

## HIDROLISIS ENZIMATIK MINYAK IKAN UNTUK PRODUKSI ASAM LEMAK OMEGA-3 MENGGUNAKAN LIPASE DARI *Aspergillus niger*

[Enzymatic Hydrolysis of Fish Oil for Production of Omega-3 Fatty Acids Using Lipase Derived from *Aspergillus niger*]

Sapta Raharja\*, Prayoga Suryadarma, dan Teni Oktavia

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Diterima 26 Agustus 2010 / Disetujui 26 Desember 2010

### ABSTRACT

Fish oil is the source of important fatty-acid, especially polyunsaturated fatty acid (PUFA) omega-3, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Lipase catalysis activity of *Aspergillus niger* is low when it is used in fish oil hydrolysis. The activity of the lipase can be increased by adding organic solvent such as hexane into the media. This research aimed to determine temperature, pH and amount of water which produce the highest degree of hydrolysis of fish oil in the presence of hexane. Correlation between the highest degree of hydrolysis and the amount of omega-3 fatty acid was also investigated. The variables used in this research were temperatures (25-65) °C, pH (5-9), and water addition (1-5) %v/v. The highest degree of enzymatic hydrolysis of fish oil in the media without hexane was 28.07 % that was reached at 45°C and pH 5. In the presence of hexane, the highest degree of hydrolysis was 75.12 % which was reached at 5% water addition, temperature 45°C, and pH 5. GC-MS analysis showed that omega-3 fatty acid content especially EPA and DHA increased along with increase in the degree of hydrolysis. Concentration of omega-3 fatty acid produced without hexane addition was 18.42 % with EPA amounted to 12,17% and DHA 0,86%. Meanwhile omega-3 fatty acid content in the presence of hexane reached 21.93 % with EPA amounted to 17.75 % and DHA 1.21 %.

**Keywords:** Fish Oil, Omega-3, Hydrolysis, *Aspergillus niger* lipase, Hexane

### 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 yaitu asam eikosapentanoat (EPA) dan asam dokosaheksanoat (DHA) yang merupakan asam lemak yang esensial untuk manusia karena asam lemak ini tidak bisa diproduksi oleh tubuh manusia itu sendiri.

Efek kesehatan yang menguntungkan dari asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap (PUFA) n-3 dan berantai panjang, khususnya asam eikosapentanoat pada cis-5,8,11,14,17 dan asam dokosaheksanoat pada cis-4,7,10,13,16,19 adalah kemampuannya untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah serta untuk mencegah dan mengatasi beberapa jenis penyakit diantaranya penyakit jantung koroner, hipertensi, kanker, 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).

Bentuk asilgliserol dalam ilmu nutrisi dipertimbangkan lebih baik daripada etil ester karena bentuk alkil ester tidak mudah diserap oleh usus, sedangkan asam lemak bebas (FFA) mudah teroksidasi dan tidak dapat dikonsumsi manusia secara langsung. Berbagai macam cara telah dikembangkan oleh industri farmasi untuk memurnikan asam lemak omega-3 dari minyak ikan melalui metode fisika maupun kimia antara lain dengan pemisahan kromatografi, distilasi fraksional, kristalisasi

pada suhu rendah, urea complexation, supercritical fluid extraction, akan tetapi kebanyakan dari metode tersebut menghasilkan asam lemak omega-3 dalam bentuk asam lemak bebas (FFA) dan alkil ester (Wanasundara dan Shahidi, 1998).

Hoshino *et al.* (1990) menyatakan minyak ikan dihidrolisis secara parsial oleh enzim lipase, banyaknya asam lemak omega-3 pada minyak yang tersisa dalam bentuk asilgliserol meningkat secara signifikan dan metode tersebut kemudian lebih dikenal sebagai hidrolisis secara enzimatik. Keuntungan penggunaan lipase sebagai katalis daripada metode fisik maupun kimia antara lain efisiensi katalitik lipase yang tinggi sehingga jumlah enzim yang dibutuhkan cukup sedikit, 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 lebih tinggi tingkat kemurnian dan kualitasnya baik dalam hal rasa maupun warnanya (Haraldson *et al.*, 1997).

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 *stereochemical numbering* (sn)1 dan 3, sehingga dapat menjaga asam lemak omega-3 dalam bentuk asilgliserol yang umumnya terletak pada sn 2.

Sisi aktif enzim lipase ditutup oleh *lid* enzim yang tersusun dari triptofan yang bersifat fleksibel dan bersifat non polar (hidrofobik). Oleh karena itu, dibutuhkan suatu pelarut organik yang mempunyai sifat non polar (hidrofobik), sehingga dapat meningkatkan pembukaan *lid*, termostabilitas,

\*Korespondensi Penulis :  
Email : saptaraharja@ipb.ac.id

enantioselektivitas dan aktivitas lipase (Gupta, 2007). Pelarut organik yang bersifat hidrofobik dengan nilai kepolaran yang berada pada rentang penerimaan aktivitas dan stabilitas lipase yaitu antara 2 sampai 4, salah satunya adalah heksana. Menurut Baharum *et al.* (2003), heksana memiliki nilai log p sebesar 3,5 dan titik didih sebesar 69°C, dan dengan titik didih yang rendah isolasi produk dari pelarutnya dapat dilakukan dengan mudah.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi faktor reaksi yaitu suhu, pH dan penambahan air yang menghasilkan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan tertinggi pada media tanpa dan dengan ditambahkan pelarut organik heksana. Selain itu, tujuan penelitian ini juga untuk menentukan hubungan antara tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan tertinggi terhadap total asam lemak omega-3 yang dihasilkan.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak ikan dari hasil samping industri pengalengan ikan lemuru (*Sardinella sp.*) yang sudah diolah oleh perusahaan dan diperoleh dari daerah Muncar, Banyuwangi. Lipase dari *Aspergillus niger* diperoleh dari *Amano Pharmaceutical Manufacturing Co.* Lipase dari *Aspergillus niger* yang digunakan pada penelitian ini mempunyai aktivitas sebesar 7939,97 Unit/g. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis sampel adalah monosodium difosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), disodium fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), gas nitrogen, etanol 95%, kalium hidroksida (KOH), HCL 35-37%, metanol, isopropil alkohol, dan toluene

Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaker waterbath* yang dilengkapi dengan pemanas dan pengatur kecepatan, wadah gelas (diameter 4 cm dan tinggi 7 cm), kondensor, *spectrofotometry (Pharmacia Novaspec II)*, *magnetic stirrer*, *shaker tube*, dan *gas chromatography mass spectrometry (Agilent Technologies 7890A GC System dengan detector Agilent Technologies 5975C. MSD)*.

