

EKSTRAKSI DAN FRAKSINASI FOSFOLIPID DARI LIMBAH PENGOLAHAN MINYAK SAWIT

[Extraction and Fractionation of Phospholipids from the Waste of Palm Oil Processing]

Teti Estiasih^{1)*}, Kgs. Ahmadi²⁾, Fithri Choirun Nisa¹⁾, dan Ahmad Dial Khuluq¹⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

²⁾Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Tribhuwana

Diterima 01 Februari 2010 / Disetujui 10 Desember 2010

ABSTRACT

This research aimed to extract and fractionate phospholipids from the most potential source of phospholipids of the waste of palm oil processing i.e. palm pressed fiber, sludge, and spent bleaching earth (adsorbent). The extraction process was performed by using chloroform-methanol, followed by polar lipid separation by solubilization in chloroform (to eliminate neutral lipid) and methanol (to extract phospholipids). Fractionation was performed based on the solubility in ethanol and acetone. There were 5 phospholipid fractions obtained, i.e. crude phospholipids (without fractionation), ethanol soluble, ethanol insoluble, ethanol soluble-acetone soluble, and ethanol soluble-acetone insoluble fractions. Each fraction was characterized for phospholipid composition and fatty acid profile. The result showed that palm pressed fiber had the highest content of phospholipids of 10,222.19 ppm. Extraction and separation of phospholipids from palm pressed fiber produced phospholipids with a purity of 61.67%. Phospholipids found in palm pressed fiber were phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidyletanolamin (PE), phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), and phosphatidic acid (PA), while the impurities consisted of fatty acids and neutral lipids. Oleic acid is the most dominant fatty acid in crude palm pressed fiber phospholipids. Fractionation increased the purity of phospholipids. Different phospholipids fractions showed different phospholipid composition and fatty acid profile. Ethanol soluble fraction had more PI, PC, PG, and PA, but less PE and DPG as compared to crude phospholipids. The ratio of PC to PE also increased after ethanol fractionation. The amount of more non polar phospholipids (PG, DPG, PA) were less in ethanol soluble-acetone insoluble fractions compared to ethanol soluble-acetone soluble fraction. The solubilization in ethanol increased total unsaturated fatty acids in ethanol soluble fractions, meanwhile the distribution of unsaturated and saturated fatty acid in ethanol soluble-acetone soluble and ethanol soluble-acetone insoluble was similar.

Key words: extraction, fractionation, sludge, palm pressed fiber, spent bleaching earth

PENDAHULUAN

Permintaan akan berbagai jenis fosfolipid saat ini terus mengalami peningkatan karena penggunaannya di industri terus meningkat. Fosfolipid digunakan untuk formula obat, produk pangan, pelumas, penstabil, liposom, campuran misel, kosmetik, serta sebagai pengemulsi dan bahan farmasi. Fosfolipid sintetik dapat digunakan untuk keperluan kesehatan dan nutrisi, namun dewasa ini minat konsumen beralih ke fosfolipid yang berasal dari bahan alami.

Indonesia mempunyai sumber fosfolipid potensial yang belum dimanfaatkan optimum, yaitu fosfolipid sebagai hasil samping pengolahan sawit. Produksi minyak sawit Indonesia tahun 2007 mencapai sekitar 17.664.000 ton (Anonim, 2008) menghasilkan jumlah limbah sawit yang cukup potensial dan belum dimanfaatkan dan diolah sebagai sumber fosfolipid. Industri kelapa sawit menghasilkan limbah seperti bungkil inti sawit, serat perasan buah sawit (*palm pressed fiber*), tandan buah kosong, dan solid (Utomo *et al.*, 1999). Dari 693.015,64 hektar kebun kelapa sawit di Indonesia, dihasilkan tandan buah segar sebesar 10,40 juta ton tiap tahun dan akan dihasilkan limbah pabrik pengolahan sawit berupa lumpur sawit 0,52 juta ton dan bungkil inti sawit sebesar 0,24 juta ton dan serat

buah sebesar 1,25 juta ton tiap tahun (Mirwandhono dan Siregar, 2004).

Sebagian besar fosfolipid masih berada dalam limbah serat sawit (*palm-pressed fiber*) dan lumpur sawit (*sludge*) (Goh *et al.*, 1982). Choo *et al.* (2004) melaporkan kadar fosfolipid dalam serat sawit yang diekstrak dengan etanol adalah sebesar 46.800 ppm sedangkan yang diekstrak dengan heksana adalah sebesar 1.367 ppm. Serat sawit mempunyai porsi 15% dari berat tandan buah sawit segar. Pada industri pengolahan minyak sawit kasar (CPO, *crude palm oil*), penghilangan fosfolipid dari minyak sawit kasar dilakukan dengan proses *degumming* yang dilakukan simultan dengan proses pemucatan (*bleaching*) menggunakan *spent bleaching earth* (SBE atau adsorben). Menurut Morad *et al.* (2006), SBE dari proses ini mengandung fosfolipid 800-1000 ppm.

Pengkajian fosfolipid dari hasil samping pengolahan sawit penting dilakukan. Aplikasi fosfolipid kasar yang diperoleh dari pemurnian minyak nabati di industri seringkali memerlukan proses purifikasi. Lesitin kasar dari minyak nabati mengandung lipid netral 30-40% terutama trigliserida. Sisanya terdiri dari lipid polar, terutama campuran fosfolipid. Untuk mempermudah penanganan lesitin kasar yang sangat kental dan untuk meningkatkan dispersibilitas dalam air, industri biasanya melakukan proses penghilangan minyak dengan menggunakan aseton.

Trigliserida larut dalam aseton, akan tetapi senyawa polar lesitin tidak larut. Ekstraksi aseton menyebabkan fosfolipid

* Korespondensi penulis :
E-mail : teties@yahoo.co.id

menjadi terkonsentrasi sehingga meningkatkan kadarnya dan mengurangi jumlah yang dibutuhkan untuk aplikasi (Vikbjerg et al., 2006).

Palacios dan Wang (2005), menyatakan bahwa fosfolipid kuning telur diekstrak dengan menggunakan etanol, dilanjutkan dengan ekstraksi aseton untuk menghilangkan lemak dari fraksi etanol. Pada penelitian ini dikaji metode ekstraksi dan fraksinasi fosfolipid dari limbah pengolahan sawit dengan beberapa jenis pelarut serta karakterisasi fraksi-fraksi fosfolipid yang dihasilkan. Proses fraksinasi dengan etanol dan aseton diduga dapat meningkatkan kemurnian fosfolipid dan menghasilkan fraksi-fraksi fosfolipid dengan komposisi dan profil asam lemak yang berbeda.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan baku yang digunakan adalah limbah pengolahan sawit berupa serat sawit dan lumpur sawit (*sludge*) dari PT Surya Dumai Grup, Riau, serta dan *spent bleaching earth* (SBE) dari PT Bimoli, Surabaya. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah standar campuran asam lemak, standar C17:0 (Sigma Co.), standar fosfolipid (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, asam fosfatidat (Sigma Co.), lisofosfatidilkolin, lisofosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol, difosfatidilgliserol

(Nacalai, Jepang)), BF₃-metanol 14% (Sigma Co.), metilengklorida, NaOH, metanol, asam sulfat, plat TLC (silika gel G60 F254 sebagai adsorben), kloroform (p.a. dari Merck), kloroform (Mallincord TJ Beaker), metanol (teknis), akuades, dan gas nitrogen.

