KRISTALISASI UREA PADA PEMBUATAN KONSENTRAT ASAM LEMAK ω-3: KAJIAN PUSTAKA

The Use of urea Crystallization Method for The Preparation of ω-3 Fatty Acids Concentrate from fish oils: A Review

Teti Estiasih

Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian– Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Some species of fish are known to be potential source of ω-3 fatty acid, one of the essential fatty acids from human body. However, in many cases, the concentration of such fatty acids in the fish oil is quite low, and therefore, a method is needed to make it into a concentrate. One of the methods widely use is urea crystallization technique. Principally, this method is based on the inability of urea to form a complex with ω-3 fatty acid, while other fractions are precipitated. This method is claimed to be able to increase ω-3 fatty acids content up to 80%. Factors that influence the technique are temperature, crystallization time, and urea to oil ratio. An optimation of processing parameters for particular type of fish oil must be defined to obtain a high ω-3 fatty acid concentrate.

Keywords: ω-3 fatty acid, concentrate, urea crystallization

PENDAHULUAN

Peran Asam Lemak ω-3 terhadap Kesehatan

Asam lemak ω-3 terutama asam eikosapentaenoat (EPA=*Eicosapentaenoic Acid*) dan asam dokosaheksaenoat (DHA=*Docosahexaenoic Acid*) merupakan asam lemak yang menguntungkan bagi kesehatan. Efek positif asam lemak ω-3 adalah perannya dalam perkembangan otak janin dan bayi, kesehatan kardiovaskular, fungsi kekebalan, pencegahan peradangan, penglihatan, kesehatan mental, dan beberapa kondisi kronis lainnya (Huang *et al.*, 2004; Nettleton, 2005).

Asam lemak ω-3 juga dapat menurunkan gejala depresi (Tiemeier *et al.*, 2003). Konsumsi asam lemak ω-3 dalam jumlah tinggi dapat memperbaiki toleransi terhadap glukosa pada penderita diabetes (Mori *et al.*, 1999). Asam lemak ω-3 dapat memperbaiki harapan hidup penderita penyakit autoimun seperti lupus dan atritis (Jolly *et al.*, 2001).

DHA merupakan asam lemak yang paling banyak terdapat dalam jaringan otak dan retina yang tidak dapat diganti oleh asam lemak yang lain Perkembangan otak manusia membutuhkan jumlah DHA yang berlimpah (Spector, 1999; Crawford *et al.*, 1999; Rotstein *et al.*, 1999) untuk perkembangan yang optimum (Nettleton, 1995). Pada masa balita DHA bersifat esensial untuk perkembangan otak dan retina (Uauy dan Hoffman, 2000).

Berbeda dengan asam lemak ω-6 yang memicu insiden kanker prostat (Leitzmann *et al.,* 2004), asam lemak ω-3 menghambat perkembangan kanker prostat, payudara, dan kanker terkait hormon lainnya (Terry *et al.,* 2003). Konsumsi asam lemak ω-3 dapat memperlambat pertumbuhan kanker, meningkatkan keberhasilan kemoterapi, dan menurunkan efek samping kemoterapi. (Hardman, 2002; Hardman, 2004).

Tujuan Konsentrasi Asam Lemak ω-3

Konsentrat asam lemak ω-3 telah lama dikembangkan dengan tujuan meningkatkan kadar asam lemak tersebut dalam minyak

asal (Haagsma *et al.,* 1982). Kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat ditingkatkan kadarnya dengan tujuan mendapatkan asupan asam lemak ω-3 yang tinggi dengan tetap menjaga asupan lemak tetap rendah (Garcia, 1998). Tujuan lain pembuatan konsentrat asam lemak ω-3 adalah menghilangkan komponen-komponen selain asam lemak ω-3 yang tidak dikehendaki seperti kolesterol dan asam lemak jenuh (Sridhar *and* Lakhsimanarayana, 1992).

Kekurangan konsentrat asam lemak ω-3 adalah karena mempunyai ketidakjenuhan yang sangat tinggi, konsentrat tersebut mudah mengalami oksidasi. Kerentanan terhadap oksidasi menyebabkan keterbatasan penggunaan konsentrat asam lemak ω-3 terutama untuk produk pangan (Beceker dan Kyle, 1998). Produk oksidasi lemak berperan terhadap perubahan bau dan aroma produk yang umumnya tidak disukai konsumen dan termasuk ke dalam bau yang menyimpang (*off-flavor*) (Garcia, 1998). Selain menyebabkan bau yang tidak dikehendaki, proses oksidasi menyebabkan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas terutama spesies oksigen reaktif berperan dalam beberapa penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, dan lain-lain (Choe *and* Min, 2005).

Konsentrat asam lemak ω-3 perlu distabilisasi untuk meminimalkan proses oksidasi. Jika konsentrat tersebut ditujukan untuk keperluan farmasi atau suplemen makanan (*food supplement*) stabilisasi dapat dilakukan dengan memproteksi konsentrat tersebut dalam bentuk kapsul lunak (*soft gel*). Cara lain untuk melindungi asam lemak ω-3 dalam konsentrat dari proses oksidasi adalah menambahkan antioksidan atau dibuat mikrokapsul (Baik *et al.*, 2004).

Teknik-teknik Konsentrasi

Teknik konsentrasi asam lemak ω-3 telah lama dikembangkan. Teknik pertama yang dipublikasikan dalam jurnal ilmiah oleh Haagsma *et al.* (1982) adalah teknik pembentukan kompleks dengan urea atau teknik inklusi urea (*urea inclusion compound*) atau kristalisasi urea, dengan minyak yang digunakan adalah minyak hati ikan kod.

