

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MONOASILGLISEROL OMEGA-3 (MONOESTER OMEGA-3)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MONOASILGLISEROL OMEGA-3 (MONOESTER OMEGA-3)

Sapta Raharja* dan Dwi Cahyani

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian IPB
Kampus IPB Dramaga P.O. Box 220 Bogor 16002
*e-mail: saptaraharja@ipb.ac.id

ABSTRACT

Omega-3 which come from fish oil, especially from Lemuru fish oil has many advantages for health. Omega-3 is Polyunsaturated Fatty Acid with first double bond located between number 3 and 4 of carbon atomic which consist of EPA and DHA. The purpose of this research was to separate monoester omega -3's component with isolation method use Thin Layer Chromatography (TLC) based on difference of polarity and then identification isolation's result with GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) and FTIR (Fourier Transform Infra Red). With TLC, the separation succed with petroleum benzene 40°C solvents. Result of GC-MS showed of the sample have Oktadekatrienoat Acid(ALA) 3,29%. Fish oil before hydrolysis, after hydrolysis (monoester omega-3), and result of TLC isolation have alkana (C-H), Aldehyde eter carboxyle ester acid (C-O), Aldehyde keton carboxyle ester acid(C=O), alcohol fenol (hydrogen bond) (O-H), amina (C-N), and nitro (-NO₂). All of sample haven't alkana (C=C), alkuna (C≡C), and alcohol fenol (monomer) (O-H).

Keywords: FTIR, GC-MS, TLC, monoester omega-3

ABSTRAK

Omega-3 yang berasal dari minyak ikan, terutama dari minyak ikan lemuru memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Omega-3 adalah asam lemak tak jenuh jamak dengan ikatan rangkap pertama terletak diantara atom karbon nomor tiga dan atom karbon nomor empat yang terdiri dari EPA dan DHA. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memisahkan komponen monoester omega-3 dengan metode isolasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (Thin Layer Chromatography) berdasarkan perbedaan kepolaran dengan pelarut yang digunakan. Hasil isolasi tersebut akan diidentifikasi dengan metode GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometri) dan FTIR (Fourier Transform Infra Red). Metode TLC didapatkan berhasil dengan menggunakan pelarut petroleum benzen 40°C. Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa sampel memiliki asam oktadekatrienoat (ALA) sebesar 3,29%. Minyak ikan sebelum hidrolisis, minyak ikan setelah hidrolisis (monoasilgliserol omega-3), dan hasil isolasi dengan menggunakan metode TLC memiliki gugus fungsi alkana (C-H), Aldehida eter asam karboksilat ester (C-O), Aldehida keton asam karboksilat ester (C=O), alkohol fenol (ikatan hidrogen) (O-H), amina (C-N), dan nitro (-NO₂). Ketiga sampel tidak memiliki gugus fungsi alkena (C=C), alkuna (C≡C), dan alkohol fenol (monomer) (O-H).

Kata kunci : FTIR, GC-MS, TLC, Monoester omega-3

PENDAHULUAN

Minyak ikan merupakan sumber asam lemak yang penting khususnya asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) n-3 atau yang lebih dikenal dengan sebutan omega-3 berupa eikosapentanoat (EPA) dan asam dokosaheksanoat (DHA) yang merupakan asam lemak esensial untuk manusia karena tidak bisa diproduksi oleh tubuh manusia itu sendiri (Raharja 2011). EPA berfungsi dalam membantu pembentukan sel-sel darah dan jantung dan menyehatkan sistem peredaran darah dengan melancarkan sirkulasi darah (Duthie 1992).

Minyak ikan sangat berbeda dengan minyak lainnya, yang dicirikan dengan variasi asam lemaknya lebih tinggi dibandingkan dengan minyak atau lemak lainnya, jumlah asam lemaknya lebih banyak, panjang rantai karbon mencapai 20 atau 22, lebih banyak

mengandung jenis asam lemak tak jenuh jamak (ikatan rangkap sampai dengan 5 dan 6) dan lebih banyak mengandung jenis omega-3 dibandingkan dengan omega-6. Omega-3 adalah asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) n-3 sehingga disebut omega-3. Beberapa jenis asam lemak omega-3 yang terkandung dalam minyak ikan antara lain *Docosahexaenoic acid* (DHA), *Eicosapentaenoic acid* (EPA), *Oktadekatrienoat acid* (ALA), *Stearidonic acid* (SDA) *Eikosatrienoic acid* (ETE), dan *Eikosatetraenoic acid* (ETA). EPA dan DHA adalah yang lebih bermanfaat bagi tubuh dan hanya diperoleh dari ikan-ikan berlemak, terutama ikan dari laut dingin.

