan lipase terhadap pelarut adalah 3:1. Campuran minyak dan pelarut kemudian dibilas dengan gas nitrogen dan ditutup dengan karet serta plastik wrap. Setelah itu, wadah gelas ditempatkan dalam shaker water bath untuk kemudian dihidrolisis selama 48 jam pada kecepatan 200 rpm dengan menyuntikkan 6 mL larutan buffer fosfat 1 M (pH 5, 6, 7, 8, 9) yang didalamnya telah dilarutkan lipase dari *Aspergillus niger* sebanyak 800 Unit (200 U/g substrat). Hidrolisis dilakukan pada berbagai perlakuan suhu yaitu 25, 35, 45, 55, 65°C.

Setelah hidrolisis selesai, larutan ditambahkan 2 mL metanol dan dicampur hingga merata untuk menghentikan aktivitas lipolitik lipase dan kemudian dilakukan analisis produk akhir. Untuk perlakuan kontrol, sama dengan prosedur di atas akan tetapi kedalam campuran reaksi tidak ditambahkan larutan lipase.

### Penentuan Tingkat Hidrolisis (Wanasundara dan Shahidi, 1998)

Minyak ikan hasil hidrolisis enzimatis setelah 48 jam kemudian dianalisis bilangan asam sesuai dengan metode AOCS Cd 3d-63. Nilai bilangan asam diperoleh setelah hidrolisis digunakan untuk menentukan tingkat hidrolisisnya. Adapun persamaan perhitungan untuk menentukan tingkat hidrolisis adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Tingkat Hidrolisis} = \frac{(B - A)}{(P - A)} \times 100\%$$

dimana:

- A = Nilai bilangan asam sebelum hidrolisis (mg KOH/mg minyak)
- B = Nilai bilangan asam setelah hidrolisis (mg KOH/mg minyak)

P = Nilai bilangan penyabunan (mg  
KOH/mg minyak)

### Analisis Komponen Minyak Hasil Hidrolisis Menggunakan GC-MS (Modifikasi Dari Metode Wanasundara dan Shahidi, 1998)

Hasil hidrolisis minyak ikan dilakukan pemisahan berdasarkan sifat kepolarannya dengan menempatkan hasil hidrolisis kedalam labu pemisah. Air, gliserol, dan lipase yang cenderung polar akan menempati lapisan paling bawah untuk kemudian dipisahkan dan dibuang. Pelarut, asam lemak pada asilgliserol yang bersifat polar akan berada pada lapisan atas karena bersifat non polar. Asam lemak yang ikut bersama pelarut tersebut kemudian diukur total asam lemak omega-3 menggunakan *gas chromatography mass spectrometry* (GC-MS). Sebanyak 1 $\mu$ L fraksi minyak yang ada dalam pelarut diinjeksikan ke dalam GC-MS untuk dilakukan analisis terhadap kandungan total asam lemak omega-3.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakterisasi Minyak Ikan

Karakterisasi minyak ikan dilakukan untuk mengetahui kondisi awal bahan baku. Hasil karakterisasi minyak ikan disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1, kadar asam lemak bebas dalam minyak ikan hasil pengujian nilainya cukup rendah yaitu 1,49%. Dengan demikian nilai bilangan asam dan kadar asam lemak bebas yang diperoleh sesuai dengan standar mutu untuk minyak ikan berkualitas baik.

Bilangan penyabunan menunjukkan jumlah asam lemak yang tersabunkan di dalam minyak. Nilai bilangan penyabunan akan digunakan sebagai dasar untuk menentukan besarnya tingkat hidrolisis pada saat pengujian. Berdasarkan analisis terhadap bahan baku yang digunakan, nilai bilangan penyabunan yang diperoleh adalah 204,81 mg KOH/g. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan bilangan penyabunan minyak ikan yang digunakan dalam penelitian Celik (2002) yaitu sebesar 187,4 mg KOH/g. Perbedaan ini dikarenakan minyak ikan yang digunakan dalam penelitian

berbeda. Tingkat kemurnian minyak ikan pada industri kecil di Banyuwangi berbeda dengan minyak ikan dari industri besar seperti yang digunakan dalam penelitian Celik (2002). Perbedaan diduga dikarenakan asam lemak pada sampel cukup tinggi sehingga nilai bilangan penyabunannya lebih tinggi.

Hasil analisa menggunakan GC-MS, asam lemak tak jenuh yang terdapat pada minyak ikan sebesar 34,98% dimana sebagian besar merupakan asam lemak tidak jenuh dengan satu ikatan rangkap (*monounsaturated fatty acid*) dengan persentase 33,17%, sedangkan asam lemak jenuh (*saturated fatty acid*) sebesar 23,24%, sisanya adalah alkana (11,19%), aldehid (0,88%), squalene (4,8%), dan lanosterol (24,96%) (Gambar 1).