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

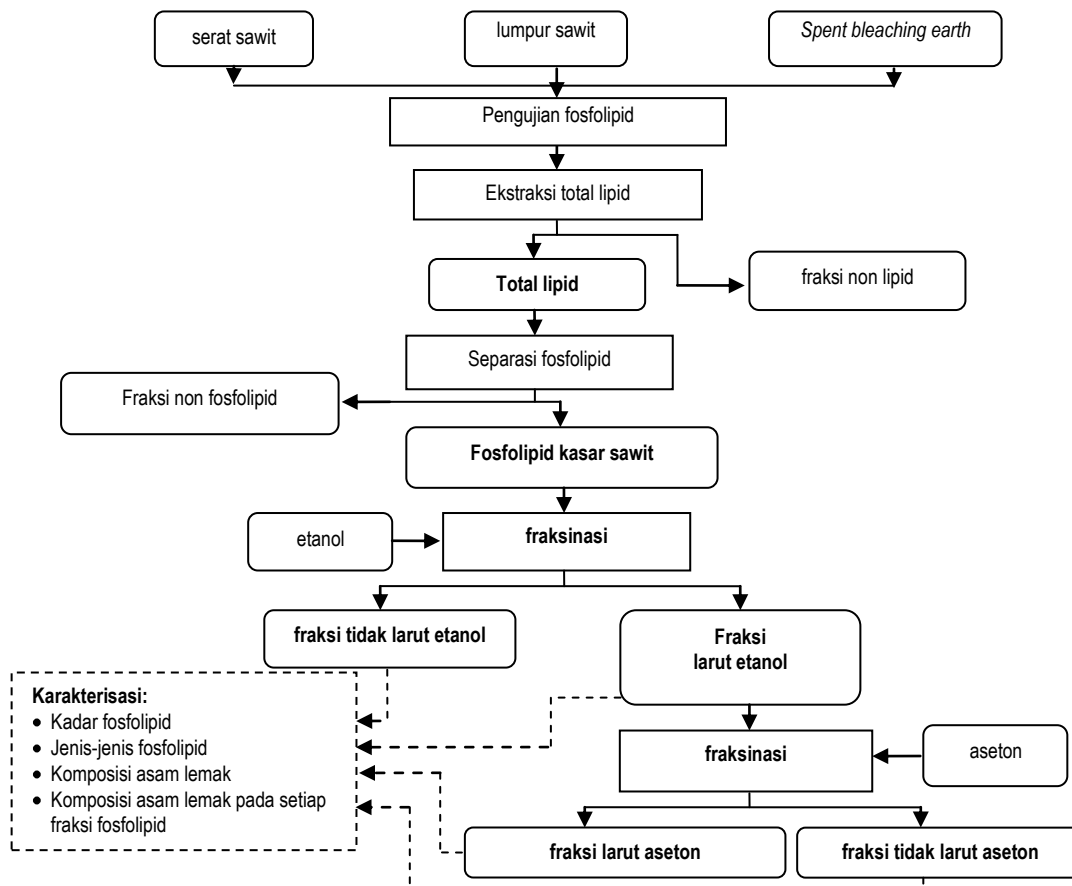
Penelitian secara garis besar meliputi ekstraksi total lipid, separasi fosfolipid dari total lipid, dan fraksinasi fosfolipid. Diagram alir penelitian secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 1.

Penentuan kadar air dan minyak limbah pengolahan sawit

Limbah pengolahan sawit berupa serat sawit, lumpur sawit, dan *spent bleaching earth* ditentukan kadar airnya secara gravimetri (AOAC, 1990) dan kadar minyak dengan menggunakan metode soxhlet (AOAC, 1990).

Ekstraksi total lipid (metode modifikasi Yunoki et al., 2008)

Sejumlah 100 g limbah pengolahan sawit diekstrak 2 kali dengan 100 ml kloroform:metanol (2:1 v/v) dan dilanjutkan dengan 100 ml kloroform:metanol (1:2 v/v) selama 1 jam pada suhu ruang kemudian disaring.



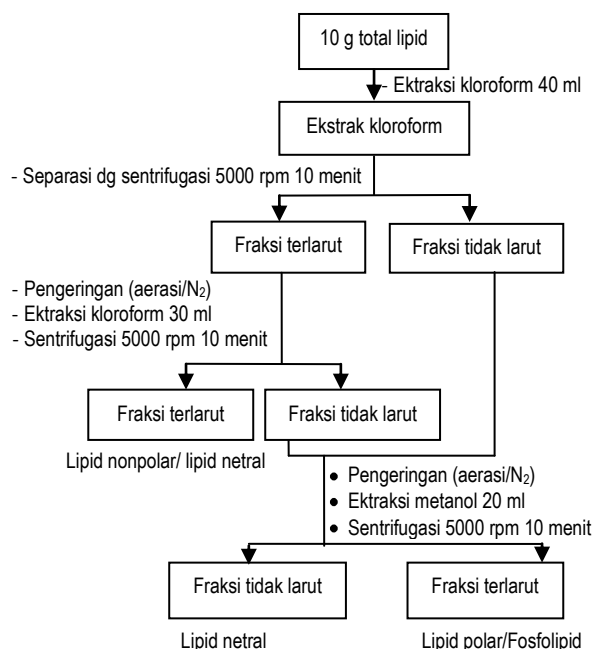
Gambar 1. Ekstraksi total lipid, separasi, dan fraksinasi fosfolipid

Semua ekstrak kemudian dicampur dan disentrifugasi. Setelah sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit, fase paling bawah dipekatkan dengan rotavapor. Total lipid yang diperoleh kemudian digunakan untuk separasi fosfolipid kasar.

Separasi fosfolipid kasar dari ekstrak total lipid dengan pelarutan

Total lipid yang diperoleh dari proses ekstraksi diekstrak dengan menggunakan kloroform (Gambar 2). Sebanyak 10 g total lipid diekstrak dengan 40 ml kloroform. Fraksi yang larut kloroform merupakan lipid non polar dan dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Fraksi yang tidak larut merupakan lipid polar dan dipisahkan. Fraksi yang larut kemudian dikeringkan dengan menggunakan nitrogen/aerasi dan diekstrak kembali dengan 30 ml kloroform. Setelah itu dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan fraksi larut dan tidak larut.