### Karakterisasi minyak ikan

Karakterisasi minyak ikan yang dilakukan meliputi analisis komposisi asam lemak yang terkandung dalam minyak ikan sebelum dihidrolisis, menggunakan *gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)* dan pengujian sifat kimia minyak ikan yaitu bilangan asam dan kadar asam lemak bebas (AOCS Cd 3d-63, 1997) serta 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  $\mu\text{mol}$  *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. Larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 ditambahkan sebanyak 0,54 ml ke dalam tabung ulir, dikocok

dengan *shaker tube* hingga larutan bercampur merata. Selanjutnya dimasukkan ke 0,01 ml larutan *p-nitrophenyl butyrate* 0,2 M, dikocok kembali dengan *shaker tube* hingga larutan bercampur rata. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Blanko dibuat sesuai dengan prosedur untuk sampel tanpa penambahan larutan enzim. Penghitungan aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Unit / ml enzim} = \frac{A-B}{t} \times Vt \times fp$$

$$K \times Ve$$

#### keterangan:

A = nilai absorbansi sampel

fp = Faktor pengencer

B = nilai absorbansi blanko

K = Nilai konversi standar *p-nitrophenyl butyrate* (0,0148  $\mu\text{mol}$ )

T = lama inkubasi (menit)

Vt = Volume total larutan sampel (ml)

Ve = Volume larutan enzim (ml)

### Hidrolisis enzimatis minyak ikan (Modifikasi 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 heksana untuk menentukan suhu dan pH yang memberikan hasil tingkat hidrolisis tertinggi yang akan digunakan pada hidrolisis enzimatis tahap kedua. Hidrolisis enzimatis tahap kedua dilakukan dengan penambahan pelarut organik heksana pada medianya.

Minyak ikan sebanyak 4 gram ditambahkan 6 ml *buffer* fosfat 0,1 M (pH 5,6,7,8,9) yang didalamnya telah dilarutkan 800 unit lipase dari *Aspergillus niger* (200 U/gram minyak) dan penambahan air yaitu (1, 2, 3, 4 dan 5%) v/v terhadap larutan. Pelarut organik yaitu heksana ( $\rho:0.65 \text{ g/cm}^3$ ) ditambahkan ke dalam campuran larutan enzim lipase, air dan minyak, dengan perbandingan antara larutan lipase terhadap pelarut heksana adalah 3:1 (v:v). Larutan kemudian ditempatkan ke dalam wadah gelas (diameter 4 cm dan tinggi 7 cm). Wadah berisi larutan kemudian dibilas dengan gas nitrogen dan ditutup dengan sumbat karet serta plastik *wrap*.

Setelah itu wadah gelas ditempatkan dalam *shaker waterbath* untuk kemudian dihidrolisis selama 48 jam dengan kecepatan 200 rpm pada berbagai suhu inkubasi yang dicobakan yaitu 25, 35, 45, 55, 65°C. Setelah proses hidrolisis enzimatis minyak ikan selesai, selanjutnya ditambahkan 2 ml metanol dan dicampur hingga merata untuk menghentikan aktivitas lipolitik enzim lipase, kemudian dilakukan analisis produk akhir. Untuk perlakuan kontrol, sama dengan prosedur diatas, akan tetapi kedalam campuran reaksi tidak ditambahkan larutan enzim 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 3a-63. Nilai bilangan asam yang diperoleh setelah hidrolisis digunakan untuk menentukan tingkat hidrolisisnya.

Adapun persamaan perhitungan untuk menentukan tingkat hidrolisis sebagai berikut :

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

Keterangan :

A : Nilai bilangan asam sebelum hidrolisis (mg KOH/ g minyak)

B : Nilai bilangan asam setelah hidrolisis (mg KOH/ g minyak)

P : Nilai bilangan penyabunan (mg KOH/g minyak)

**Analisis komponen minyak hasil hidrolisis menggunakan GC-MS (Modifikasi Metode Wanasundara dan Shahidi, 1998)**

Terhadap hasil hidrolisis enzimatik minyak ikan kemudian dilakukan pemisahan berdasarkan sifat kepolarannya dengan menempatkan hasil hidrolisis ke dalam labu pemisah. Air, gliserol dan lipase yang cenderung polar akan menempati lapisan paling bawah untuk kemudian dipisahkan dan dibuang. Pelarut heksana yang mengandung tri-, di-dan monoasilgliserol yang bersifat non polar akan memisah dan berada pada lapisan paling atas.

Terhadap produk yang terdapat di dalam pelarut heksana kemudian dilakukan pengukuran total asam lemak omega-3 dengan menggunakan GC-MS. Sebanyak 1 µL fraksi minyak di dalam pelarut heksana kemudian injeksikan kedalam *gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) untuk dilakukan analisis terhadap kandungan total omega-3 produk.*

**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, minyak ikan yang digunakan sebagai bahan baku untuk proses hidrolisis dengan katalis lipase dari *Aspergillus niger* mempunyai nilai bilangan asam dan kadar asam lemak bebas yang sesuai dengan standar mutu untuk minyak ikan berkualitas baik. Nilai tersebut juga memenuhi sifat kimia minyak ikan sebagai bahan baku untuk hidrolisis menurut Celik (2002).