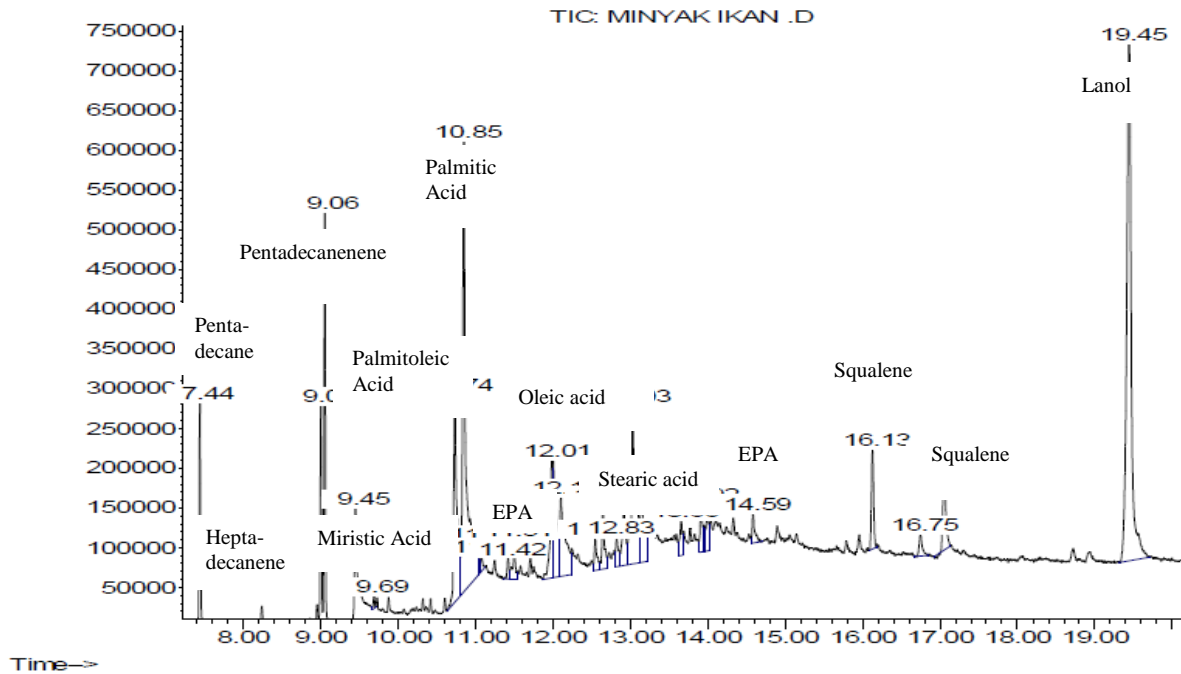
### Hubungan Antara Penambahan Air dengan Tingkat Hidrolisis pada Hidrolisis dengan Penambahan Pelarut

Pada proses hidrolisis, walaupun penggunaan pelarut organik sebagai media, sejumlah air tetap dibutuhkan untuk mengaktifkan sisi aktif dari enzim. Selain itu, air di sini juga dibutuhkan sebagai salah satu pereaksi dalam hidrolisis. Pada media bifase, monogliserida dan digliserida relatif lebih stabil terhadap migrasi asil pada pelarut organik dengan penambahan air maksimum 2% (Schneider dan Berger, 1991). Hidrolisis minyak merupakan reaksi kesetimbangan yang memungkinkan terjadinya perubahan arah reaksi ke pembentukan produk dengan cara mengatur penambahan air dalam sistem (Kurashige *et al.*, 1993). Hubungan tingkat hidrolisis dengan penambahan air pada reaksi hidrolisis dengan penambahan pelarut terlihat pada Gambar 2.

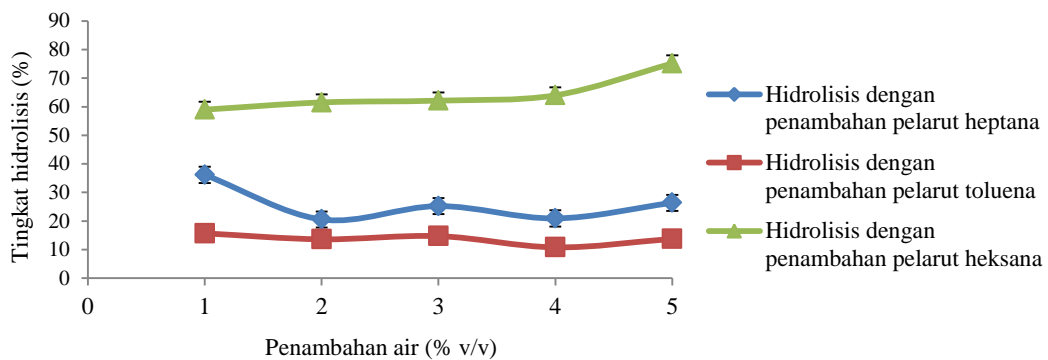
Perbedaan nilai tingkat hidrolisis tidak terlalu signifikan pada berbagai tingkat penambahan air. Penambahan air sebesar 1% V/V sistem reaksi merupakan kondisi terbaik pada sampel yang menggunakan pelarut heptana dan toluena, dimana tingkat hidrolisis tertinggi berada pada nilai 22,56% dan 15,69%, sedangkan pada pelarut heksana, tingkat hidrolisisnya sebesar 75,15% pada penambahan air 5%.

Tabel 1. Hasil karakterisasi sifat fisikokimia minyak ikan

Karakterisasi	Satuan	Hasil analisis	Celik (2002)	Jedwards Int Inc (2005)
Bilangan asam	(mg KOH/mg minyak)	3,29	10,15	1,5
Kadar asam lemak bebas	%	1,49	4,6	0,69
Bilangan penyabunan	(mg KOH/mg minyak)	204,81	187,4	180



Gambar 1. Hasil peak area analysis GC-MS minyak ikan



Gambar 2. Kurva hubungan antara penambahan air dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media dengan penambahan pelarut (suhu 45°C, pH 5, 800 U enzim/4 g minyak, rasio larutan:pelarut 6 mL:2 mL)

Jumlah air yang diperlukan untuk mencapai tingkat hidrolisis tertinggi menunjukkan banyaknya air yang dibutuhkan pada penambahan pelarut hidrofobik. Oleh sebab itu, lipase tetap dapat mengaktifkan sisi katalitiknya dan memelihara konformasi alaminya (struktur tiga dimensi) supaya terjadi migrasi asil ester ke arah pembentukan produk dengan parameter asam lemak bebas yang meningkat. Dari berbagai variasi kondisi suhu, pH, dan penambahan air diketahui nilai tingkat hidrolisis tertinggi adalah pada penambahan pelarut heksana, yaitu pada pH 5, penambahan air 5% V/V, dan suhu 45°C (Gambar 2).