Fraksi tidak larut merupakan lipid polar dan dicampur dengan fraksi tidak larut dari hasil ekstraksi pertama. Selanjutnya fraksi tidak larut kloroform diekstrak dengan menggunakan 20 ml metanol untuk melarutkan fosfolipid/lipid polar. Fraksi larut dan tidak larut dipisahkan dengan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Fraksi yang larut kemudian dikeringkan untuk mengambil padatan yang merupakan fosfolipid.



Gambar 2. Separasi fosfolipid dari total lipid dengan pelarutan

Penentuan jenis limbah sawit sumber fosfolipid

Limbah pengolahan sawit berupa lumpur sawit (sludge), spent bleaching earth, dan serat sawit diekstrak total lipidnya dengan menggunakan metode Yunoki et al. (2008) yang dimodifikasi. Fosfolipid dipisahkan dari total lipid dengan pelarutan seperti tercantum pada Gambar 2. Fosfolipid selanjutnya dilarutkan dalam kloroform:metanol 95:5 pada konsentrasi 100 mg/ml. Sebanyak 10 µl larutan fosfolipid

dispotkan pada plat TLC dan digunakan larutan pengembang kloroform:metanol:air (110:25:3 v/v/v) selama 45 menit.

Hasil elusi disemprot dengan larutan H₂SO₄ 50% dan dipanaskan dalam oven suhu 140°C selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan kuantifikasi dengan TLC scanner dan identifikasi dengan membandingkan dengan fosfolipid standar.

Fraksinasi fosfolipid

Fosfolipid yang diperoleh dari proses separasi dari limbah pengolahan sawit dengan kadar fosfolipid tertinggi kemudian difraksinasi berdasarkan kelarutannya dalam berbagai pelarut. Pelarut yang digunakan terdiri dari etanol dan aseton. Fraksinasi pertama dilakukan dengan menggunakan etanol. Fraksi larut etanol difraksinasi lebih lanjut dengan menggunakan aseton.

Proses fraksinasi dilakukan sebagai berikut: 5 g fosfolipid kasar dilarutkan dalam 20 ml etanol kemudian diagitasi selama 60 menit. Supernatan dan endapan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 15000 g selama 10 menit. Residu diambil dan merupakan fraksi tidak larut etanol. Fraksi larut etanol diambil dengan cara menguapkan etanol dengan menyemprotkan gas nitrogen/udara.

Fraksi larut etanol diambil sebagian untuk dikarakterisasi dan sebagian lagi difraksinasi lebih lanjut dengan melarutkan dalam aseton (1:4 b/v) dan diagitasi selama 60 menit. Fraksi tidak larut aseton dipisahkan dari larutan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 15000 g.

Fraksi larut aseton diambil dengan cara menguapkan aseton dengan gas nitrogen/udara. Hasil fraksinasi diperoleh empat fraksi fosfolipid yaitu fraksi tidak larut etanol (ethanol insoluble), fraksi larut etanol (ethanol soluble), fraksi larut etanol dan aseton (acetone-ethanol soluble), fraksi larut etanol tidak larut aseton (acetone insoluble-ethanol soluble), dan fosfolipid tanpa fraksinasi atau fosfolipid sawit kasar. Fraksi-fraksi tersebut kemudian diidentifikasi jenis-jenis fosfolipid dan asam lemak penyusunnya.

Identifikasi dan kuantifikasi jenis fosfolipid pada setiap fraksi

Pemisahan jenis-jenis fosfolipid dengan TLC dilakukan seperti pada sampel limbah pengolahan sawit (lumpur sawit, spent bleaching earth, dan serat sawit) menggunakan metode Nzai dan Proctor (1998) yang dimodifikasi.

Identifikasi dilakukan dengan membandingkan dengan standar murni fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol, asam fosfatidat, dan asam lemak bebas. Kuantifikasi dilakukan dengan menggunakan TLC scanner.

Identifikasi jenis asam lemak pada fosfolipid kasar dan setiap fraksi fosfolipid

Identifikasi jenis asam lemak dari setiap fraksi fosfolipid dilakukan dengan kromatografi gas. Masing-masing fraksi fosfolipid dimetilasi dengan metode Park dan Goin (1994). Identifikasi dilakukan dengan membandingkan dengan waktu retensi standar campuran asam lemak yang diinjeksikan terpisah. Kuantifikasi dilakukan berdasarkan persentase relatif.

Identifikasi jenis asam lemak pada jenis-jenis fosfolipid pada fosfolipid kasar

Identifikasi jenis-jenis asam lemak dalam setiap jenis fosfolipid penyusun fosfolipid kasar dilakukan dengan memisahkan jenis-jenis fosfolipid (fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, fosfatidilinositol, dan lain-lain) penyusunnya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis metode Nzai dan Proctor (1998) yang dimodifikasi.

Spot masing-masing jenis fosfolipid yang sudah terpisah kemudian dikerok dari plat TLC dengan menggunakan metode Christie (1982) dan dimetilasi dengan metode Park dan Goin (1994) sebelum diinjeksikan pada kromatografi gas. Kuantifikasi didasarkan pada persentase relatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fosfolipid limbah pengolahan minyak sawit

Pada tahap awal dilakukan penentuan kadar minyak yang dapat diekstrak dari masing-masing limbah. Tabel 1 menunjukkan bahwa *spent bleaching earth* mengandung minyak terekstrak yang terbanyak. Jumlah minyak yang dapat diekstrak dari serat sawit adalah 4,74%. Choo *et al.* (2004) melaporkan bahwa jumlah minyak yang dapat diekstrak dari serat sawit dengan menggunakan pelarut etanol adalah 5,71%. Pada penelitian ini ekstraksi minyak dilakukan dengan menggunakan kloroform-metanol.

Etanol merupakan pelarut yang mempunyai indeks polaritas 5,2, sedangkan metanol 5,1, dan kloroform 4,1 (Anonim, tanpa tahun). Hal ini berakibat pada perbedaan jumlah minyak yang terekstrak. Diduga minyak dalam dalam serat sawit mengandung lipid polar juga sehingga ekstraksi dengan pelarut yang lebih polar menghasilkan ekstrak yang lebih banyak. Pada penelitian ini, penggunaan kombinasi kloroform dan metanol diharapkan dapat mengekstrak lipid polar dan non polar secara simultan.

Tabel 1. Kadar air dan minyak limbah sawit

Jenis Limbah	Kadar air (%)	Kadar Minyak (% berat basah)
Serat sawit	21,35	4,74
Lumpur sawit	95,85	2,46
<i>Spent bleaching earth</i>	1,45	18,67

Kadar fosfolipid tertinggi terdapat pada limbah serat sawit sehingga limbah tersebut digunakan sebagai bahan baku untuk ekstraksi fosfolipid (Tabel 2).