Bentuk asilgliserol dari asam lemak omega-3 dalam ilmu nutrisi ditengarai lebih baik karena lebih mudah diserap oleh usus, sehingga isolasi yang dilakukan menggunakan sampel berupa monoasilgliserol yang merupakan hasil pengkayaan

*) Penulis untuk korespondensi

omega-3 dengan hidrolisis enzimatis menggunakan lipase dari *Aspergillus niger* sebagai katalis. Enzim lipase ini mempunyai spesifisitas posisional memutuskan ikatan trigliserida pada sn-1,3 sehingga dapat menjaga asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap omega-3 dalam bentuk asilgliserol yang umumnya dan terdistribusikan lebih banyak pada sn-2. 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 sterik hidrance pada lipase. Banyaknya ikatan ganda cis-cis EPA dan DHA membuat molekulnya bersifat kuat dan dapat meningkatkan efek sterik hidrance 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 (Raharja 2012).

Isolasi yang dilakukan ini menggunakan metode TLC (Thin Layer Chromatography) yang biasa disebut Kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pelarut yang sesuai. Hasil isolasi ini selanjutnya akan dilakukan identifikasi komponen yang terkandung didalamnya menggunakan analisis GC – MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry) serta diidentifikasi gugus fungsinyadan dibandingkan antara gugus fungsi minyak ikan, monoasilgliserol omega-3, dengan hasil isolasidengan TLC. Identifikasi gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan metode FTIR (Fourier Transform Infra Red). Isolasi yang dilakukan dalam mengetahui kandungan didalamnya serta gugus fungsinya diharapkan dapat dimanfaatkan lebih lanjut dan meningkatkan nilai tambah.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pelarut yang sesuai untuk mengisolasi komponen - komponen monoester omega - 3, mengidentifikasi komponen yang terkandung dalam hasil isolasi, dan mengidentifikasi perubahan gugus fungsi dari minyak ikan, monoester omega-3, dengan hasil isolasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan adalah monoasilgliserol omega-3 (monoester omega-3) yang didapatkan dari hidrolisis enzimatis minyak ikan lemuru yang diambil dari Banyuwangi, Jawa Timur. Sedangkan bahan untuk analisis yaitu heksan pa, aseton pa, metanol pa, kloroform pa, etil asetat pa, etanol pa, petroleum benzen pa (40°C), dan bahan kimia lainnya.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain *plat* kaca TLC, *chamber* kaca TLC, kertas saring, GC-MS instrumen, IR Prestige-21 Fourier Transform Infra Red, dan alat gelas penunjang lainnya.

Metode

Metode penelitian yang dilakukan terbagi menjadi dua yaitu penelitian pendahuluan dan

penelitian utama. Penelitian pendahuluan yang dilakukan adalah proses penentuan pelarut yang sesuai untuk melakukan pemisahan (isolasi) terhadap komponen monoester omega-3. Penentuan pelarut yang sesuai ini adalah dengan melakukan proses isolasi dengan menggunakan metode TLC (Thin Layer Chromatography). Penelitian utama yang dilakukan meliputi analisis GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) dan FTIR (Fourier Transform Infra Red).

Metode isolasi dengan TLC menggunakan *plat* kaca berlapis silika gel 60 F254 berukuran 20x20 cm. Sampel omega-3 diaplikasikan pada *plat* kaca tersebut dalam bentuk spot bulat dengan spot berjumlah lima buah. Setelah spotting selesai dilakukan, kemudian *plat* dimasukkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang (fase gerak). *Plat* dielus sampai pelarut mencapai batas atas, sekitar 30 sampai 60 menit. *Plat* kemudian dikeluarkan dari bejana pengembang dan dibiarkan beberapa menit sampai uap yang masih tertinggal hilang. Spot yang terbentuk dilihat menggunakan sinar UV kemudian dipisahkan dari silika gel dan dilarutkan kembali menggunakan pelarut yang sesuai. Hasil inilah yang akan digunakan untuk proses identifikasi.

Spot yang terbentuk pada *plat* kaca TLC masing-masing dilarutkan dengan pelarut tertentu. Komponen yang sudah dicampur pelarut ini akan diambil sebanyak sekitar kurang lebih 0,01 ml dan dimasukkan kedalam alat GC-MS.

Analisis FTIR menggunakan tiga buah sampel yaitu minyak ikan, monoester omega-3 hasil hidrolisis enzimatis, dan hasil isolasi monoester omega-3 tersebut. Pertama, spektra IR untuk blangko (udara kosong) dibuat sebagai referensi munculnya puncak-puncak yang tidak diharapkan di spektra IR yang dianalisis. Spektra IR polistirene standar dibuat. Cup atau mangkuk porselen disiapkan dengan dibersihkan menggunakan kloroform. Kalium bromide (KBr) digunakan sebagai pelarut yang dihomogenkan dengan sampel dengan perhitungan 0,1g KBr berbanding sampel sebanyak kurang dari 5% dari KBr tersebut. Campuran ini kemudian dimasukkan kedalam wadah kecil khusus untuk analisis FTIR dan dimasukkan dalam alat untuk selanjutnya dianalisis menggunakan komputer yang telah di program.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Bahan