### Hubungan Antara Suhu dengan Tingkat Hidrolisis pada Hidrolisis dengan Penambahan Pelarut

Hubungan antara suhu dengan tingkat hidrolisis pada pelarut organik ditunjukkan oleh Gambar 3. Penambahan pelarut heksana menghasilkan tingkat hidrolisis tertinggi yaitu pada kondisi suhu 45°C sebesar 74,83%. Pada penambahan pelarut toluena, dihasilkan tingkat hidrolisis tertinggi sebesar 11,59% pada suhu 45°C, sedangkan pada penambahan pelarut heptana, suhu terbaik adalah pada 25°C dengan tingkat hidrolisis 23,94%. Penambahan pelarut heksana menghasilkan tingkat hidrolisis enzimatis yang lebih baik,

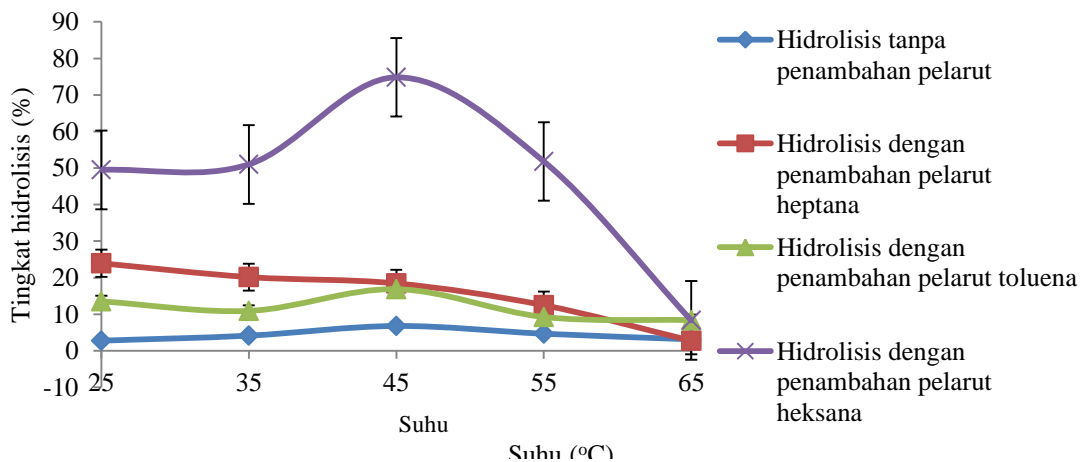
dibandingkan penambahan pelarut lainnya. Hidrolisis dengan penambahan pelarut heksana juga akan meningkatkan aktivitas katalitik enzim bila dibandingkan hidrolisis tanpa penambahan pelarut (Gambar 3).

Selain itu dengan membandingkan antara hasil hidrolisis enzimatis tanpa penambahan pelarut dengan hasil hidrolisis enzimatis dengan penambahan pelarut (Gambar 3), hidrolisis enzimatis dengan penambahan pelarut heksana, heptana, dan toluena ternyata dapat meningkatkan aktivitas katalitik enzim. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rahman *et al.* (2006). Penambahan pelarut heptana dan toluena dapat meningkatkan persentase tingkat hidrolisis dengan jumlah yang sedikit (Gambar 3). Pada penambahan heptana, suhu yang menghasilkan tingkat hidrolisis terbaik berubah dari 45°C menjadi 25°C. Penambahan heptana dapat mengubah stabilitas termal lipase dalam memotong ikatan ester substrat. Tingginya tingkat hidrolisis

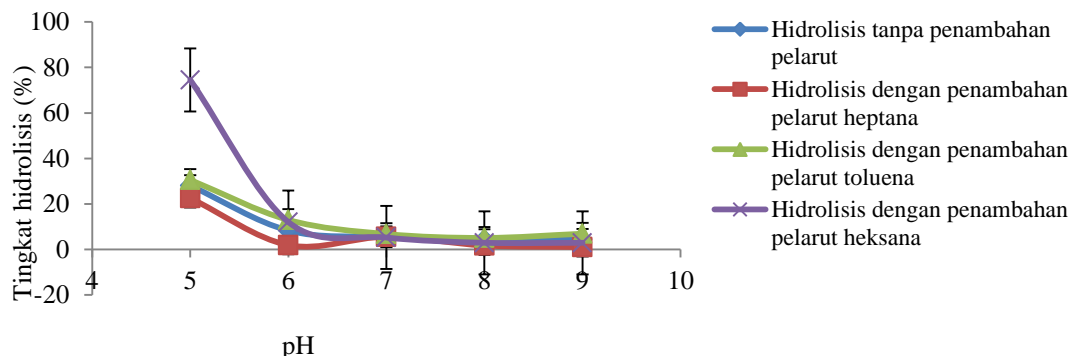
yang diperoleh pada rentang suhu 25°C sampai 65°C tersebut karena pada kondisi lingkungan hidrofobik peningkatan suhu akan meningkatkan kelarutan substrat yaitu minyak ikan ke dalam pelarut organik, sehingga substrat akan dibawa oleh pelarut melalui kantung hidrofobik enzim menuju sisi katalitiknya untuk dihidrolisis. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kieger *et al.* (2004). Kenaikan suhu juga akan menyebabkan peningkatan migrasi asil enzim dari senyawa intermediet asil-enzim ke arah pembentukan produk.