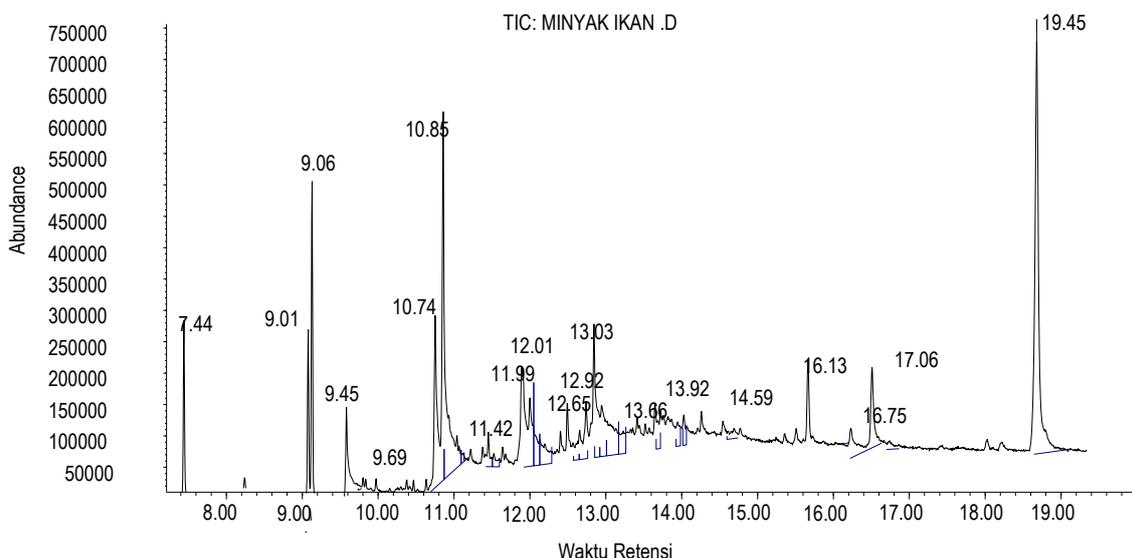
Selain itu minyak yang digunakan oleh Fu *et al.* (1995) dalam percobaan hidrolisis minyak dengan lipase dari *Aspergillus sp* mempunyai kadar asam lemak bebas berkisar 0,8-2,6%, sehingga minyak ikan pada percobaan ini masih sesuai dengan penelitian sebelumnya.

Tabel 1. Hasil karakterisasi sifat fisikokimia minyak ikan

Karakteristik	Satuan	Nilai terukur	Celik (2002)	Jedwar ds Int. Inc (2005)
Bilangan asam	mg KOH/g	3,26	10,15	1,5
Kadar asam lemak bebas	%	1,49	4,6	0,69
Bilangan penyabunan	mg KOH/g	204,81	187,4	180

Nilai bilangan penyabunan yang diperoleh mempunyai nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan bilangan penyabunan minyak ikan yang digunakan dalam penelitian Celik (2002). Perbedaan nilai bilangan penyabunan ini dikarenakan minyak ikan yang digunakan dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian Celik (2002), karena tingkat pemurnian oleh industri kecil di Banyuwangi yang berbeda dengan minyak ikan dari industri besar yang digunakan pada penelitian Celik (2002). Perbedaan nilai ini diduga karena asam lemak pada sampel cukup tinggi sehingga nilai bilangan penyabunannya lebih tinggi.

Hasil analisis komponen minyak dengan GC-MS menunjukkan bahwa minyak ikan diketahui mempunyai kandungan asam lemak jenuh 23,2%, asam lemak tidak jenuh 34,98%, senyawa alkana 11.19%, squalen 4,75%, aldehid 0,88% dan lanol 24,96% dari keseluruhan total komponen di dalam minyak ikan. Dari data hasil analisis juga diketahui ada dua jenis asam lemak yang dominan dari keseluruhan komponen didalam minyak ikan yaitu asam lemak oleat 26,37% yang merupakan asam lemak tidak jenuh dengan satu ikatan rangkap dan asam lemak palmitat 16,81% yang merupakan asam lemak jenuh (Gambar 1).

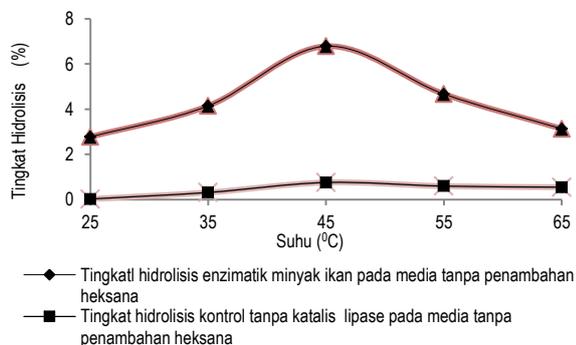


Gambar 1. Hasil analisis komponen minyak ikan dengan menggunakan GC-MS

**Hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media tanpa penambahan pelarut organik heksana**

**Hubungan antara suhu inkubasi dengan tingkat hidrolisis**

Gambar 2 menunjukkan tingkat hidrolisis tertinggi diperoleh pada penggunaan suhu inkubasi 45°C yaitu 6,79%. Sedangkan tingkat hidrolisis terendah yaitu 2,77%, diperoleh pada penggunaan suhu inkubasi 25°C. Hal ini sesuai dengan pernyataan Murty *et al.* (2002) bahwa lipase dari *Aspergillus niger* akan aktif dan bekerja optimal pada suhu 45°C.



Gambar 2. Kurva hubungan antara suhu dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media tanpa penambahan pelarut organik heksana (pH 7)

Peningkatan suhu inkubasi dari suhu 25°C menjadi 35°C menyebabkan tingkat hidrolisis yang diperoleh meningkat 1,37% sehingga diperoleh tingkat hidrolisis 4,15%. Sedangkan peningkatan penggunaan suhu inkubasi dari 35°C menjadi 45°C memberikan kenaikan tingkat hidrolisis tertinggi yaitu 2,64%. Penggunaan suhu yang tinggi pada reaksi hidrolisis enzimatis minyak ikan akan meningkatkan hasil konversi. Pada penggunaan suhu reaksi yang terlalu rendah menyebabkan laju reaksi berjalan lambat, akibatnya tumbukan antar pereaksi rendah dan minyak tidak terhidrolisis secara sempurna.