Monoester omega-3 sebagai bahan dasar yang akan dilakukan isolasi terhadap komponen yang terkandung didalamnya merupakan hasil dari hidrolisis enzimatis. Hidrolisis enzimatis ini dilakukan terhadap minyak ikan jenis lemuru yang diperoleh dari Banyuwangi, Jawa Timur. Minyak ikan itu merupakan hasil samping dari industri pengalengan ikan yang memang banyak ditemukan di daerah tersebut. Minyak ikan yang diperoleh dianalisis aspek - aspek yang terkait untuk mengetahui kondisi awal minyak. Aspek yang dianalisis meliputi pengujian bilangan asam,

kadar asam lemak bebas (%FFA), dan bilangan penyabunan. Hasil pengujian tersebut disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1 Hasil karakterisasi sifat fisiko kimia minyak ikan

Karakteristik	Satuan	Nilai	Minyak Ikan Lemuru*
Bilangan asam lemak bebas	mg KOH/g	3.29	10.15
Kadar asam lemak bebas	% FFA	1.66	4.6
Bilangan penyabunan	mg KOH/g	204.8	187.4

Keterangan : * Celik (2002)

Data tersebut menunjukkan bahwa minyak ikan yang akan digunakan dalam kondisi baik. Aspek yang dianalisis menunjukkan nilai yang masih dalam batas yang diperbolehkan. Bahan baku yang digunakan untuk isolasi ini adalah monoester omega-3 yang diperoleh dari hidrolisis minyak ikan tersebut. Sampel yang digunakan adalah monoester omega-3 hasil hidrolisis dengan rendemen atau hasil terbaik. Pemilihan sampel sebagai bahan baku ini berdasarkan analisis GC-MS yang dilakukan terhadap seluruh hasil hidrolisis. Dapat dilihat pada Tabel 2 bahwa tingkat hidrolisis sebesar 50,93% diperoleh omega-3 dengan total luas area sebesar 6,99% dari luas area semua komponen yang terdeteksi. Luas area ini lebih tinggi dibandingkan luas area sebelum minyak dihidrolisis yang menunjukkan keberhasilan dalam upaya pengkayaan omega-3 tersebut.

Tabel 2 Perbandingan luas area (%) komponen asam lemak omega-3 minyak ikan lemuru sebelum dan setelah hidrolisis pada kondisi optimum

Luas Area	Minyak sebelum hidrolisis (%)	Minyak setelah Hidrolisis (mono ester omega-3) (%)
Total	1.81	6.99
EPA	1.81	4.14
DHA	Tidak terdeteksi	0.40
ETA	Tidak terdeteksi	0.82

Kandungan dari omega-3 yang berhasil dideteksi adalah EPA, DHA, dan ETA. Asam eikosa pentanoat atau EPA mengalami peningkatan luas areadari 1,81% menjadi 4,14%. Asam dokosa heksanoat (DHA) dan asam eikosatetranoat (ETA) yang semula pada minyak awal tidak terdeteksi memiliki luas area

0,40% dan 0,82% setelah hidrolisis. DHA dan ETA yang tidak terdeteksi ini dikarenakan jumlahnya yang sangat kecil. Sedangkan sisanya merupakan asam lemak lain yang masih termasuk dalam golongan omega -3 namun dengan jumlah yang sangat kecil. Komponen lain yang juga terdeteksi diantaranya adalah asam oktadekatrienoat (ALA) dan asam heksadekatrienoat (HTA). Peningkatan luas area komponen omega - 3 ini dapat dikatakan terjadi pula peningkatan konsentrasi omega - 3 setelah hidrolisis enzimatik.

Asam lemak omega - 3 merupakan bentuk turunan dari asam linoleat. Menurut Zarevucka dan Wimmer (2008) asam linoleat dapat berubah menjadi asam α - linolenat omega - 3, asam γ - linolenat omega - 6, asam arachidonat hingga asam dihomogamma - linolenat melalui biosintesis dimana EPA dan DHA diperoleh dari perubahan asam α - linolenat tersebut. Kandungan DHA yang lebih kecil daripada EPA sesuai dengan pendapat Haraldson (1997) bahwa minyak ikan lemuru memiliki kandungan EPA yang lebih banyak daripada DHA.