Limbah *spent bleaching earth* walaupun mengandung kadar lemak yang tertinggi tetapi kadar fosfolipid terendah karena pada limbah ini minyak yang teradsorpsi sudah mengalami proses pemucatan yang bertujuan menghilangkan fosfolipid. Menurut Choo *et al.*, (2004), minyak sawit kasar mempunyai kadar fosfolipid yang rendah (5-130 ppm) karena proses pengepresan menurunkan kadar fosfolipid.

Sejumlah besar fosfolipid terdapat dalam serat sawit sebagai limbah proses pengepresan. Jumlah serat sawit sebagai limbah pengolahan minyak sawit adalah 15% dari berat buah tandan segar sawit.

Tabel 2. Kadar fosfolipid limbah pengolahan sawit

Jenis Limbah Sawit	Kadar fosfolipid	
	Dalam Total Lipid (ppm)	Dalam Limbah (ppm)
Serat sawit	215.658,07	10.222,19
Lumpur sawit	81.367,64	2.148,09
<i>Spent bleaching earth</i>	495.458,89	9.250,22

Ekstraksi fosfolipid dari serat sawit dengan menggunakan pelarut heksana dan etanol 95% yang dilakukan oleh Choo *et al.* (2004) menghasilkan fosfolipid masing-masing sejumlah 1.367 dan 46.800 ppm. Hasil penelitian ini menunjukkan kadar fosfolipid dalam ekstrak total lipid sebesar 215.658,07 ppm, jauh lebih besar dibandingkan hasil penelitian Choo *et al.* (2004) tersebut.

Ekstraksi dengan heksana cenderung menghasilkan lipid yang bersifat non polar, sedangkan fosfolipid termasuk ke dalam lipid yang bersifat polar. Diduga kombinasi kloroform-metanol menghasilkan polaritas yang tepat untuk mengekstrak fosfolipid. Nilai indeks polaritas pelarut untuk kloroform dan metanol berada di antara etanol dan heksana. Penggunaan etanol mungkin bersifat terlalu polar sedangkan heksana terlalu non polar untuk mengekstrak fosfolipid dari serat sawit.

Jenis-jenis fosfolipid yang terdapat dalam serat sawit sebelum dilakukan proses separasi lipid netral dan lipid polar (fosfolipid) adalah fosfatidilinositol (PI, *phosphatidylinositol*), fosfatidilkolin (PC, *phosphatidylcholine*), fosfatidiletanolamin (PE, *phosphatidylethanolamine*), fosfatidilgliserol (PG, *phosphatidylglycerol*), dan asam fosfatidat (PA, *phosphatidic acid*). Komposisi fosfolipid dan konsentrasi masing-masing jenis fosfolipid dalam total lipid serat sawit dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi (%) dan kadar fosfolipid (ppm) dalam total lipis serat sawit sebelum separasi lipid netral dan lipid polar (fosfolipid)

Jenis Limbah Sawit	Komposisi (%)	Kadar (ppm)
Fosfatidilinositol (PI)	11,78	30.019,86
Fosfatidiletanolamin (PE)	14,83	37.084,99
Fosfatidilkolin (PC)	20,26	32.726,73
Fosfatidilgliserol (PG)	24,08	38.895,42
Difosfatidilgliserol (DPG)	29,05	46.911,21

Fosfolipid merupakan lipid polar karena mempunyai gugus fosfat yang teresterifikasi pada posisi *sn*-3 dari kerangka gliserol. Gugus fosfat tersebut berikatan dengan senyawa yang lain. PE mengandung gugus etanolamin (-CH₂CH₂NH₃⁺), PC mengandung gugus kolin (-CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃), PG mengandung gliserol (-CH₂CH(OH)CH₂(OH)), PI mengandung gugus inositol, PA mempunyai gugus fosfat yang tidak berikatan dengan senyawa lain (Vikjberg *et al.*, 2006), dan DPG atau kardioliipin merupakan dua molekul asam fosfatidat yang dihubungkan dengan satu molekul gliserol.

Molekul fosfolipid yang mempunyai gugus terikat fosfat yang bermuatan (PE dan PC) cenderung bersifat lebih polar dibandingkan yang terikat dengan gugus yang tidak bermuatan. PI mempunyai gugus inositol yang mempunyai banyak gugus OH sehingga bersifat cenderung polar. PG mempunyai gugus gliserol yang tidak bermuatan tetapi mempunyai dua gugus OH bebas dan kemungkinan dua rantai asam lemak pada posisi *sn*-

1 dan sn-2 mendominasi sehingga cenderung bersifat non polar. Adapun PA mempunyai gugus fosfat yang tidak berikatan dengan gugus lain dan dua rantai asam lemak pada posisi sn-1 dan sn-2 diduga mendominasi sehingga cenderung bersifat non polar. DPG mempunyai empat rantai asam lemak sehingga bersifat cenderung non polar.

Fosfolipid penyusun serat sawit hasil penelitian ini mengandung DPG yang cenderung bersifat non polar. Hal ini berbeda dengan hasil yang diperoleh Choo *et al.* (2004) bahwa jenis-jenis fosfolipid yang terdapat dalam ekstrak etanol dari serat sawit terdiri dari PC, PE, PG, dan PA. Choo *et al.* (2004) melaporkan adanya PA pada fosfolipid serat sawit. Perbedaan komposisi fosfolipid serat sawit ini dapat dipahami mengingat Choo *et al.* (2004) menggunakan etanol dalam ekstraksinya.

Fosfolipid kasar serat sawit

Menurut Singleton (1999), pemisahan komponen berdasarkan kelasnya dapat dilakukan dengan mudah menggunakan pelarut selektif dengan polaritas yang tepat. Ekstraksi total lipid dari serat sawit pertama kali dilakukan menggunakan kloroform-metanol sehingga lipid non polar dan polar terekstrak. Ekstraksi dengan kloroform dilakukan untuk menghilangkan lipid netral. Fraksi tidak larut kloroform yang diduga merupakan lipid polar selanjutnya diekstraksi lebih lanjut dengan metanol. Fraksi larut metanol ini yang dianggap sebagai lipid polar atau fosfolipid kasar serat sawit.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa separasi fosfolipid dengan metode pelarutan kloroform untuk menghilangkan lipid netral dan metanol untuk mengekstrak lipid polar berhasil mendapatkan ekstrak fosfolipid dengan kadar 61,67% atau 616.700 ppm (b/b). Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan hasil perolehan Choo *et al.* (2004) yang melakukan pemisahan lipid polar (fosfolipid) dan lipid netral menggunakan kromatografi kolom dengan adsorben Florisil yang menghasilkan fosfolipid 1.367 ppm dari ekstrak heksana dan 46.800 ppm dari ekstrak etanol.