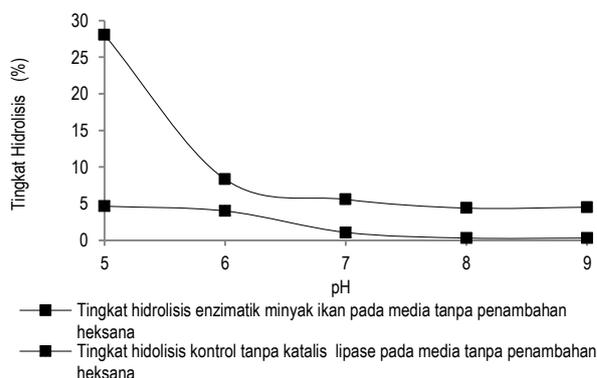
Namun setelah mencapai suhu yang optimum yaitu suhu 45°C, peningkatan suhu inkubasi 10°C akan menurunkan laju reaksi pembentukan asam lemak bebas. Akibatnya tingkat hidrolisis pada suhu 55 dan 65°C menurun 2,21 dan 3,66% dari tingkat hidrolisis tertinggi, sehingga diperoleh tingkat hidrolisis 4,67 dan 3,13%. Suhu yang tinggi selain dapat meningkatkan laju reaksi juga dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi dikarenakan deformasi atau perubahan bentuk struktur tersier atau struktur tiga dimensi lipase dari *Aspergillus niger* yang menyebabkan kerusakan pada sisi aktifnya dan menginaktivkan enzim tersebut. Perubahan ini semakin berlanjut dengan semakin tingginya suhu reaksi hidrolisis. Oleh sebab itu, aktivitas katalitiknya semakin rendah pada setiap peningkatan suhu 10°C dari suhu inkubasi optimumnya. Hasil hidrolisis dari kontrol tanpa lipase memberikan tingkat hidrolisis yang rendah yaitu kurang dari 1%.

**Hubungan antara derajat keasaman (pH) dengan tingkat hidrolisis**

Menurut Ozturk (2001), setiap enzim mempunyai pH optimal yang membantu menjaga konformasi alaminya dalam lingkungan dimana enzim bekerja.

Hasil analisis pada Gambar 3, menunjukkan bahwa peningkatan pH menyebabkan penurunan tingkat hidrolisis. Tingkat

hidrolisis yang memberikan nilai tertinggi diperoleh pada hidrolisis dengan menggunakan media pada pH 5 yaitu 28,07%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Petersen *et al.* (2001) bahwa lipase dari *Aspergillus niger* akan aktif pada kondisi lingkungan yang asam dengan aktivitas optimumnya pada pH 4,5-6,5. Penggunaan nilai pH dibawah rentang pH optimum menyebabkan enzim mengalami penggumpalan karena titik isoelektrik lipase dari *Aspergillus niger* berada pada pH 4,1.



Gambar 3. Kurva hubungan antara pH dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media tanpa penambahan pelarut organik heksana (suhu 45°C)

Pada penggunaan media pH 6, tingkat hidrolisis yang diperoleh lipase dari *Aspergillus niger* mengalami penurunan sebesar 19,73% dari tingkat hidrolisis tertingginya, hal tersebut dikarenakan enzim mengalami denaturasi sisi aktif enzim karena ion H<sup>+</sup> berikatan dengan NH<sub>3</sub><sup>+</sup> pada struktur asam amino protein membentuk NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan antara atom nitrogen dengan atom hidrogen lainnya terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Penurunan tingkat hidrolisis terbesar diperoleh pada penggunaan pH media yang bersifat netral cenderung ke arah basa yaitu pada pH 7, 8 dan 9 dengan penurunan tingkat hidrolisis lebih dari 20%. Penurunan tingkat hidrolisis tersebut dikarenakan rusaknya struktur tiga dimensi enzim dikarenakan pada kondisi tersebut gugus OH<sup>-</sup> dari lingkungan akan berikatan dengan ion H<sup>+</sup> dari gugus COO<sup>-</sup> sisi aktif enzim membentuk H<sub>2</sub>O. Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, akibatnya enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Pada kontrol tanpa menggunakan lipase sebagai katalis menunjukkan tingkat hidrolisis kurang dari 5%.

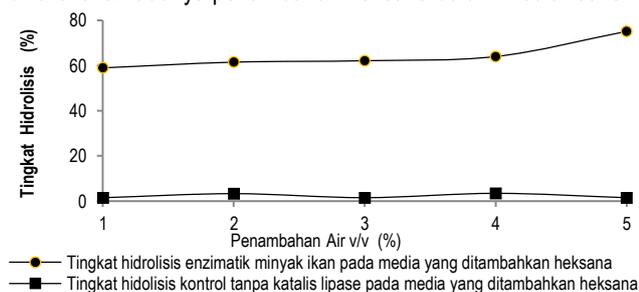
**Hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media dengan penambahan pelarut organik heksana**

**Hubungan antara penambahan air dengan tingkat hidrolisis**

Pada proses hidrolisis enzimatis walaupun menggunakan pelarut organik heksana sebagai media, sejumlah air secara mutlak dibutuhkan untuk mengaktifkan sisi katalitik dari enzim.

Berdasarkan Gambar 4, diketahui bahwa dengan penambahan pelarut organik heksana dan sejumlah air ke dalam media reaksi dapat meningkatkan tingkat hidrolisis minyak ikan yang dapat dicapai lipase jika dibandingkan dengan kontrol tanpa penambahan enzim lipase. Pada kontrol, tingkat hidrolisis yang berkisar 5% diduga merupakan hasil hidrolisis dikarenakan

adanya sejumlah air dan panas pada media reaksi bukan dikarenakan adanya penambahan heksana dalam media reaksi.



Gambar 4. Kurva hubungan antara penambahan air dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana (suhu 45°C dan pH 5)

Dari Gambar 4 dapat diketahui bahwa penambahan air 5% v/v larutan merupakan jumlah minimum air yang dibutuhkan oleh lipase dari *Aspergillus niger* pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana untuk membentuk selapis (monolayer) molekul air yang mampu menutup permukaan enzim. Oleh sebab itu, lipase tetap dapat mengaktifkan sisi-sisi katalitiknya dan memelihara konformasi alaminya (struktur tiga dimensi) supaya terjadi migrasi asilester ke arah pembentukan produk dengan parameter asam lemak bebas yang meningkat, sehingga diperoleh tingkat hidrolisis tertinggi yaitu 75,12% pada rentang penambahan air yang dicobakan.