Identifikasi Pelarut (Metode TLC)

Isolasi komponen - komponen yang terkandung dalam monoester omega 3 menggunakan metode TLC (Thin Layer Chromatography) dengan pelarut yang sesuai. Berbagai perbandingan dan campuran antara beberapa jenis pelarut pun dilakukan. Berikut campuran berbagai pelarut yang telah dilakukan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Berbagai pelarut yang digunakan

Pelarut	Perbandingan
Heksan pa	100 %
Metanol	100%
Metanol pa	100 %
Etanol pa	100 %
Aseton	100 %
Etil Asetat	100 %
Heksan : Aseton	4:1 dan 3:2
Metanol : Kloroform	1:9
Heksan : Etil Asetat	1:7 dan 3:7
Petroleum Benzen	100 %

TLC mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan HPLC dan GC, yaitu TLC memberikan fleksibilitas yang lebih besar, dalam hal memilih fase gerak, berbagai macam teknik untuk optimasi pemisahan seperti pengembangan dua dimensi, dan pengembangan bertingkat dapat dilakukan pada TLC, proses kromatografi dapat diikuti dengan mudah dan dapat dihentikan kapan saja, serta semua komponen dalam sampel dapat dideteksi. Fase diam yang paling sering digunakan pada TLC adalah silika dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi - desorpsi (suatu

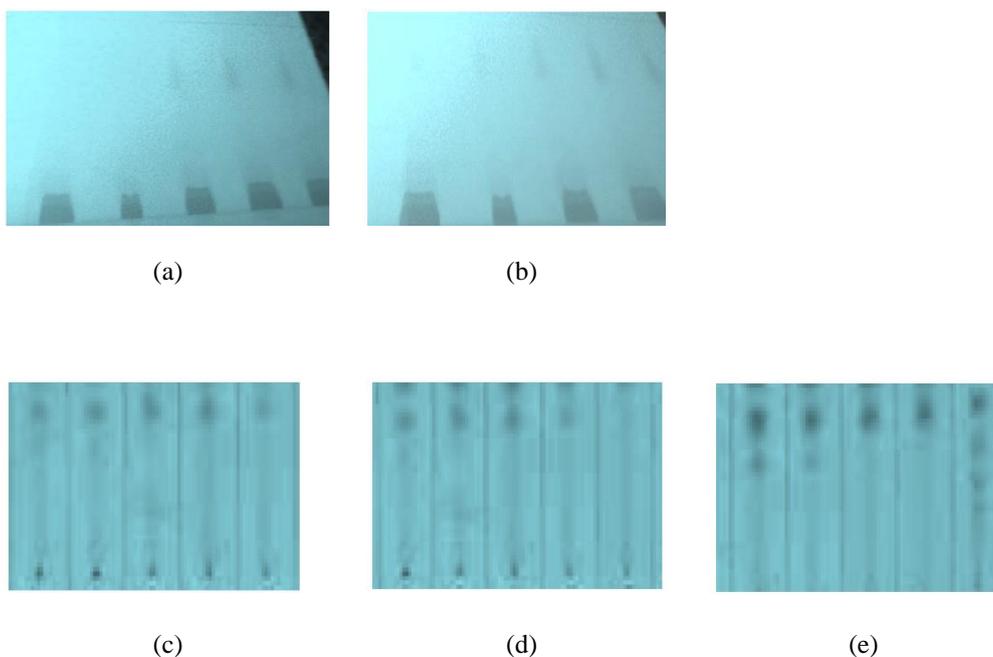
mekanisme perpindahan solut dari fase diam ke fase gerak atau sebaliknya) yang utama pada TLC adalah partisi dan adsorpsi (Sudarmadji1996).

Lapisan tipis yang digunakan sebagai fase diam jugadapat dibuat dari silika yang telah dimodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusif, dan siklodextrin yang digunakan untuk pemisahan kiral (Settle 2001).

Penggunaan metode TLC yang mudah dan murah ini mengharuskan penggunaan pelarut yang sesuai dengan sampel yang diuji. Perbandingan berbagai jenis pelarut yang digunakan diperoleh melalui referensi yangterkait seperti pengidentifikasian pada minyak lain selain dari minyak ikan. Identifikasi minyak atsiri mint menggunakan metode TLC diperoleh bahwa eluen yang paling sesuai digunakan untuk pemisahan komponen senyawa dalam isolat minyak atsiri tersebut adalah campuran pelarut heksan dengan etil asetat (1:7). Hal ini telah dilakukan namun tidak menunjukkan hasil yang diinginkan pada sampel penelitian ini yaitu monoester omega-3 minyak ikan lemuru.

Perbandingan pelarut heksandengan etil asetat 3:7 mengacu pada campuranpelarut heksan dengan etil asetat 1:7 tersebut. Penggunaan pelarut lain mengacu pada referensi-referensi lain yang menggunakan metode yang sama yaitu TLC dengan sampel yang berbeda-beda seperti minyak atsiri komoditas lain dan minyak nabati. Berdasarkan hasil visualisasi menggunakan lampu UV dan penampakan noda yang terdapat pada *plat* kaca TLC diperoleh bahwa eluen yang dapat membentuk spot adalah petroleum benzen. Petroleum benzen yang digunakan memiliki titik didih sebesar 40°C. Hasil visualisasi ini disajikan pada Gambar 1.