Sebelumnya Palacios dan Wang (2005) melakukan ekstraksi fosfolipid dari kuning telur ayam dengan menggunakan etanol untuk lesitin yang tidak dihilangkan minyaknya (*undeoiled lecithin*) dan aseton untuk ekstraksi lesitin yang dihilangkan minyaknya (*deoiled lecithin*). Kemurnian lesitin yang diperoleh pada fraksi kaya fosfatidilkolin adalah 34,9% dan 36,4% masing-masing untuk kuning telur yang dipanaskan dan tanpa pemanasan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa separasi fosfolipid dengan pelarutan dalam kloroform untuk menghilangkan lipid netral dan metanol untuk mengekstrak lipid polar (fosfolipid) dapat menghasilkan fosfolipid dengan kemurnian lebih tinggi.

Profil jenis-jenis fosfolipid penyusun fosfolipid kasar serat sawit dapat dilihat pada Tabel 4. Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa terdeteksi 6 jenis fosfolipid dalam fosfolipid kasar sawit. Asam lemak bebas merupakan komponen yang tidak diinginkan (*impurities*) yang kadarnya cukup tinggi. Asam lemak bebas diduga larut dalam metanol dan tidak hilang pada proses pencucian menggunakan kloroform.

Komposisi fosfolipid kasar serat sawit yang diperoleh pada penelitian ini mempunyai sedikit perbedaan dibandingkan hasil penelitian Choo *et al.* (2004). Choo *et al.* (2004) mendeteksi

adanya PC 763 ppm, PE 456 ppm, PG 147 ppm dalam ekstrak heksana dan tidak mendeteksi adanya PA, sedangkan di dalam ekstrak etanol terdapat PC 20.886 ppm, PE 12.486 ppm, PI 6.077 ppm, dan komponen lain 7.355 ppm (Tabel 4).

Tabel 4. Komposisi fosfolipid penyusun fosfolipid kasar serat sawit

Jenis Fosfolipid	Kadar (ppm)	Ekstrak Etanol* (ppm)	Ekstrak heksana* (ppm)
Fosfatidilinositol (PI)	30,360	6,007	
Fosfatidilkolin (PC)	60,650	20,886	763
Fosfatidiletanolamin (PE)	98,200	12,486	456
Fosfatidilgliserol (PG)	212,400		147
Asam Fosfatidat (PA)	192,400		
Difosfatidilgliserol (DPG)	140,900		
Asam Lemak Bebas (ALB)	181,700		
Lipid Netral (LN)	73,400		
Lain-lain		7,355	

*Choo *et al.* (2004)

Pada penelitian ini, DPG mendominasi dan terdapat PG dan PA. Campuran kloroform-metanol bersifat lebih non polar dibandingkan etanol sehingga DPG, PG, dan PA terdeteksi. Polaritas fosfolipid bersifat kompleks tidak hanya dilihat dari jenis-jenis molekul yang terikat pada gugus fosfat pada sn-3 kerangka gliserol, tetapi juga dari jenis-jenis asam lemak pada posisi sn-1 dan sn-2. Asam lemak yang lebih pendek dan lebih tidak jenuh cenderung bersifat lebih polar dibandingkan asam lemak dengan rantai lebih panjang dan lebih jenuh. Semakin pendek rantai asam lemak, gugus karboksilat (-COOH) semakin mendominasi sehingga cenderung lebih polar. Setiap ikatan rangkap mempunyai akumulasi elektron yang dapat menghasilkan momen dipol (δ) negatif sehingga cenderung bersifat polar (McClements, 1999). Komposisi asam lemak fosfolipid kasar serat sawit dapat dilihat pada Tabel 5. Asam lemak yang mendominasi dalam fosfolipid kasar serat sawit adalah asam palmitat dan oleat. Kadar asam oleat lebih tinggi dari palmitat.

Komposisi asam lemak dalam minyak sawit menurut Choo *et al.* (2004) adalah asam miristat (1,0-1,5%), asam palmitat (41,0-45,0%), asam stearat (3,7-5,1%), asam oleat (38,6-40,2%), dan asam linoleat (10,2-11,9%). Pada minyak sawit, asam palmitat lebih tinggi kadarnya dibandingkan asam oleat. Pada penelitian ini, kadar asam oleat pada fosfolipid kasar serat sawit lebih tinggi dibandingkan asam palmitat. Pada fosfolipid, asam lemak menempati posisi sn-1 dan sn-2 karena sn-3 ditempati oleh gugus fosfat. Pada trigliserida, asam lemak bisa menempati sn-1, sn-2, dan sn-3. Posisi sn-2 pada trigliserida sawit ditempati oleh asam tidak jenuh oleat atau linoleat. Mengingat sn-3 diganti oleh gugus fosfat yang biasanya ditempati asam lemak jenuh, maka kadar asam lemak tidak jenuh dalam fosfolipid sawit lebih tinggi dibandingkan trigliserida.

Ada perbedaan komposisi asam lemak fosfolipid serat sawit dari hasil penelitian ini dibandingkan dengan hasil penelitian Choo *et al.* (2004). Semakin polar pelarut yang digunakan, fosfolipid yang mengandung asam lemak yang lebih tidak jenuh

lebih mudah terekstrak dibandingkan fosfolipid yang mengandung asam lemak jenuh karena asam lemak menjadi cenderung bersifat polar. Hasil penelitian ini (Tabel 5) menunjukkan bahwa asam oleat merupakan asam lemak dominan (51,63%), dan palmitat merupakan asam lemak dengan jumlah kedua terbesar. Asam lemak lainnya ada dalam jumlah kecil, akan tetapi asam linoleat tidak terdeteksi. Jika dibandingkan dengan fosfolipid kedelai, fosfolipid serat sawit mengandung asam lemak yang lebih jenuh dibandingkan fosfolipid kedelai. Fosfolipid kedelai mengandung asam palmitat 27,3%, asam stearat 1,6%, asam oleat 14,7%, asam linoleat 52,5%, asam asam linolenat 3,8%, dan asam lemak lain 0,1% (Das dan Bhattacharyya, 2006). Komposisi asam lemak yang lebih jenuh diduga akan berkaitan dengan stabilitas antioksidan yang lebih tinggi (Choo *et al.*, 2004).