### Hubungan Antara Derajat Keasaman dengan Tingkat Hidrolisis pada Hidrolisis dengan Penambahan Pelarut

Variasi nilai pH yang digunakan dalam percobaan dalam kisaran dari 5 hingga 9. Hubungan antara pH dengan tingkat hidrolisis minyak ikan pada penambahan pelarut organik disajikan pada Gambar 4.



Gambar 3. Kurva hubungan antara suhu dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media dengan penambahan pelarut (pH 5, 800 U enzim/4 g minyak, rasio larutan:pelarut 6 mL: 2mL, kondisi optimum penambahan air).



Gambar 4. Kurva hubungan antara pH (derajat keasaman) dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media dengan penambahan pelarut (suhu 45°C, 800 U enzim/4 g minyak, rasio larutan:pelarut 6 mL:2 mL, kondisi optimum penambahan air).

Terdapat perbedaan yang cukup signifikan dari ketiga jenis pelarut yang ditambahkan (Gambar 4). Tingkat hidrolisis tertinggi dari ketiga penambahan pelarut terjadi pada pH 5. Penambahan pelarut heksana memiliki tingkat hidrolisis tertinggi sebesar 74,12%. Pada penambahan pelarut toluena dan heptana tingkat hidrolisisnya hanya sebesar 22,56% dan 10,66%. Penambahan heksana sebagai media menyebabkan enzim memiliki kemampuan katalitik yang lebih tinggi bila dibandingkan penambahan pelarut lain.

Derajat keasaman merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kinerja dari enzim. Hal ini disebabkan oleh struktur enzim yang merupakan protein atau polimer dari asam amino. Protein memiliki karakteristik mudah terdenaturasi pada pH rendah atau dalam keadaan asam, sedangkan pada kondisi basa (pH tinggi) protein cenderung mengalami inaktif (Suhartono, 1995).

Penambahan pelarut heksana pada hidrolisis enzimatis minyak meningkatkan aktivitas katalitik lipase dari *Aspergillus niger* pada pH optimum (pH 5), peningkatan aktivitasnya sebesar 46,44%. Hal sebaliknya terjadi pada penambahan toluena dan heptana, persentase tingkat hidrolisis yang dihasilkan justru lebih rendah apabila toluena dan heptana ditambahkan.

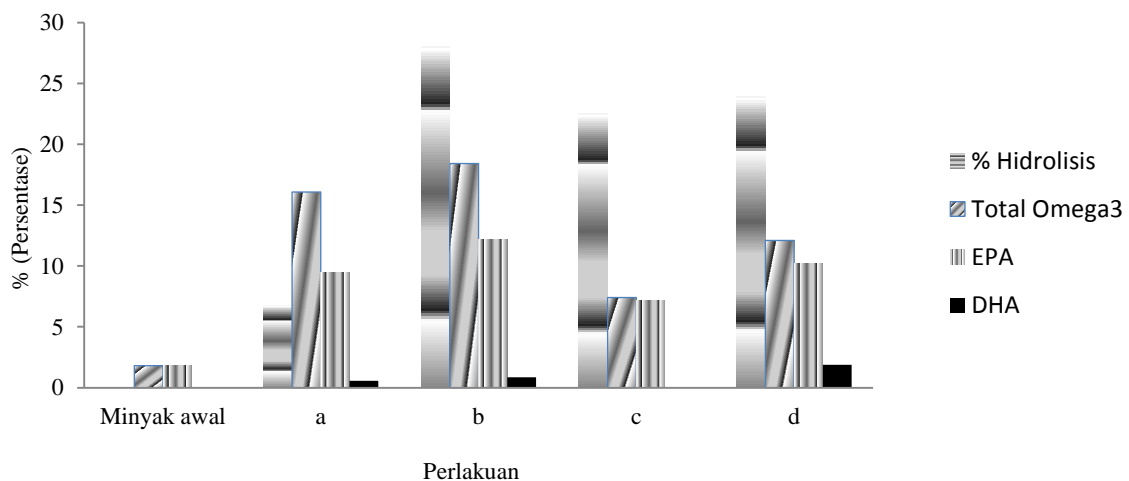
Pelarut organik menghasilkan berbagai efek fisikokimia pada molekul enzim. Pelarut akan mengubah bentuk asli dari enzim. Mekanisme perubahan susunan proteinya adalah dengan mengganggu ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Dengan demikian aktivitas dan stabilitasnya akan berubah (Kim *et al.*, 2000). Menurut Yang *et al.* (1994), pelarut dengan nilai log P < 2 diketahui dapat menurunkan aktivitas enzim. Meskipun nilai log P pelarut toluena dan heptana berada di antara 2 < log P < 4, tampaknya lipase pada

kondisi ini tetap memiliki pengaruh yang sama seperti pelarut dengan nilai log P < 2. Penambahan heksana, dapat meningkatkan aktivitas enzim pada pH 5.