Hasil visualisasi menggunakan pelarut metanol,etanol, aseton, etil asetat, heksan:aseton (4:1 dan 3:2), dan heksan : etil asetat (1:7 dan 3:7) memiliki hasil yang mirip dengan hasil visualisasi dengan menggunakan pelarut heksan danmetanol:kloroform (1:9) di atas. Pelarut yang menunjukkan hasil visualisasi dengan membentuk spot hanyalah pelarut petroleum benzen. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dan menghasilkan penampakan yang sama yaitu membentuk spot yang sama pada jarak 5cm dari batas bawah *plat* kaca. Dengan demikian, hasil isolasi dengan menggunakan pelarut petroleum benzen inilah yang dianggap baik dan dijadikan sampel untuk analisis selanjutnya. Namun, hal ini belum maksimal dikarenakan spot yang terbentuk hanya satu sehingga masih banyak komponen yang larut dalam pelarut tersebut. Perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang dijadikan prinsip dalam TLC ini. EPA yang bersifat polar tentunya akan tertahan laju penyerapannya pada *plat* kaca TLC dengan menggunakan pelarut non polar seperti petroleum benzen. Masing-masing komponen senyawa dalam sampel akan bergerak ke atas dengan kecepatan yang berbeda. Spot yang terbentuk hanya satu dikarenakan pelarut petroleum benzen yang masih memiliki kepolaran yang dekat dengan komponen-komponen yang diisolasi sehingga komponen tersebut terus bergerak ke atas bersama dengan pelarut tanpa dapat tertahan pada *plat* kaca. Diperlukan pelarut non polar yang lebih baik sehingga komponen-komponen dalam sampel dapat tertahan pada *plat* kaca dan tidak terbawa oleh fase gerak tersebut.



Gambar 1 Visualisasi hasil isolasi TLC dilihat dengan lampu UV : a) Heksan, b) Metanol : Kloroform; c) Petroleum benzen (ulangan 1), d) Petroleum benzen (ulangan 2), dan e) Petroleum benzen (ulangan 3)

Analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

GGC - MS merupakan gabungan antarokromatografi gas dengan spektrometer massa. Pada umumnya sistem pemisahan pada GC berdasarkan pada perbedaan tekanan uap dari setiap komponen yang akan dipisahkan. Terdapat dua fase pada GC, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam berupa padatan atau cairan, sedangkan fase gerak berupa gas pembawa yang bersifat inert seperti He, N₂, dan H₂. Spektrometer massa (MS) digunakan pada GC sebagai detektor untuk memisahkan masing - masing komponen dalam suatu sampel sekaligus mengidentifikasi komponen tersebut. MS akan mengidentifikasi komponen setelah terpisah pada analisis GC dan keluar dari kolom mengalir kedalam MS, identifikasi tersebut didasarkan pada bobot molekul senyawanya (Skoog et al. 1996).

Identifikasi komponen-komponen asam lemak omega-3 menggunakan GC-MS dapat dilakukan secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menyamakan waktu retensi sampel dengan waktu retensi standarnya. Waktu retensi (retention time) menunjukkan waktu yang diperlukan oleh suatu komponen sampel untuk melintasi kolom pada panjang tertentu. Retention time yang diaplikasikan pada GC-MS merupakan waktu yang diperlukan sampel mulai dari injeksi hingga munculnya *peak* maksimum. Apabila waktu retensi keduanya sama atau mendekati satu sama lain maka dapat dilakukan perhitungan secara kualitatif ataupun kuantitatif setiap komponennya.

Tabel 4 Perbandingan luas area (%) komponen asam lemak omega - 3 minyak ikan lemuru setelah hidrolisis dan hasil isolasi TLC

Luas Area	Minyak setelah hidrolisis Monoasilgliserol Omega-3 (%)	Hasil isolasi TLC dengan Petroleum Benzene (%)
EPA	4.14	0.17
DHA	0.40	Tidak terdeteksi
ETA	0.82	0.34
HTA	Sangat kecil	0.68
ALA	Sangat kecil	3.29

Analisis GC-MS pada penelitian ini hanya dilakukan pada sampel hasil isolasi menggunakan TLC saja. Sampel minyak ikan sebelum dan setelah hidrolisis telah dilakukan analisis serupa pada penelitian sebelumnya. Pada sampel minyak ikan sebelum hidrolisis terdapat atau terdeteksi EPA dan setelah hidrolisis yang terdeteksi adalah EPA, DHA, dan ETA. Sedangkan hasil isolasi menggunakan TLC menunjukkan kandungan dominan yang terkandung didalamnya adalah asam oktadekatrienoat (ALA). Asam oktadekatrienoat (ALA) sebanyak 3.29% dan sisanya merupakan asam heksadekatrienoat (HTA) dan asam lemak lain yang masih termasuk dalam golongan omega - 3 namun dengan jumlah yang sangat kecil. Hasil pengujian ini disajikan pada Tabel 4. Kebutuhan seseorang akan DHA, EPA, maupun ALA tergantung pada tubuh orang tersebut. Sebagian orang membutuhkannya lebih banyak daripada orang lain. Walau demikian, ahli kesehatan