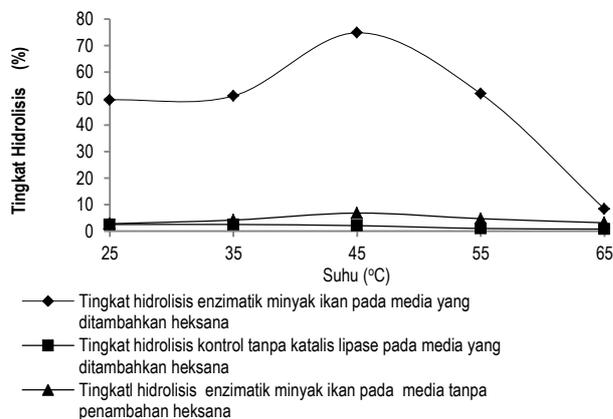
Penambahan air 4% menyebabkan penurunan tingkat hidrolisis sebesar 11,12% dari tingkat hidrolisis tertingginya. Sedangkan penurunan tingkat hidrolisis lebih dari 13% dari tingkat hidrolisis tertinggi terjadi pada penambahan air 3, 2 dan 1%, dengan tingkat hidrolisis terendah yaitu 58,98% pada penambahan air 1%. Hal tersebut dikarenakan jumlah air yang terlalu sedikit akan mengurangi kemungkinan kontak fisik antara lipase dari *Aspergillus niger* dengan air sebagai pereaksi yang berguna untuk mengaktifkan sisi katalitik enzim lipase, sehingga proses hidrolisis enzimatis tidak berjalan optimal. Selain itu, jumlah air yang terlalu sedikit menyebabkan sisi aktif asil ester sering tidak dapat bereaksi dengan molekul air untuk memotong asil enzim dan membentuk produk.

**Hubungan antara suhu inkubasi dengan tingkat hidrolisis**

Penambahan pelarut organik heksana selain meningkatkan aktivitas enzim juga dapat menggeser kesetimbangan termodinamika dan termostabilitas enzim untuk meningkatkan laju reaksi hidrolisis (Rahman *et al.*, 2006). Namun, berdasarkan hasil pengujian penambahan pelarut organik heksana pada media reaksi hanya meningkatkan aktivitas katalitik dan termostabilitas lipase dari *Aspergillus niger* dalam reaksi hidrolisis enzimatis dan tidak menyebabkan pergeseran suhu optimum dari enzim lipase

Bila dilihat dari Gambar 5, rentang suhu 25-55°C merupakan rentang suhu yang memberikan tingkat hidrolisis yang cukup tinggi. Tingkat hidrolisis tertinggi yaitu 74,83% diperoleh pada penggunaan suhu inkubasi 45°C. Tingginya tingkat hidrolisis yang diperoleh dikarenakan pada kondisi lingkungan hidrofobik mikroakueus dimana jumlah air terbatas, peningkatan suhu inkubasi hingga mencapai suhu optimumnya akan meningkatkan kelarutan substrat yaitu minyak ikan ke

dalam pelarut organik heksana, sehingga substrat akan dibawa oleh pelarut heksana melalui kantung hidrofobik enzim menuju sisi katalitiknya untuk dihidrolisis. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Probandari *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa suhu optimum proses interesterifikasi antara minyak ikan, asam laurat dan lipase *Candida rugosa* selama 24 jam pada suhu 45°C.



Gambar 5. Kurva hubungan antara suhu dengan tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media

Peningkatan suhu inkubasi 10°C dari suhu 25 ke 35°C memberikan kenaikan tingkat hidrolisis sebesar 1,50%, sehingga diperoleh tingkat hidrolisis 51,00% dari sebelumnya yang 49,50%. Penggunaan suhu inkubasi yang lebih tinggi 10°C dari suhu optimumnya yaitu suhu 55°C, menyebabkan enzim mulai mengalami deaktivasi akibat terdenaturasinya protein enzim pada suhu tinggi, sehingga tingkat hidrolisisnya mengalami penurunan sebesar 23,02% dari tingkat hidrolisis tertinggi. Rendahnya tingkat hidrolisis yang diperoleh pada suhu 65°C hingga berada pada nilai 8,33% atau turun 66,5% dari tingkat hidrolisis tertingginya, mengindikasikan enzim mengalami denaturasi protein secara besar-besaran, sebab suhu 65°C nilainya mendekati titik didih heksana pada 69°C yang menyebabkan struktur tiga dimensi dari enzim mulai mengalami kerusakan karena pelarut organik heksana tidak dapat mempertahankan konformasi alami lipase dari *Aspergillus niger*, sehingga aktivitas katalitiknya rendah.

Dari kurva hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan, pada media tanpa dan yang ditambahkan pelarut organik heksana (Gambar 5), diketahui bahwa penambahan pelarut heksana pada penggunaan suhu inkubasi 25 dan 35°C pada media reaksi menyebabkan tingkat hidrolisisnya meningkat 46,73 dan 46,85% dari nilai hidrolisis enzimatis pada media tanpa penambahan pelarut heksana pada suhu yang sama. Peningkatan aktivitas katalitik lipase terbesar diperoleh pada hidrolisis minyak ikan dalam media yang ditambahkan pelarut organik heksana dengan suhu inkubasi 45°C, dimana tingkat hidrolisisnya meningkat 68,2% dari tingkat hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media tanpa penambahan pelarut heksana pada suhu 45°C. Meningkatnya hasil hidrolisis disebabkan pelarut organik hidrofobik heksana mempunyai konstanta dielektrika yang rendah, sehingga dapat memperkuat dan menstabilkan struktur enzim secara keseluruhan jika dibandingkan dengan hasil hidrolisis enzimatis tanpa penambahan pelarut heksana, dimana banyaknya kandungan air didalamnya

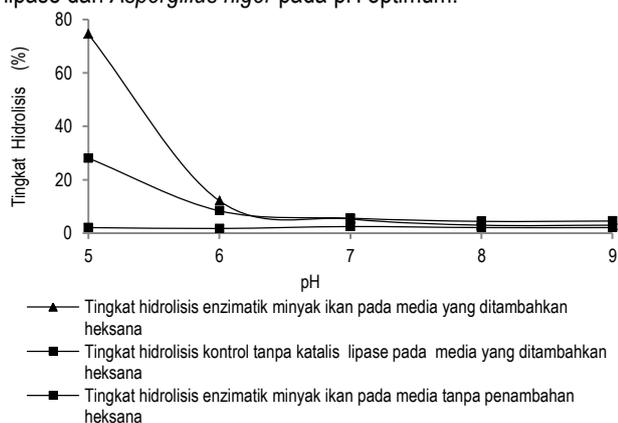
menyebabkan struktur enzimnya bersifat labil dan mempercepat terjadinya denaturasi enzim oleh faktor panas.