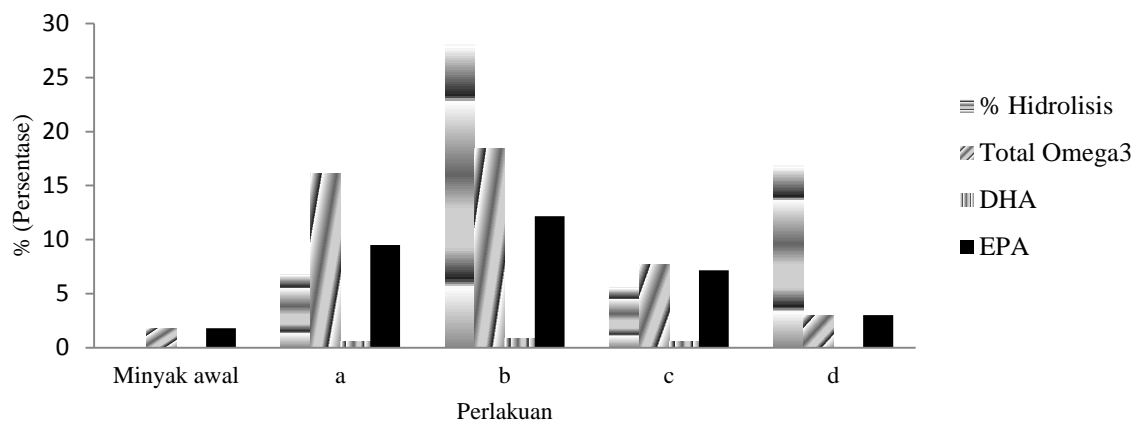
**Hubungan Antara Tingkat Hidrolisis Tertinggi dengan Total Omega-3 yang Dihasilkan**

GC-MS digunakan untuk menentukan total kandungan omega-3. Selain total asam lemak omega-3, analisis juga dilakukan terhadap kandungan EPA dan DHA yang merupakan bentuk asam lemak omega-3 yang penting. Diagram hubungan antara tingkat hidrolisis dengan total omega-3, EPA dan DHA hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan pada kondisi optimum faktor reaksi disajikan pada Gambar 5, 6 dan 7. Hidrolisis enzimatis dapat memperkaya kandungan omega-3 pada kondisi optimum faktor reaksi. Zarevucka dan Wimmer (2008) menyatakan bahwa asam linoleat dapat berubah menjadi asam lemak C<sub>18</sub> yaitu asam  $\alpha$ -linolenat (ALA)  $\omega$ 3 dan asam  $\gamma$ -linolenat  $\omega$ 6, sampai C<sub>20</sub> yaitu asam arachidonat (AA) dan asam dihomo- $\gamma$ -linolenat melalui lintasan biosintesis. Asam  $\alpha$ -linolenat sendiri dapat berubah menjadi asam lemak omega-3 seperti EPA dan DHA.

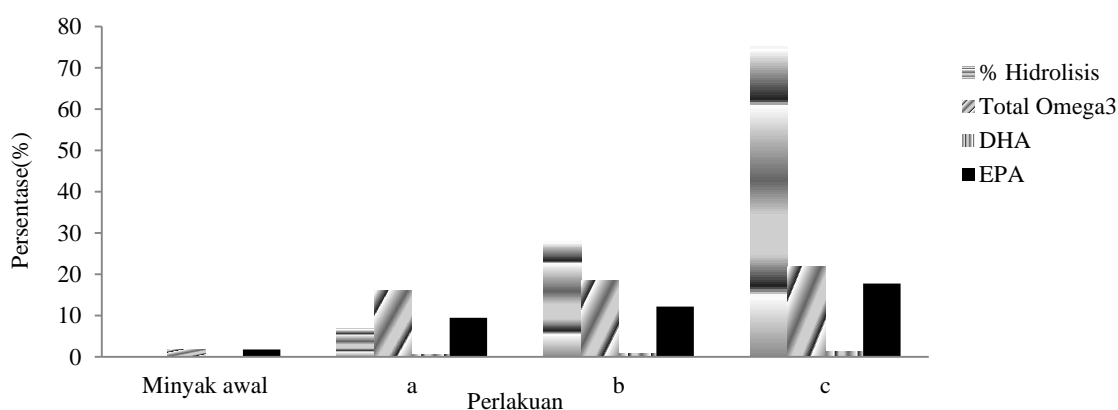
Pada Gambar 5, 6, dan 7 kondisi (A) dan (B), minyak ikan dihidrolisis menggunakan katalis lipase *Aspergillus niger* pada media tanpa penambahan pelarut. Semakin tinggi tingkat hidrolisis, semakin tinggi juga total omega-3 dalam konsentrasi hasil reaksi. Namun, persentase kenaikan total omega-3 terhadap tingkat hidrolisis pada hasil (A) dan (B) tidak signifikan. Penggunaan media hidrolisis dengan pH 5 yang merupakan kondisi optimum bagi aktivitas lipase dari *Aspergillus niger*, menyebabkan kerusakan parsial pada asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) omega-3 yang terbentuk.



Gambar 5. Grafik hubungan antara tingkat hidrolisis total omega-3, total EPA, dan total DHA pada hidrolisis dengan penambahan heptana (a) Hidrolisis enzimatis tanpa penambahan pelarut pada pH 7 dan suhu 45°C, (b). Hidrolisis enzimatis tanpa penambahan pelarut pada pH 5 dan suhu 45°C, (c). Hidrolisis enzimatis dengan penambahan heptana pada pH 5 suhu 45°C, dan penambahan air 1% V/V total reaksi (d) Hidrolisis enzimatis dengan penambahan heptana pada pH 5, suhu 25°C, dan penambahan air 1% V/V total reaksi.



Gambar 6. Grafik hubungan antara tingkat hidrolisis total omega-3, Total EPA, dan Total DHA pada hidrolisis dengan penambahan toluena (a) Hidrolisis enzimatik tanpa penambahan pelarut pada pH 7 dan suhu 45°C, (b). Hidrolisis enzimatik tanpa penambahan pelarut pada pH 5 dan suhu 45°C, (c). Hidrolisis enzimatis dengan penambahan toluena pada pH 5 suhu 45°C, dan penambahan air 1% V/V total reaksi (d) Hidrolisis enzimatik dengan penambahan toluena pada pH 5, suhu 45°C, dan penambahan air 1% V/V total reaksi.