menyimpulkan jika kebutuhan umum harian orang dewasa terhadap EPA, DHA, ataupun ALA adalah sebesar 2 - 4 gram setiap harinya (Hoesada 2009). Hasil analisis yang berbeda ini dikarenakan penggunaan pelarut pada saat pengujian GC-MS yang berbeda. Komponen yang mendominasi pada hasil isolasi masih termasuk dalam golongan monoester omega - 3. Analisis GC - MS ini tidak digunakan standar yang spesifik monoester omega - 3. Standar yang digunakan merupakan standar umum untuk senyawa non - polar sehingga komponen yang teridentifikasi pada sampel penelitian tidak hanya monoester omega - 3. Komponen lain seperti asam lemak jenuh, asam lemak tidak jenuh tunggal, asam lemak tidak jenuh jamak, maupun alkana dan hidrokarbon juga terbaca dan terdeteksi oleh alat karena adanya pelarut yang digunakan dan bersatu dengan sampel.

Analisis FTIR (Fourier Transform Infra Red)

Spektrofotometri Infra Merah merupakan suatu metode yang mengamati interaksimolekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 - 1000 μm atau pada bilangan gelombang 13000 - 10 cm^{-1} . Berdasarkan pembagian daerah panjang gelombang, sinar infra merah dibagi atas tiga daerah, yaitu daerah infra merah dekat, daerah infra merah pertengahan, dan daerah infra merah jauh. Atom-atom di dalam molekul tidak dalam keadaan diam, tetapi biasanya terjadi peristiwa vibrasi. Hal ini bergantung pada atom-atom dan kekuatan ikatan yang menghubungkannya. Vibrasi molekul sangat khas untuk suatu molekul tertentu dan biasanya disebut vibrasi *finger print*. Vibrasi molekul dapat digolongkan atas dua golongan besar, yaitu vibrasi regangan (*stretching*) dan vibrasi bengkokan (*bending*).

Atom dalam vibrasi regangan, bergerak terus sepanjang ikatan yang menghubungkannya sehingga akan terjadi perubahan jarak antara keduanya, walaupun sudut ikatan tidak berubah. Vibrasi bengkokan ini terbagi menjadi empat jenis yaitu Vibrasi Goyangan (*Rocking* - unit struktur bergerak mengayun asimetri tetapi masih dalam bidang datar), Vibrasi Guntingan (*Scissoring* - unit struktur bergerak mengayun simetri dan masih dalam bidang datar), Vibrasi Kibasan (*Wagging* - unit struktur bergerak mengibas keluar dari bidang datar), dan Vibrasi Pelintiran (*Twisting* - unit struktur berputar mengelilingi ikatan yang menghubungkan dengan molekul induk dan berada di dalam bidang datar) (Harvey 2000).

Setiap gugus fungsi (ikatan) di dalam suatu molekul mempunyai tingkatan energi vibrasi dan rotasi yang berbeda. Oleh karena itu, gugus fungsi ditentukan dari nilai bilangan gelombang yang terserap oleh ikatan tersebut. Nilai bilangan gelombang yang terserap ditentukan dari puncak yang mengidentifikasikan adanya % Transmittan yang bernilai kecil (Absorbansi bernilai cukup besar). Daerah serapan beserta gugus fungsi dan nama gugus fungsi disajikan dalam Tabel 5.

Pada percobaan ini, polistirene digunakan untuk menentukan kelayakan spektrometer inframerah. Polistirene mempunyai kestabilan yang cukup tinggi. Bentuk molekulnya tidak mudah berubah apabila terjadi perubahan lingkungan di sekitarnya, misalnya adanya peningkatan suhu yang ekstrim tidak mengubah

bentuk molekul dan ikatan-ikatan yang ada di dalam polistirene. Suatu spektrometer infra merah dikatakan layak digunakan jika penyimpangan rata – ratanya kurang dari 1% (Thermo 2001).