Tabel 5. Komposisi asam lemak penyusun fosfolipid kasar serat sawit

Jenis Asam Lemak	Kadar (%)	Ekstrak etanol* (%)	Ekstrak heksana* (%)
Asam kaprilat (C8:0)	tidak terdeteksi		
Asam kaprat (C10:0)	1,45		
Asam laurat (C12:0)	3,34		
Asam miristat (C14:0)	3,08		
Asam palmitat (C16:0)	34,82	33,71	34,58
Asam palmitooleat (C16:1)	0,34		
Asam stearat (C18:0)	3,93	2,41	1,03
Asam oleat (C18:1)	51,63	32,91	33,75
Asam linoleat	tidak terdeteksi	30,76	30,05
Asam arakhidat (C20:0)	1,30	0,21	0,59

*Choo *et al.* (2004)

Komposisi asam lemak pada jenis-jenis fosfolipid dalam fosfolipid kasar serat sawit yang diekstrak pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 6. Untuk setiap fraksi fosfolipid asam lemak dominan adalah asam palmitat (C16:0) dan oleat (C18:1). Asam lemak rantai sedang C8:0 dan C10:0 tidak terdeteksi untuk semua jenis fosfolipid karena pada fosfolipid kasar juga tidak terdeteksi (Tabel 6).

Asam lemak yang mendominasi untuk PI, PE, PC adalah asam oleat, sedangkan untuk PG, PA, dan DPG adalah asam palmitat. Perbedaan komposisi asam lemak pada masing-masing jenis fosfolipid dalam fosfolipid kasar serat sawit diduga akan berpengaruh terhadap sifat fungsional fosfolipid seperti kemampuan emulsifikasi.

Tabel 6. Komposisi asam lemak (%) penyusun jenis-jenis fosfolipid pada fosfolipid kasar serat sawit

Jenis Asam Lemak	PI (%)	PC (%)	PE (%)	PG (%)	PA (%)	DPG (%)	ALB (%)
Asam kaprilat (C8:0)	td	td	td	td	td	td	td
Asam kaprat (C10:0)	td	td	td	td	td	td	td
Asam laurat (C12:0)	td	2,81	0,91	5,77	3,65	1,77	6,92
Asam miristat (C14:0)	td	32,00	4,08	12,88	3,77	3,19	5,06
Asam palmitat (C16:0)	28,32	22,57	31,22	32,02	30,25	23,55	25,61
Asam palmitooleat (C16:1)	18,58	8,25	1,49	td	1,96	2,25	td
Asam stearat (C18:0)	15,93	12,65	15,75	23,23	15,39	14,40	17,50
Asam oleat (C18:1)	28,32	1,11	46,09	26,10	26,67	53,21	41,18
Asam linoleat (C18:2)	8,85	4,12	0,45	td	13,87	0,13	td
Asam arakhidat (C20:0)	td	0,29	td	td	1,33	1,50	Td
Asam behenat (C22:0)	td	2,12	td	td	3,12	td	td
Asam lignoserat (C24:0)	td	14,09	td	td	td	td	td

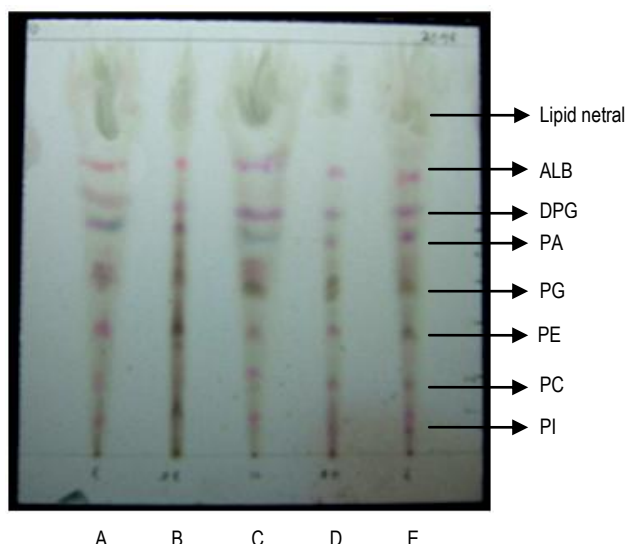
Keterangan: td = tidak terdeteksi, PI = fosfatidilinositol, PC = fosfatidilkolin, PE = fosfatidiletanolamin, PG = fosfatidilgliserol, DPG = difosfatidilgliserol, PA = asam fosfatidat, ALB = asam lemak bebas.

Fraksi-fraksi fosfolipid serat sawit

Fraksinasi ditujukan untuk mendapatkan fraksi-fraksi fosfolipid dengan sifat fungsional sesuai dengan yang diinginkan. Nieuwenhuysen dan Tomas (2008), menyatakan bahwa lesitin mempunyai kelarutan yang berbeda sehingga penggunaan pelarut alkohol saja sebagai pelarut pemisah maupun kombinasi dengan kromatografi umumnya dapat digunakan dalam separasi. PC mudah dan cepat larut dalam alkohol sehingga campuran fosfolipid dalam lesitin kasar kedelai biasa difraksinasi menjadi fraksi larut alkohol dan fraksi tidak larut alkohol. Fraksi larut etanol mempunyai rasio PC/PE yang tinggi, sedangkan fraksi yang tidak larut mempunyai rasio yang rendah. Palacios dan Wang (2005) menyebutkan bahwa berbagai metode telah digunakan untuk fraksinasi fosfolipid, yaitu ekstraksi etanol, kristalisasi pelarut suhu rendah untuk menghilangkan lipid netral, dan ultrafiltrasi. Boyd *et al.* (1999) menyatakan bahwa lesitin kedelai komersial diberi perlakuan fraksinasi alkohol dengan tujuan untuk mengubah rasio PC terhadap PE dan sifat fungsionalnya. Fraksi-fraksi fosfolipid pada penelitian ini diperoleh dari hasil fraksinasi dengan menggunakan etanol dilanjutkan dengan aseton. Menurut Palacios dan Wang (2005) aseton biasa digunakan untuk menghilangkan minyak dari kuning telur.

Proses fraksinasi pertama kali dilakukan berdasarkan kelarutan dalam etanol sehingga diperoleh fraksi larut etanol dan fraksi tidak larut etanol. Menurut Selanjutnya, fraksi larut etanol difraksinasi lagi berdasarkan kelarutan dalam aseton, sehingga diperoleh fraksi larut etanol larut aseton, dan fraksi larut etanol tidak larut aseton. Eshraty (2008), aseton biasa digunakan untuk memurnikan lesitin karena fraksi non polar seperti asam lemak bebas dan trigliserida larut dalam aseton. Fraksi larut etanol diharapkan menghasilkan fraksi dengan rasio PC/PE yang tinggi yang sesuai untuk emulsi minyak dalam air, sedangkan fraksi tidak larut etanol menghasilkan rasio PC/PE yang rendah yang sesuai untuk emulsi air dalam minyak (Colbert, 1998).

Pemisahan jenis-jenis fosfolipid dengan kromatografi lapis tipis untuk fraksi-fraksi fosfolipid yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 3. Fosfolipid kasar serat sawit mempunyai kemurnian 61,67% yang diketahui dari analisis kuantitatif menggunakan *TLC scanner*.