Gambar 7. Grafik hubungan antara tingkat hidrolisis total omega-3, total EPA, dan total DHA pada hidrolisis dengan penambahan heksana (a) Hidrolisis enzimatik tanpa penambahan pelarut pada pH 7 dan suhu 45°C, (b). Hidrolisis enzimatik tanpa penambahan pelarut pada pH 5 dan suhu 45°C, (c). Hidrolisis enzimatik dengan penambahan heksana pada pH 5 suhu 45°C, dan penambahan air 5% V/V total reaksi.

Hidrolisis enzimatik dapat memperkaya kandungan omega-3 pada kondisi optimum faktor reaksi. Zarevucka dan Wimmer (2008) menyatakan bahwa asam linoleat dapat berubah menjadi asam lemak C<sub>18</sub> yaitu asam  $\alpha$ -linolenat (ALA)  $\omega$ 3 dan asam  $\gamma$ -linolenat  $\omega$ 6, sampai C<sub>20</sub> yaitu asam arachidonat (AA) dan asam dihomo- $\gamma$ -linolenat melalui lintasan biosintesis. Asam  $\alpha$ -linolenat sendiri dapat berubah menjadi asam lemak omega-3 seperti EPA dan DHA. Pada Gambar 5, 6, dan 7 kondisi (A) dan (B), minyak ikan dihidrolisis menggunakan katalis lipase *Aspergillus niger* pada media tanpa penambahan pelarut. Semakin tinggi tingkat hidrolisis, semakin tinggi juga total omega-3 dalam konsentrat hasil reaksi. Namun, persentase kenaikan total omega-3 terhadap tingkat hidrolisis pada hasil (A) dan (B) tidak signifikan. Penggunaan media

hidrolisis dengan pH 5 yang merupakan pH optimum bagi aktivitas lipase dari *Aspergillus niger*, menyebabkan kerusakan parsial pada asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) omega-3 yang terbentuk.

Pada hasil hidrolisis enzimatik pada media yang ditambahkan pelarut heptana (C) (Gambar 5), peningkatan EPA sebesar 5,33% dari kandungan EPA minyak awal dan tidak terdapat DHA. Sementara itu, pada (D), peningkatan EPA ditemukan sebesar 8,42% dari kandungan EPA minyak awal, dan DHA meningkat 1,87% dari minyak awal. DHA yang ada pada konsentrat hasil reaksi ditimbulkan oleh terjadinya desaturasi dan elongase dari asam  $\alpha$ -linolenat di dalam minyak. Reaksi hidrolisis enzimatik dengan penambahan heptana terbukti menghasilkan omega-3, kandungan



asam eikosapentanoat dan asam dokosaheksanoat dalam jumlah yang minim bila dibandingkan pada reaksi hidrolisis tanpa penambahan pelarut heptana. Perbedaan kandungan total omega-3 pada kondisi pH 5 dan suhu 45°C tersebut ditemukan sebesar 10,37%. Penambahan pelarut heptana pada reaksi hidrolisis enzimatis tidak meningkatkan aktivitas katalitik enzim. Kepolaran heptana yang besar (log P=4) tidak mendukung stabilitas lipase tersebut pada hidrolisis. Pelarut heptana membuat struktur tiga dimensi lipase berubah, perubahan yang terjadi membuat aktivitas katalitik lipase ini menurun. Seperti pada penelitian Zaks dan Klivanov (1985), media yang sesuai untuk reaksi enzimatis adalah media dimana protein tidak dapat terlarut. Karena pada media tersebut enzim akan mengubah struktur tiga dimensinya dan non aktif.

Berdasarkan Gambar 6, kandungan omega-3 yang terdapat pada asam lemak bebas hasil hidrolisis di dalam media yang ditambahkan toluena adalah 3,01% (D). Bentuk omega-3 yang terdeteksi di dalam hasil hidrolisis adalah asam eikosapentanoat dan tidak terdapat asam dokosaheksanoat. Bila dibandingkan dengan omega-3 yang diperoleh dari (A) dan (B), kandungan omega-3 yang diperoleh setelah penambahan toluena adalah lebih rendah. Selain itu, perlakuan (A) dan (B) juga dapat mengekstraksi asam dokosaheksanoat dari minyak ikan awal dalam jumlah yang cukup besar.

Berdasarkan Gambar 7, kandungan asam lemak omega-3 tertinggi yaitu 21,93% dari seluruh total komponen minyak ikan terdapat pada sampel (C) dengan tingkat hidrolisis 75,12%. Tingginya kandungan asam lemak omega-3 pada sampel tersebut, diduga karena hidrolisis minyak ikan pada media yang ditambahkan heksana selain dapat meningkatkan aktivitas dan stabilitas lipase dari *Aspergillus niger*, juga dapat mengikat dan menjaga asilgliserol yang banyak mengandung asam lemak omega-3 yang terbentuk selama proses hidrolisis parsial ke dalam pelarut heksana.