Peningkatan hasil hidrolisis pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana juga terjadi pada penggunaan suhu yang lebih tinggi dari suhu optimumnya yaitu pada suhu 55 dan 65°C, dimana tingkat hidrolisis yang diperoleh jika dibandingkan dengan tingkat hidrolisis enzimatik pada media tanpa penambahan pelarut organik heksana nilainya meningkat 47,14 dan 4,90%. Hal tersebut dikarenakan kenaikan rigiditas molekul lipase karena penambahan pelarut organik heksana membuat enzim lebih tahan terhadap panas (termostabilitas meningkat) dan tidak mudah terdenaturasi pada suhu tinggi. Kontrol hasil hidrolisis digunakan untuk membuktikan adanya aktivitas katalitik lipase dari *Aspergillus niger* pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana.

Sesuai dengan penelitian yang dilakukan Martati *et al.* (20.) bahwa hidrolisis minyak hati ikan cod dengan lipase dari *Mucor miehei* akan memberikan tingkat hidrolisis terbesar pada suhu 60°C yaitu 77,7% dengan penambahan heksana dibandingkan dengan suhu 40°C dengan nilai 64,6%.

**Hubungan antara derajat keasaman (pH) dengan tingkat hidrolisis**

Pada pengujian pengaruh penambahan pelarut heksana pada berbagai pH, penambahan pelarut heksana pada hidrolisis enzimatik minyak ikan tidak menyebabkan pergeseran stabilitas pH optimum, akan tetapi hanya meningkatkan aktivitas katalitik lipase dari *Aspergillus niger* pada pH optimum.



Gambar 6. Kurva hubungan antara pH dengan tingkat hidrolisis enzimatik minyak ikan pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana (penambahan air 5%v/v dan suhu 45°C)

Gambar 6 memperlihatkan pada media yang ditambahkan heksana diperoleh tingkat hidrolisis enzimatik pada pH pengujian yang lebih tinggi daripada tingkat hidrolisis yang diperoleh pada kontrol. Hal tersebut membuktikan adanya aktivitas katalitik oleh lipase dari *Aspergillus niger* pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana.

Dari kurva hubungan antara pH dengan tingkat hidrolisis enzimatik minyak ikan pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana (Gambar 6) diketahui pH 5 merupakan pH optimum lipase dari *Aspergillus niger* dalam melakukan aktivitas katalitiknya. Hal tersebut dapat dilihat pada tingginya tingkat hidrolisis yang mencapai 74,51%. Peningkatan penggunaan

nilai pH yang lebih tinggi dari pH optimumnya menyebabkan penurunan tingkat hidrolisis yang diperoleh. Pada penggunaan media dengan pH 6 tingkat hidrolisis yang diperoleh lipase dari *Aspergillus niger* mengalami penurunan sebesar 62,42% dari tingkat hidrolisis tertingginya. Hal tersebut diduga pada pH 6 enzim mengalami denaturasi sisi aktif enzim karena ion H<sup>+</sup> berikatan dengan NH<sub>3</sub><sup>+</sup> pada struktur asam amino protein membentuk NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Sedangkan pada PH 7, 8 dan 9, tingkat hidrolisis yang dihasilkan oleh lipase dari *Aspergillus niger* menurun hingga 70% dari tingkat hidrolisis pada pH 5. Penurunan tingkat hidrolisis terbesar pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana terjadi pada penggunaan pH 8 dan 9, dimana tingkat hidrolisis yang diperoleh yaitu 2,95% nilainya tidak berbeda secara signifikan dengan tingkat hidrolisis pada kontrol. Hal itu mengindikasikan bahwa pada pH 8 dan 9, penurunan tingkat hidrolisis dikarenakan enzim mengalami denaturasi akibat struktur enzim berubah.

Berdasarkan kurva hasil hidrolisis enzimatik minyak ikan pada media tanpa dan yang ditambahkan pelarut organik heksana dapat diketahui bahwa penambahan pelarut organik heksana kedalam media yang bersifat asam yaitu pH 5 dan 6 akan meningkatkan aktivitas katalitik lipase dari *Aspergillus niger*. Peningkatan aktivitas katalitik lipase terbesar diperoleh pada penambahan pelarut heksana pada media dengan pH 5, dimana tingkat hidrolisisnya meningkat 46,44% dari tingkat hidrolisis tanpa penambahan pelarut heksana pada pH yang sama.

Sedangkan pada pH 6, penambahan pelarut heksana hanya memberikan kenaikan 3,75%. Tingginya tingkat hidrolisis yang diperoleh pada pH 5 dikarenakan pelarut organik heksana pada kondisi pH yang optimum untuk lipase bekerja, dapat meningkatkan stabilitas gugus ionik pada enzim, dimana gugus ionik ini berperan dalam menjaga konformasi alami sisi aktif enzim dalam mengikat substrat. Lipase dalam pelarut organik hidrofobik menjadi tidak stabil pada kondisi basa (pH>7) dan kondisi yang cenderung asam (pH<5) (Akova dan Ustun, 2000). Hal tersebut sesuai dengan hasil pengujian dimana pada media dengan pH yang bersifat netral yaitu pH 7, penambahan pelarut organik heksana menyebabkan terjadinya deaktivasi enzim lipase, sehingga menyebabkan penurunan tingkat hidrolisis sebesar 0,31% dari tingkat hidrolisis tanpa penambahan pelarut heksana pada pH yang sama.

Sedangkan penambahan pelarut organik heksana pada media yang bersifat basa yaitu pada pH 8 dan 9, menyebabkan lipase mengalami inaktivasi dengan penurunan tingkat hidrolisis sebesar 1,44 dan 1,56% dari nilai hidrolisis tanpa penambahan pelarut heksana pada pH yang sama. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Saxea *et al.* (2009) dimana optimasi produksi enzim lipase secara ekstraseluler oleh kapang *Aspergillus niger* pada substrat minyak sawit adalah pada kondisi pH 5.6 dan suhu 25°C. Wanasundara dan Shahidi (1998) juga menyatakan bahwa enzim lipase *Aspergillus niger* melakukan katalitik optimum pada pH optimum 5-7.

**Hubungan antara tingkat hidolisis tertinggi dengan total Omega-3 yang dihasilkan**

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 omega-3 adalah asam eikosapentanoat (C20:5 $\omega$ -3, umumnya dikenal sebagai EPA) dan asam dokosaheksanoat (C22:6 $\omega$ 3, umumnya dikenal sebagai DHA) (Aidos,2002).