Gambar 3. Separasi jenis-jenis fosfolipid pada fraksi fosfolipid kasar serat sawit menggunakan kromatografi lapis tipis. Keterangan :A. Fraksi larut etanol, B. Fraksi tidak larut etanol, C. Fraksi larut aseton-etanol, D. Fraksi tidak larut aseton-larut etanol, E. Fraksi fosfolipid kasar

Kemurnian tersebut menunjukkan bahwa fraksi non fosfolipid yang terdapat dalam fosfolipid kasar serat sawit adalah 38,23% yang terdiri dari trigliserida atau lipid netral dan asam lemak bebas. Penelitian Hruschka *et al.* (2003) dengan fraksinasi menggunakan etanol konsentrasi rendah untuk memisahkan minyak dan lipid polar menghasilkan fraksi

fosfolipid dengan kemurnian 47%. Menurut Palacios dan Wang (2005), tingkat kemurnian fosfolipid hasil separasi total lipid dengan pelarut etanol dan aseton adalah 21,6%. Hasil penelitian ini menunjukkan kemurnian fosfolipid yang lebih tinggi.

Jenis-jenis fosfolipid penyusun masing-masing fosfolipid kasar dan masing-masing fraksi fosfolipid serat sawit dapat dilihat pada Tabel 7. Dibandingkan fosfolipid kasar serat sawit, fraksi larut etanol mengalami peningkatan kadar PI, PC, PG, dan PA, dan mengalami penurunan PE dan DPG. Proses fraksinasi dengan etanol menghasilkan peningkatan rasio PC terhadap PE dari 1,42 pada fosfolipid kasar serat sawit menjadi 5,75 pada fraksi larut etanol.

Menurut Wu dan Wang (2004), ekstraksi dengan etanol menghasilkan fraksi kaya PC. Akan tetapi pada penelitian ini, pengayaan PC tidak terlalu tinggi (1,56 kali) karena proporsi PA meningkat tajam. Fosfolipid dari sumber lain seperti whey, kuning telur, dan kedelai hampir tidak mengandung PA sehingga fraksinasi dengan etanol menghasilkan fraksi kaya PC dengan tingkat pengayaan yang tinggi (Wu dan Wang, 2004).

Fraksinasi dengan alkohol biasa digunakan paling akhir untuk meningkatkan kemurnian fosfolipid. Fraksinasi alkohol menghasilkan fraksi tidak larut alkohol dengan kadar PE yang meningkat. Akan tetapi, rasio PC terhadap PE tidak mengalami peningkatan pada fraksi larut alkohol (Hayes, 2004). Dari penelitian ini dapat dilihat bahwa fraksi tidak larut etanol mengalami peningkatan kadar PE yaitu dari 8,60% pada fosfolipid kasar menjadi 12,13% (Tabel 7).

Tabel 7. Komponen penyusun (%) dan kemurnian (%) fosfolipid kasar dan fraksi fosfolipid serat sawit

Jenis Fosfolipid	Komponen Penyusun (%)				
	Fosfolipid Kasar	Fraksi Larut Etanol	Fraksi Tidak Larut Etanol	Fraksi Larut etanol	
				Larut Aseton	Tidak Larut Aseton
Asam Lemak Bebas (ALB)	21,79	11,28	7,75	23,30	12,11
Difosfatidilgliserol (DPG)	18,88	7,99	7,38	20,47	18,18
Asam fosfatidat (PA)	8,60	20,36	7,44	10,42	8,93
Fosfatidilgliserol (PG)	21,19	24,79	14,67	20,40	21,27
Fosfatidiletanolamin (PE)	8,60	3,31	12,13	7,65	11,03
Fosfatidilkolin (PC)	12,17	19,03	23,65	11,58	16,31
Fosfatidilinositol (PI)	8,76	13,23	33,78	6,19	12,17
Kemurnian (%)	61,67	65,78	71,44	67,06	68,49

Tabel 8. Profil asam lemak (%) fosfolipid kasar dan fraksi fosfolipid serat sawit

Jenis Asam Lemak	Profil Asam Lemak (%)				
	Fosfolipid Kasar	Fraksi Larut Etanol	Fraksi Tidak Larut Etanol	Fraksi Larut Etanol	
				Larut Aseton	Tidak Larut Aseton
Kaproat (C6:0)	0,10	0,97	td	7,38	td
Kaprilat (C8:0)	1,45	0,30	td	33,61	td
Kaprat (C10:0)	3,34	1,24	td	0,15	td
Miristat (C14:0)	3,08	7,60	16,30	7,09	td
Palmitat (C16:0)	34,82	21,64	37,23	2,26	16,11
Palmitoleat (C16:1)	0,34	7,63	12,72	4,24	3,74
Stearat (C18:0)	3,93	11,48	14,68	9,40	19,94
Oleat (C18:1)	51,63	48,90	19,08	34,72	38,46
Arakhidat (C20:0)	1,30	0,23	td	1,15	21,75
Total asam lemak jenuh	48,03	43,47	68,20	61,04	57,80
Total asam lemak tidak jenuh	51,97	56,53	31,80	38,96	42,20

Tabel 7 terlihat bahwa fraksi tidak larut etanol mengandung PE dan PI yang meningkat dibandingkan fosfolipid kasar. Akan tetapi, kadar PC juga mengalami peningkatan karena kadar PA, PG, DPG, dan ALB menurun. Dilihat dari polaritas, PA, PG, DPG, dan ALB lebih non polar dibandingkan PC karena PA tidak mempunyai gugus yang terikat pada gugus fosfat pada *sn*-3, PG mempunyai gugus gliserol yang terikat gugus fosfat pada *sn*-3, DPG mempunyai empat rantai asam lemak dalam strukturnya, dan ALB tidak mempunyai gugus fosfat yang bersifat polar. Akibatnya, PG, DPG, dan ALB cenderung larut dalam etanol.

Fraksinasi dengan etanol merupakan metode yang biasa dilakukan untuk mendapatkan lesitin dengan kemurnian PC 80-100%, dengan endapan kaya dengan PE dan PI (Hayes, 2004). Fraksi larut etanol mempunyai kemurnian yang lebih rendah dibandingkan fraksi tidak larut etanol. Hal ini disebabkan asam lemak bebas sebagai pengotor lebih larut dalam etanol.

Fraksinasi dengan aseton biasa dilakukan untuk menghilangkan komponen non polar dari fosfolipid (Eshraty, 2008). Menurut Colbert (1998), ketidaklarutan dalam aseton merupakan parameter yang menunjukkan kemurnian lesitin. Dari Tabel 7 terlihat bahwa fosfolipid yang lebih non polar (DPG dan PA) mengalami penurunan jumlah pada fraksi tidak larut aseton dibandingkan fraksi larut aseton, demikian pula untuk ALB yang merupakan pengotor pada fosfolipid.