Hidrolisis enzimatis minyak ikan dengan katalis lipase dari *Aspergillus niger* selain dapat meningkatkan kandungan asam lemak omega-3, juga dapat meningkatkan kandungan asam lemak EPA dan DHA pada kondisi optimum faktor reaksi (Gambar 7). Pada sampel hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan tanpa penambahan pelarut heksana dengan tingkat hidrolisis 6,79% dan 28,07%, diketahui kandungan EPA didalamnya yaitu sebesar 9,49% dan 12,17%, dengan kandungan DHA didalamnya sebesar 0,56% dan 0,86% dari total seluruh komponen dalam minyak ikan. Peningkatan kandungan EPA dan DHA tertinggi terdapat pada sampel (C) hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan dengan penambahan pelarut heksana yang mempunyai tingkat hidrolisis 75,12%, dengan jumlah EPA yang terkandung didalamnya 17,75% dari seluruh total komponen atau meningkat 5,58% dari sampel (B). Kandungan DHAnya adalah 1,21%

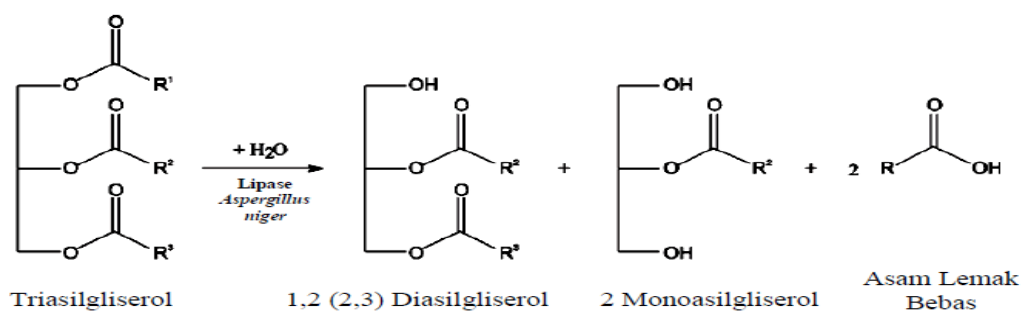
dari seluruh total komponen dalam minyak ikan atau meningkat 0,35% jika dibandingkan dengan sampel (B).

Pengkayaan omega-3, asam eikosapentanoat, dan asam dokosaheksanoat yang paling tinggi adalah pada reaksi hidrolisis dengan penambahan pelarut heksana sebagai media (Gambar 7). Tingkat kepolaran heksana (log P=3,5) sesuai untuk aktivitas katalitik lipase *Aspergillus niger*.

Asam lemak omega-3 adalah asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap, ikatan rangkap pertama terletak pada atom karbon ketiga dari gugus metil omega. Komponen paling tinggi yang terkandung dalam asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap omega-3 adalah asam eikosapentanoat (C20:5w-3, umumnya dikenal sebagai EPA dan DHA (C22:6w3, umumnya dikenal sebagai DHA) (Aidos, 2002).

Banyaknya kandungan asam lemak omega-3 pada konsentrat hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan dikarenakan lipase dari *Aspergillus niger* dengan spesifisitas posisional *stereochemical numbering (sn)*1 dan 3 mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis ikatan ester minyak ikan yang berupa triasilgliserol pada posisi primer (*sn-1* dan atau *sn-3*), sehingga dihasilkan banyak asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) omega-3 yang terletak pada posisi sekunder (*sn-2*) (Gambar 8). Menurut Carvalho *et al.* (2009), pengkayaan asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) omega-3 dapat dilakukan melalui proses reduksi asam lemak jenuh (SFA C16-C18) dan asam lemak tidak jenuh tunggal (MUFA).

Banyaknya kandungan EPA dan DHA pada minyak ikan yang telah mengalami hidrolisis enzimatis dikarenakan lipase dari *Aspergillus niger* dengan spesifisitas posisional 1,3 akan mempertahankan asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) omega-3 khususnya EPA dan DHA yang umumnya berada pada posisi sekunder (*sn-2*) triasilgliserol. Adanya gugus cis-pada ikatan ganda antara atom karbon dengan karbon asam lemak menyebabkan pembengkokkan rantai asam lemak. Oleh karena itu, gugus metil asam lemak yang dekat dengan ikatan ester menyebabkan *steric hindrance* pada lipase. Banyaknya ikatan ganda cis-cis EPA dan DHA membuat molekulnya bersifat kuat dan dapat meningkatkan efek *steric hindrance* sehingga ikatan ester asam lemak EPA dan DHA dalam bentuk asilgliserol lebih sulit untuk diputuskan oleh lipase jika dibandingkan asam lemak jenuh (SFA) dan asam lemak tidak jenuh dengan satu ikatan rangkap (MUFA) yang umumnya terletak pada posisi primer. Oleh karena itu, kandungan EPA dan DHA pada fase non polar jumlahnya meningkat setelah dilakukan hidrolisis minyak ikan dengan katalis lipase dari *Aspergillus niger*.



Gambar 8. Mekanisme reaksi hidrolisis trasilgliserol dengan katalis lipase spesifik 1,3 dari *Aspergillus niger* (Carvalho *et al.*, 2009)

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Tingkat hidrolisis tertinggi pada reaksi hidrolisis enzimatis minyak ikan tanpa penambahan pelarut dicapai pada suhu 45°C dan pH 5 dengan tingkat hidrolisis 28,07%. Pada penambahan toluena, tingkat hidrolisis tertinggi adalah 15,69% pada 45°C, pH 5, dan penambahan air 1% V/V. Pada penambahan heksana sebagai media, tingkat hidrolisis mencapai persentase tertinggi diantara pelarut lain sebesar 75,12% pada 45°C, pH 5, dan penambahan air 5%. Namun, pada heptana, tingkat hidrolisis sebesar 23,94% pada 25°C, pH 5, dan penambahan airnya hanya 1% V/V. Berdasarkan hasil analisa GC-MS, banyaknya omega-3 meningkat pada reaksi hidrolisis dengan penambahan heksana yang semula 18,42% untuk total omega-3 (12,17% EPA dan 0,86 DHA) menjadi 21,93% total omega-3, dengan jumlah EPA 17,75% dan DHA 1,21%. Namun pada penambahan toluena dan heptana, konsentrasi hasil reaksi memiliki kandungan omega-3 (EPA dan DHA) yang lebih rendah bila dibandingkan hidrolisis tanpa penambahan pelarut.