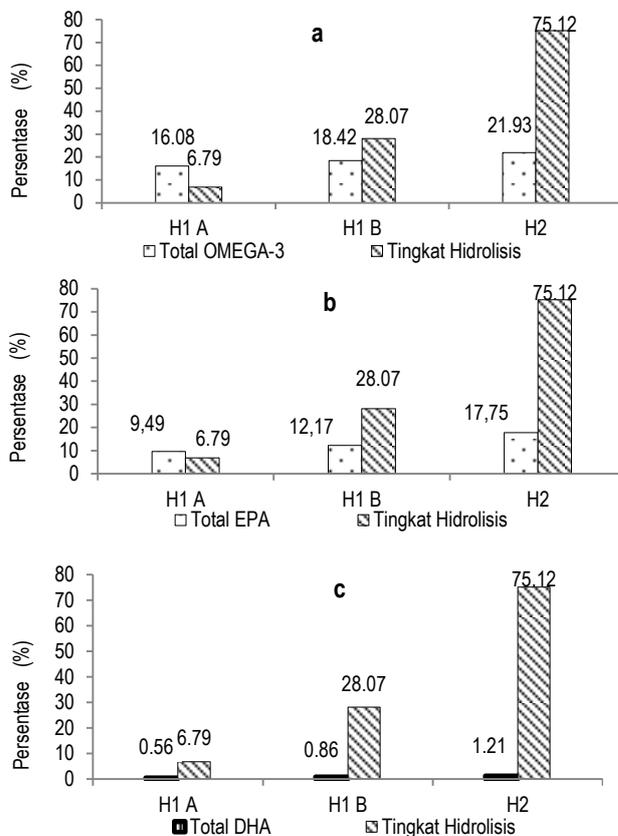
Berdasarkan hasil pengujian komponen minyak ikan pada fase non polar menggunakan GC-MS, diketahui bahwa hidrolisis minyak ikan dengan menggunakan katalis lipase dari *Aspergillus niger* dapat meningkatkan kandungan asam lemak omega-3 pada kondisi optimum faktor reaksi. Gambar 7 (a) menunjukkan kandungan asam lemak omega-3 tertinggi yaitu 21,93% dari seluruh total komponen minyak ikan yang terdapat pada sampel tersebut dengan tingkat hidrolisis 75,12% (H2). Tingginya kandungan asam lemak omega-3, diduga berkaitan dengan hidrolisis minyak ikan pada media yang ditambahkan heksana yang 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, sehingga tidak mudah rusak atau tereduksi menjadi komponen lain seperti oleh perubahan kondisi lingkungan selama proses.

Pada sampel H1(A) dan H1(B) hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan tanpa penambahan heksana, diketahui banyaknya asam lemak omega-3 yang terkandung didalamnya yaitu sebesar 16,08 dan 18,42% dari seluruh total komponen dalam minyak ikan. Pada sampel H1(A) dengan tingkat hidrolisis yang lebih rendah yaitu 6,79% jika dibandingkan dengan sampel H1(B) yaitu 28,07%, mempunyai kandungan asam lemak omega-3 yang lebih tinggi dibandingkan tingkat hidrolisisnya. Hal tersebut diduga pada sampel H1(B) 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 banyaknya ikatan rangkap (PUFA) omega-3 yang terbentuk. Untuk asam lemak, pH 5 merupakan pH ekstrim jika dibandingkan pH 7 yang digunakan pada sampel H1(A), sehingga menyebabkan terjadinya proses oksidasi, isomerisasi cis-trans atau migrasi ikatan ganda asam lemak omega-3 pada suhu relatif tinggi (45°C).

Banyaknya kandungan asam lemak omega-3 pada sampel yang telah mengalami hidrolisis enzimatis minyak ikan dikarenakan lipase dari *Aspergillus niger* dengan spesifisitas posisional *stereochemical numbering* (sn) 1,3 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) (lihat 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).

Dari Gambar 7 (b) dan (c), dapat dilihat bahwa hidrolisis enzimatis minyak ikan dengan katalis lipase dari *Aspergillus niger* juga dapat meningkatkan kandungan asam lemak EPA dan DHA pada kondisi optimum faktor reaksi. Pada sampel hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan tanpa penambahan pelarut heksana yaitu sampel H1(A) dan H1(B) dengan tingkat hidrolisis

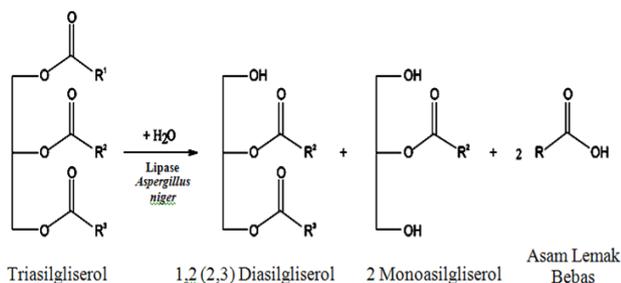
6,79 dan 28,07%, diketahui kandungan EPA di dalamnya yaitu sebesar 9,49 dan 12,17%, dengan kandungan DHA didalamnya sebesar 0,56 dan 0,86% dari total seluruh komponen dalam minyak ikan. Peningkatan kandungan EPA dan DHA tertinggi terdapat pada sampel H2 hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan dengan penambahan 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 H1(B), sedangkan kandungan DHA di dalamnya 1,21% dari seluruh total komponen dalam minyak ikan atau meningkat 0,35% jika dibandingkan dengan sampel H1(B).



Gambar 7. Diagram hubungan antara tingkat hidrolisis dengan total omega-3 (a), total EPA (b) total DHA (c) hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan pada kondisi optimum reaksi. H1(A) : Hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media tanpa penambahan pelarut organik heksana pada kondisi reaksi suhu 45°C dan pH 7; H1(B) : Hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media tanpa penambahan pelarut organik heksana pada reaksi suhu 45°C dan pH 5; H2 : Hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan pada media yang ditambahkan pelarut organik heksana pada kondisi reaksi suhu 45°C, pH 5 dan penambahan air 5% v/v

Nilai ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Wanasundara dan Shahidi (1998) dimana reaksi hidrolisis minyak ikan *menhaden* dengan lipase dari *Aspergillus niger* memiliki tingkat hidrolisis sebesar 9% selama 72 jam dengan kandungan EPA 14% dan DHA 10%. Sedangkan pada reaksi hidrolisis minyak ikan *seal bubble*, tingkat hidrolisis yang diperoleh selama 72 jam sebesar 25% dengan konversi EPA 7% dan DHA 10%. Perbedaan ini disebabkan perbedaan

metode tanpa menggunakan penambahan air dan suhu inkubasi 35°C sehingga proses hidrolisis menjadi tidak sempurna.