Tabel 5 Daerah serapan beserta gugus fungsi dan nama gugus fungsi*

Daerah Serapan (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi	Nama Gugus Fungsi
2850-2960	C-H	Alkana
1350-1470		
3020-3080	C=C	Alkena
3000-3100		
675-870	C-H	Aromatik
3300	C≡C	Alkuna
1640-1680	C=C	Alkena aromatik (cincin)
1500-1600	C=O	Aldehida eter asam karboksilat ester
1080-1300	C=O	Aldehida keton asam karboksilat ester
1690-1760	C=O	
3610-3640	O-H	Alkohol fenol (monomer)
2000-3600	O-H	Alkohol fenol (ikatan hidrogen)
3310-3500	O-H	Asam karboksilat
1180-1360	N-H	Amina
1515-1560	C-N	Nitro
1345-1385	-NO ₂	

Keterangan : *Harvey (2000)

Penggunaan KBr atau kalium bromide dikarenakan tingkatan energi ikatan pada KBr tidak masuk ke dalam daerah infra merah, sehingga ketika spektrofotometri infra merah dilakukan, gugus fungsi atau ikatan-ikatan yang ada di dalam KBr tidak terdeteksi sebagai suatu puncak. Sampel yang dianalisis adalah minyak ikan sebelum hidrolisis, minyak ikan setelah hidrolisis (monoester omega-3), dan hasil isolasi dengan menggunakan metode TLC dimana ketiganya akan dilihat gugus fungsi masing - masing dan dibandingkan antara satu dan yang lainnya.

Hasil analisis FTIR menunjukkan bahwa ketiga sampel yaitu minyak ikan sebelum hidrolisis, minyak ikan setelah hidrolisis, dan minyak ikan yang telah dilakukan isolasi dengan menggunakan metode TLC memiliki gugus fungsi alkana (C-H), Aldehida eter asam karboksilat ester (C=O), Aldehida keton asam karboksilat ester (C=O), alkohol fenol (ikatan hidrogen) (O-H), amina (C-N), dan nitro (-NO₂).

Ketiga sampel sama - sama memiliki gugus fungsi alkana tetapi dengan hasil serapan pada daerah serapan yang berbeda. Minyak ikan sebelum hidrolisis memiliki daerah serapan dengan gugus fungsi alkana lebih sedikit daripada minyak ikan setelah hidrolisis dan hasilisolasi. Minyak ikan setelah hidrolisis

(monoester omega-3) hasil isolasi pun memiliki daerah serapan yang sedikit berbeda walaupun dengan jumlah daerah yang sama. Berikut hasil pengujian disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6 Perubahan gugus fungsi pada ketiga sampel dengan analisis FTIR

Gugus Fungsi	Minyak Ikan		Hasil Isolasi TLC
	Sebelum Hidrolisis	Setelah Hidrolisis (monoester omega-3)	
C-H (alkana)	2922.16 2852.72 1463.97 1417.68 1377.17	2924.09 2852.72 1463.97 1417.68 1377.17 1359.82	2953.02 2924.09 2852.72 1463.97 1377.17 1365.60
C-H (aromatik)	3008.95	3005.1	
C=C (alkena)	1654.92		1602.85
C=C (aromatik cincin)		1558.48	1504.48
C-O (aldehida eter asam karboksilat eter)	1099.43 1116.78 1159.22 1236.37	1099.43 1116.78 1166.93 1240.23	1118.71 1168.86 1203.58 1247.94 1267.23
O-H (alkohol fenol)	2029.11	2029.11	2729.27
O-H (ikatan hidrogen)	2158.35 2310.72 2385.95 2679.13 2729.27 2852.72 2922.16 3008.95 3473.80	2310.72 2679.13 2731.2 2852.72 2924.09 3005.1 3468.01	2852.72 2924.09 2953.02
O-H (asam Karboksilat)	3008.95	3005.10	
N-H (amina)	3473.80 3473.8	3468.01 3468.01	
C-N (amina)	1236.37	1240.23 1359.82	1203.58 1247.94 1267.23

Minyak ikan sebelum dan setelah hidrolisis memiliki daerah serapan untuk gugus fungsi aromatik (C-H) tetapi tidak dengan hasilisolasi TLC. Hal ini dapat terjadi dikarenakan terjadinya penguapan selama proses isolasi dengan menggunakan TLC karena terdapat pelarut selama proses yang dapat melarutkan gugus aromatik tersebut dan menguapkannya bersamaan dengan pelarut yang digunakan. Ketiga sampel yang dilakukan analisis FTIR juga menunjukkan adanya gugus fungsi aldehida keton asam karboksilat

ester (C=O). Hal ini memang seharusnya karena minyak ikan memiliki kandungan yang berbeda dengan kandungan minyak yang lain antara lain jenis asam lemak yang lebih bervariasi, jumlah asam lemak yang lebih banyak yaitu asam lemak C20-C23 dan asam lemak tidak jenuh dengan lima hingga enam ikatan rangkap (polyunsaturated fatty acid) (Wang et al. 1990).