### Saran

Penelitian ini merupakan rintisan awal dari proses produksi omega-3 secara hidrolisis minyak ikan menggunakan lipase dari *Aspergillus niger*. Untuk meningkatkan rendemen dan kemurnian produk maka perlu dilakukan penelitian mengenai model kinetika reaksi faktor tunggal, optimasi dengan *Response Surface Methode*, pemisahan dan identifikasi monoester, serta penggandaan skala.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan biaya penelitian yang disalurkan lewat program Penelitian Strategis Nasional dengan nomor 046/SP2H/PL/Dit.Litabman/III/2012.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aidos I. 2002. Production of High-Quality Fish Oil from Herring Byproducts. [Thesis]. Netherlands: Wageningen University.
- Amano Pharmaceutical Manufacturing Co. 2009. *Dictionary of Enzyme: Lipase Aspergillus niger*. Japan: Amano Pharmaceutical Manufacturing Co.
- AOCS. 1997. *AOCS Official Methods*. Washington DC: Association of Oil Chemist' Society.
- Baharum SN, Salleh AB, Razak CNA, Rahman MBA, Rahman RNZRA. 2003. Organic Solvent Tolerant by *Pseudomonas sp.* Strain S5: Stability of Enzyme in Organic Solvent and Physical Factors Affecting Its Production. *J Annals Microbiol.* 53: 75-83.
- Carvalho PO, Paula RBC, Maximiliano DN, Patricia BLF, Leonardo VF. 2009. Enzymatic Hydrolysis of Salmon Oil by Native Lipases: Optimization of Process Parameters. *J Braz Chem Soc.* 20 (1): 117-124.
- Celik H. 2002. Commercial Fish Oil. *ISSN 1302 647X.* B 3(1):1-6.
- De Busk R. 2007. Omega-3 Fatty Acids. <http://www.umm.edu/omega-3-000316.htm>. [16 September 2008].
- Gupta K. 2007. Ecological Scening For Lipolitic Molds and Process Optimization for Lipase Production From *Rhizopus oryzae* KG-5. *J Appl Sci in Environmental Sanitation* 2 (2): 35-42.
- Haraldson GG, Kristinsson B, Sigurdardottir R, Gudmundsson GG, Breivik H. 1997. The Preparation of Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase-Catalized Transesterification of Fish Oil with Ethanol. *J Am Oil Chem.* 74: 1419-1424.
- Jedwards International, Inc. 2005. Fish Oil (18/12). <http://www.bulknaturaloils.com/fishoil/epadha/fishoil1812.html>. [9 Februari 2010].
- Kim IH, Yoon CS, dan Lee KW. 2000. Transesterification of Conjugated Linoleic

- Acid and Tricaprylin by Lipase Inorganic Solvent. *Food Res Int.* 3: 301-306.
- Kurashige J, Matsuzaki N, dan Takahashi H. 1993. Enzymatic Modification of Canola/Palm Oil Mixture Effect on The Fluidity. *J Am Oil Chem.* 70 (9): 849-852.
- Krieger N, Bhatnagar T, Jacques CB, Alessandra MB, Valeria ML, Mitchel D. 2004. Non Aqueous Biocatalysis in Heterogenous Solvent Systems. *Food Technol Biotechnol.* 42 (4): 279-286.
- Suhartono MT. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Penerbit Erlangga. Terjemahan dari *Principles of Biochemistry*.
- Medina AR, Paez BC, Rubio FC, Moreno PG, Grima EM. 2003. Modelling The Effect of Free Water Enzyme Activity in Immobilized Lipase-Catalyzed Reaction in Organic Media. *Enzyme and Microbial Technol.* 33: 845-853.
- Rahman RNZRA, Baharum SN, Salleh AB, Basri M. 2006. S5: An Organic Solvent Tolerant Enzyme. *J Microb.* 583-590.
- Saxena RK, Ghosh PK, Gupta R, Davidson WS, Bradoo S, Gulati R. 2009. *Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for The Future Industry*. India: Departement of Microbiology, University of Delhi.
- Schneider PM dan Berger M. 1991. Regioselectivity of Lipases in Organic Solvents. *Biotech Letters* 13 (5): 333-338.
- Sigma Aldrich co. 1994. *Enzymatic Assay of Lipoprotein Lipase (EC 3.1.1.34)*. Sigma Aldrich Co.
- Wanasundara UN dan Shahidi F 1998. Lipase Assisted Concentration of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Acylglycerol from Marine Oil. *J Am Oil Chem.* 75: 945-951.
- Yang B, Kuo SJP, Hariyadi, Parkin KL. 1994. Solvent Suitability for Lipase-Mediated Acyl-Transfer and Esterification Reactions in Microaqueous Milieu is Related to Substrate and Product Polarities. *Enzyme Microbial Technol.* 16: 577-583.
- Zaks A dan Klivanov AM. 1985. Enzyme Catalyzed Processes in Organic Solvent. *Proc Nat Acad Sci.* 82: 3192-3296.
- Zarevucka M dan Wimmer Z. 2008. Plant Product for Pharmacology: Application of Enzyme in Their Transformation. *Int J Molecular Sci.* 9: 2447-2473.