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

Tingginya kandungan EPA pada sampel hasil hidrolisis enzimatis jika dibandingkan dengan kandungan DHA dikarenakan jenis minyak ikan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari ikan lemuru (*Sardinella sp.*) yang mempunyai kandungan EPA lebih banyak daripada DHAnya (Halldorsson *et al* 2003). Banyaknya kandungan EPA dan DHA pada minyak ikan yang telah mengalami hidrolisis enzimatis dikarenakan 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*.

Hoshino *et al.* (1990) menunjukkan bahwa hidrolisis minyak ikan oleh lipase ditentukan dari berbagai faktor yang saling terkait, diantaranya perbedaan substrat yang spesifik, termasuk asam lemak dan posisional spesifik lipase, perbedaan dalam tingkat reaksi yang terjadi selama proses hidrolisis, perbedaan komposisi asam lemak dari minyak yang digunakan dan reaktivitas dari setiap lipase dalam mengkonversi minyak menjadi acylglycerols parsial (mono dan diacylglycerols).

### KESIMPULAN

Pada hidrolisis enzimatis minyak ikan dalam media tanpa penambahan pelarut organik heksana, tingkat hidrolisis tertinggi yaitu 28,07% diperoleh dari aktivitas katalitik lipase dari *Aspergillus niger* pada suhu 45°C dan pH 5, sedangkan pada hidrolisis enzimatis minyak ikan dalam media yang ditambahkan pelarut organik heksana, tingkat hidrolisis tertinggi sebesar 75,12% diperoleh dari aktivitas katalitik lipase dari *Aspergillus niger* pada penambahan air 5%, suhu 45°C dan pH 5.

Berdasarkan hasil analisis dengan GC-MS, banyaknya kandungan asam lemak omega-3 khususnya EPA dan DHA meningkat dengan semakin meningkatnya tingkat hidrolisis. Pada hasil hidrolisis enzimatis minyak ikan tertinggi dalam media tanpa penambahan heksana (tingkat hidrolisis 28,07%)

diketahui kandungan asam lemak omega-3nya 18,42% dengan jumlah EPA 12,17% dan DHA 0,86%. Sedangkan pada hasil hidrolisis enzimatis tertinggi dalam media yang ditambahkan heksana (tingkat hidrolisis 75,12%), kandungan asam lemak omega-3nya yaitu 21,93% dengan jumlah EPA 17,75% dan DHA 1,21%.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aidos I. 2002. Production of high-quality fish oil from herring byproducts. Dissertation. Universitas Wageningen, Belanda. <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3270.pdf>. [18 September 2008].
- Akova A, Üstün G. 2000. Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on celite at different pH values. *Biotechnology Letters* 22: 355-359.
- AOCS. 1997. AOCS Official Methods. Association of Oil Chemist' Society. Washington D.C.
- 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 of Microbiology* 53: 75-83.
- Carvalho PO, Paula RBC, Maximiliano DN, Patrícia BLF, Leonardo VF. 2009. Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native enzyme lipases: Optimization of process parameters. *J Braz Chem Soc* 20(1): 117-124.
- Celik H. 2002. Commercial fish oil. ISSN 1302 647X. B serisi Cilt 3, no.1:1-6.
- De Busk R. 2007. Omega-3 fatty acids. <http://www.umm.edu/omega-3-000316.htm>. [16 September 2008].
- Fu X, Zhu X, Gao K, Duan J. 1995. Oil and Fat Hydrolysis with Lipase from *Aspergillus sp.* *JAOCS*, 72:527-531.
- Gupta K. 2007. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. *J App Sci Env 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 enzyme lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol. *J Am Oil Chem* 74: 1419-1424.
- Hoshino T, Yamane T, Shimizu S. 1990. Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Agr Biol Chem* 54(6): 1459-1467.
- Jedwards International, Inc. 2005. *Fish Oil (18/12)*. <http://www.bulknaturaloils.com/fishoil/epadha/fishoil1812.html>. [9 Februari 2010].
- Martati E, T Utami, P Hastuti. 1999. Profil Gliserida dan Kandungan EPA (Eicosapentanoat) dan DHA (Docosaheksanoat) Hasil Hidrolisis Minyak Hati Ikan Cod Oleh Lipase teramobil dari *Mucor Miehei*. *Agritech*.19 1:5-10.

- Murty RV, J Bhat, PKA Muniswaran. 2002. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. *Biotechnol. Bioprocess Eng* 7: 57-66
- Ozturk B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. Dissertation. Izmir Institute of Technology. Izmir.
- Petersen MTN, Fojan P and Petersen SB. 2001. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotech* 85(2): 115-147.
- Probondari, C Hidayat, Supriyadi. 2008. Enzymatic Synthesis of Structured Lipid from Fish Oil and Lauric Acid using Immobilized *Candida rugosa* Lipase on New Developed Zirconia-Agarose. *Prosiding Teknologi Proses*. Gadjah mada University, Yogyakarta.
- Rahman RNZRA, Baharum SN, Salleh AB and Basri M. 2006. S5: An organic solvent tolerant enzyme. *J Microb* 44(6): 583-590.
- Saxena RK, PK Ghosh, R Gupta, WS Davidson, S Bradoo and R Gulati. 2009. Microbial Lipases: potential Biocatalysts for The Future Industry. Departement of Microbiology. University of delhi, India
- Shamsudin S, Salimon J. 2006. Physicochemical characteristics of aji-aji fish *seriola nigrofasciata* lipids. *Malaysia J Anal Sci* 10(1): 55-58.
- Sigma Aldrich co. 1994. Enzymatic assay of lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34). <http://www.sigmaldrich.com/life-science/enzymaticassayoflipoproteinenzimlipase.htm>. [4 April 2009].
- Wanasundara UN, Shahidi F. 1998. Lipase assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerol from Marine oil. *J Am. Oil Chem* 75: 945-951.