Hasil isolasi dengan TLC mengalami penurunan jumlah daerah serapan pada gugus fungsi O-H yaitu alkohol fenol (ikatan hidrogen) dikarenakan adanya pemutusan ikatan selama proses isolasi maupun hidrolisis. Terlebih pada gugus fungsi asam karboksilat, hasil isolasi menunjukkan tidak terdapatnya gugus tersebut. Padahal minyak ikan sebelum dan setelah hidrolisis memiliki daerah serapan untuk gugus fungsi asam karboksilat (O-H) ini. Hidrolisis pada prinsipnya merupakan reaksi pembentukan gliserol dan asam lemak bebas melalui pemecahan molekul lemak dan penambahan elemen air. Hidrolisis merupakan salah satu reaksi yang terjadi pada produk atau bahan pangan berlemak (Zarevucka dan Wimmer 2008). Ketiga sampel tidak memiliki gugus fungsi alkena (C=C), alkuna (C≡C), dan alkohol fenol(monomer) (O-H).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Isolasi yang dilakukan terhadap monoester omega-3 yang dihasilkan dari hidrolisis enzimatis minyak ikan bertujuan untuk memisahkan komponen yang terkandung didalamnya. Hal ini dilakukan berdasarkan perbedaan kepolaran dengan pelarut yang digunakan. Penggunaan metode TLC untuk isolasi membutuhkan pelarut yang sesuai. Pelarut yang sesuai untuk mengisolasi monoester omega-3 atau minyak ikan hasil hidrolisis enzimatis ini adalah petroleum benzen suhu 40°C tanpa menggunakan campuran pelarut lain. Hasil dari isolasi menunjukkan perubahan komponen yang terkandung didalamnya. Asam oktadekatrienoat (ALA) sebesar 3,29% lebih dominan dibandingkan EPA dan DHA yang sebelumnya mendominasi komponen minyak ikan sebelum maupun setelah hidrolisis.

Minyak ikan sebelum hidrolisis, setelah hidrolisis, dan hasil isolasi dengan menggunakan metode TLC memiliki gugus fungsi alkana (C-H), Aldehida eter asam karboksilat ester (C-O), Aldehida keton asam karboksilat ester (C=O), alkohol fenol (ikatan hidrogen) (O-H), amina (C-N), dan nitro (-NO₂). Ketiga sampel tidak memiliki gugus fungsi alkena (C=C), alkuna(C≡C), dan alkohol fenol (monomer) (O-H). Minyak ikan sebelum dan setelah hidrolisis memiliki daerah serapan untuk gugus fungsi aromatik (C-H) tetapi tidak dengan hasil isolasi TLC.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan pelarut lain atau campuran berbagai pelarut yang lebih beragam agar menghasilkan spot

pada *plat* kaca TLC yang lebih banyak. Spot yang lebih banyak menandakan semakin baik pelarut yang digunakan. Penggunaan metode isolasi yang lain, seperti distilasi molekuler, sangat dianjurkan agar mendapatkan hasil yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Celik H.** 2002. *Commercial Fish Oil*. ISSN 1302647X. B seri Cilt 3(1) : 1-6.
- Duthie IF, SM Barlow.** 1992. Dietary Lipid Exemplified by Fish Oils And Their N-3 Fatty Acid. *J. Food Sci.* Vol.6: 20-35.
- Haraldson GG, Kristinsson B, Sigurdardottir B, 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.* Vol.74: 1419-1424
- Harvey D.** 2000. *Chemistry: Modern Analytical Chemistry First Edition*. Page 388-409.
- Hoesada I.** 2009. Memahami Omega-3. [Terhubung berkala]: <http://www.ivanhoesada.com/id/artikel/memahami-omega-3>. Diakses pada 1 Februari 2014.
- Raharja S, Suryadarma P, Oktavia T.** 2011. Hidrolisis enzimatis minyak ikan untuk produksi asam lemak omega-3 menggunakan lipase dari *Aspergillus niger*. *J. Teknol. dan Industri Pangan.* XXII (1):64-72.
- Raharja S, Suparno O, Mangunwidjaja D, Herdiyani A, Oktavia T, Najah Z.** 2012. Penambahan pelarut organik pada media untuk hidrolisis enzimatis minyak ikan menggunakan lipase dari *Aspergillus niger*. *J. Teknol. Industri Pertanian.* 22(3):140-150.
- Settle, F.** 2001. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* [editorial]. Prentice Hall PTR, New Jersey, USA.
- Skoog DA et al.** 1996. *Fundamentals of Analytical Chemistry 7th Edition*. Orlando : Saunders College Publishing Page 592-597.
- Sudarmadji S.** 1996. *Teknik Analisis Biokimia*. Yogyakarta (ID) : Liberty Yogyakarta.
- Thermo N.** 2001. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Thermo Nicolet Corporation : Madison-USA.
- Wang YJ, Miller LA, Perren M, Addis PB.** 1990. Omega - 3 Fatty acids in Lake Superior Fish. *J. Food Sci.* 55:71.
- Zarevucka M, Wimmer Z.** 2008. Plant Product for Pharmacology: Application of Enzyme in Their Transformation. *Int J. Molecular Sci.* Vol. 9:2447-2473.