Dari Tabel 8 terlihat bahwa fraksi fosfolipid yang berbeda mempunyai komposisi asam lemak yang berbeda pula. Faktor yang mempengaruhi selain kelarutan jenis-jenis fosfolipid dalam pelarut, juga kelarutan jenis asam lemak penyusun fosfolipid. Asam lemak yang mempunyai ikatan rangkap cenderung lebih polar dibandingkan asam lemak jenuh sehingga lebih mudah larut dalam etanol.

Fraksi larut etanol mempunyai kadar asam lemak tidak jenuh (oleat dan palmitooleat) yang lebih tinggi dibandingkan fraksi tidak larut etanol. Aseton merupakan pelarut yang bersifat semipolar sehingga pelarutan dengan aseton menghasilkan kadar asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh yang hampir sama antara fraksi larut aseton dan fraksi tidak larut aseton.

KESIMPULAN

Kadar fosfolipid tertinggi terdapat pada limbah serat sawit yaitu sejumlah 10.222,19 ppm. Ekstraksi dan separasi fosfolipid dari serat sawit menghasilkan fosfolipid dengan kemurnian 61,67%. Tahapan ekstraksi dan separasi yang dilakukan meliputi penghilangan lipid non polar dengan kloroform dilanjutkan dengan ekstraksi fosfolipid dengan metanol. Jenis-jenis fosfolipid kasar serat sawit didominasi oleh fosfolipid yang cenderung bersifat non polar (PA, PG, DPG). Fraksinasi dengan etanol dilanjutkan dengan aseton menghasilkan fraksi-fraksi fosfolipid dengan kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan fosfolipid kasar.

Fraksi larut etanol menghasilkan komposisi fosfolipid yang didominasi oleh fosfolipid yang bersifat non polar dengan asam lemak yang lebih tidak jenuh. Fraksinasi lebih lanjut dengan aseton menghasilkan fraksi larut aseton yang mempunyai

komposisi fosfolipid yang didominasi fosfolipid yang cenderung non polar serta fraksi tidak larut aseton yang cenderung bersifat polar dengan distribusi asam lemak yang hampir sama.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Kementerian Negara Riset dan Teknologi atas dana penelitian Insentif Riset Dasar No. Kontrak 499/J10.2/PL/2009 tertanggal 30 Januari 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2008. Produksi Sawit Indonesia Lampau Malaysia. <http://kompas.coead/xml/2008/02/12/22240973/produksi.sawit.indonesia.lampau.malaysia>. Tanggal akses 19 agustus 2008 Jam 14.26.
- Anonim. Tanpa tahun. Solvent miscibility table. <http://www.erowid.org/archive/rhodium/pdf/solvent.miscibility.pdf>. Tanggal akses 27 Februari 2011, pukul 16.28 WIB.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Vol 2. Virginia, USA.
- Boyd LC, Drye NC, Hansen AP. 1999. Isolation and characterization of whey phospholipids. *J. Dairy Sci.* 82: 2550-2557.
- Christie WW. 1982. Lipid Analysis. 2nd ed Pergamon Press, USA.
- Choo YM, Bong SC, Ma AN, Chuah CH. 2004. Phospholipids from palm-pressed fiber. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 81(5): 471-475.
- Colbert LB. 1998. Lecithins tailored to your emulsification needs. *INFORM* 43(9): 686-688.
- Das S, Bhattacharyya DK. 2006. Preparation and surface-active properties of hydroxy and epoxy fatty acid-containing soy phospholipids. *J. Amer. Oil Chem Soc.* 83(12): 1015-1020.
- Eshraty P. 2008. Effect of different parameters on removal and quality of soybean lecithin. *Research Journal of Biological Sciences* 3(8): 874-879.
- Goh SH, Khor HT, Gee PT. 1982. Phospholipids in palm oil (*Elaeis guineensis*). *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 59:296-299.
- Hayes DG. 2004. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *J. of Amer. Oil Chem. Soc.* 81: 1077-1103
- Hruschka SM, Kirchner S, Rassenhovel J, Witt W. 2003. Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid Containing Native Raw Material. U.S. Paten 20,030,054,084.
- Mirwandhono E, Siregar Z. 2004. Pemanfaatan Hidrolisat Tepung Kepala Udang dan Limbah Kelapa Sawit yang Difermentasi dengan *Aspergillus niger*, *Rizhopus oligosporus* dan *Thricoderma viridae* dalam Ransum Ayam Pedaging. USU digital Library. Sumatera Utara.

- Morad NA, Aziz MKA, Rohani. 2006. Process design in degumming and bleaching of palm oil. Centre of Lipid Engineering and Applied Research. Universiti Teknologi Malaysia.
- McClements DJ. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice and Technique. CRC Press, USA
- Nieuwenhuyzen W, Tomás MC. 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110: 472-486.
- Nzai JM, Proctor A. 1998. Phospholipids determination in vegetable oil by thin layer chromatography and imaging densitometry. Food Chem. 63: 571-576.
- Palacios LE, Wang T. 2005. Extraction of egg-yolk lecithin. J. Amer. Oil Chem. Soc. 82(8): 565-569.
- Park PW and Goins RW. 1994. In situ preparation of fatty acids methyl ester for analysis of fatty acids composition in foods. J. Food Sci. 59: 1262-1266.
- Singleton JA, Ruan M, Sanford JH, Haney CA, Stikeleather LF. 1999. Separation and characterization of peanut phospholipids molecular species using high performance liquid chromatography and fast bombardment mass spectrometry. J. Amer. Oil Chem. Soc. 76: 49-56.
- Singleton JA, Stikeleather LF. 1999. A solvent extractor system for the rapid extraction of lipids and trace bioactive micronutrients in oilseeds. J. Amer. Oil Chem. Soc 76: 1461-1466.
- Utomo BN, Wijaya E. 2004. Limbah Padat Pengolahan Minyak Sawit sebagai Sumber Nutrisi Ternak Ruminansia. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Palangkaraya. Palangkaraya.
- Vikbjerg AF, Rusig JY, Jonsson G, Mu H, Xu X. 2006. Comparative evaluation of the emulsifying properties of phosphatidylcholine after enzymatic acyl modification. J. Agric. Food Chem. 54: 3310-3316
- Vikbjerg AF. 2006. Enzyme Catalyzed Production of Phospholipids with Modified Fatty Acid Profile. PhD Thesis. BioCentrum-DTU Technical University of Denmark.
- Wu Y, Wang T. 2004. Fractionation of crude soybean lecithin with aqueous ethanol. J. Amer. Oil Chem. Soc. 81: 697-704.
- Yunoki K, Kukino O, Nadachi Y, Fujino T, Ohnishi M. 2008. Separation and determination of functional complex lipids from chicken skin. J. Amer. Oil Chem. Soc. 85: 427-433.