Pada prinsipnya teknik konsentrasi asam lemak ω-3 didasarkan perbedaan antara asam lemak ω-3 dengan asam lemak lain dalam

a. Titik beku. Contohnya adalah pemadatan cepat (Moffat *et al.*, 1993) dan kristalisasi pelarut (Ahmadi, 2006).
b. Kemampuan membentuk kompleks dengan urea (Haagsma *et al.*, 1982; Ackman *et al.*, 1988; Ganga *et al.*, 1998; Wanasundara *and* Shahidi, 1999; Hwang dan Liang, 2001). Contoh aplikasi teknik ini adalah kristalisasi urea.
c. Kelarutan pada suhu rendah. Contoh teknik ini adalah pemadatan cepat (Moffat *et al.,* 1993).
d. Kemampuan dalam pembentukan kristal pada suhu rendah. Contohnya kristalisasi pelarut (Ahmadi, 2006).
e. Kelarutan dalam pelarut organik. Teknik ini didasarkan pada kelarutan selektif dalam suatu pelarut berdasarkan perbedaan polaritas walau perbedaannya kecil (Tatum *and* Chow, 2000).
f. Kemampuan untuk dihidrolisis ikatan esternya dalam struktur trigliserida. Teknik ini umumnya menggunakan enzim sehingga termasuk ke dalam reaksi enzimatis. Produk konsentrat yang dihasilkan biasanya merupakan campuran antara mono, di, dan trigliserida (Sridhar *and* Lakhsminarayana, 1992; Yamane *et al*, 1992; Lee *et al*, 2003).
g. Kemampuan pemisahan dalam sistem kromatografi. Biasa digunakan produksi konsentrat asam lemak ω-3 untuk keperluan farmasi (*pharmaceutical grade*) dengan kemurnian tinggi (Bimbo, 1998).
h. Kemampuan untuk diekstrak oleh cairan superkritis dalam metode SCFE (*supercritical fluid extraction*) (Tatum *and* Chow, 2000). Teknik yang telah diterapkan adalah menggunakan CO_2 cair sebagai cairan superkritis.

Dari beberapa teknik yang telah diteliti dan dikembangkan, teknik kristalisasi urea merupakan teknik yang telah diaplikasikan secara komersial. Produk konsentratnya digunakan pada farmasi dan pangan.

Teknik Kristalisasi Urea

Prinsip kristalisasi urea

Teknik kristalisasi urea telah diaplikasikan lebih dari 50 tahun untuk menfraksinasi asam lemak bebas. Teknik ini digunakan baik skala kecil untuk keperluan analisis maupun skala besar yang dilakukan di industri (Hayes, 2002). Teknik ini banyak digunakan karena menggunakan suhu yang rendah, murah, dan ramah lingkungan (Guil-Guerrero and Belarbi, 2001). Biasanya teknik kristalisasi juga merupakan tahap yang dilakukan sebelum distilisasi asam lemak bebas yang tidak jenuh untuk keperluan pemurnian (Bimbo, 1998). Teknik kristalisasi didasarkan pada kemampuan urea untuk membentuk kompleks dengan asam lemak bebas yang dikenal dengan nama kompleks inklusi urea (*urea inclusion compound*) (Hayes, 2002).

Seperti halnya inovasi teknik-teknik penting lainnya, kompleks inklusi urea ditemukan secara tidak sengaja oleh M.F. Bengen dari Jerman pada tahun 1940. Bengen ketika itu sedang meneliti pengaruh urea terhadap protein dalam susu pasteurisasi, ternyata urea tersebut membentuk struktur kristal dengan 1-okatanol. Penelitiannya lebih jauh menunjukkan bahwa urea membentuk struktur klatrat (*clathrate*) atau kristal dengan senyawa-senyawa hidrokarbon berantai lurus yang termasuk ke dalam golongan n-alkana, n-alkanol, dan asam lemak bebas, tetapi tidak mampu membentuk kompleks dengan molekul yang bercabang atau siklik (Hayes, 2002).

Pembentukan kompleks urea ini dapat digunakan untuk memisahkan asam lemak dan turunan alkil, meliputi ester lilin (*wax*), lemak alkohol, aldehida, keton, peroksida dan klorida. Perkembangan terakhir menunjukkan bahwa beberapa senyawa lain dapat membentuk kompleks dengan urea yaitu polimer linear seperti poli(etilen glikol), poli-(ε kaprolakton), dan poli (L-asam laktat), dan cabang dari polimer yang berantai lurus (Hayes, 2002).

Pembentukan kompleks dengan urea merupakan salah satu cara fraksinasi yang banyak digunakan karena kristal yang terbentuk bersifat stabil sehingga memudahkan pemisahan. Kompleks urea mempunyai rongga dengan diameter 0,55-0,58 nm (Stout *et al.,* 1990). Rongga tersebut diisi oleh senyawa tamu (*guest compound*) melalui ikatan hidrogen dan gaya van der Waals (Hayes, 2002).

Tahapan teknik konsentrasi dengan kristalisasi

Teknik konsentrasi asam lemak ω-3 dengan metode kristalisasi urea paling banyak digunakan karena murah, dan teknologinya telah dikembangkan mapan. Bentuk kimia asam lemak ω-3 yang dihasilkan adalah dalam bentuk asam lemak bebas. Jika dalam prosesnya dilakukan esterifikasi dengan metanol atau etanol akan dihasilkan konsentrat asam lemak ω-3 dalam bentuk metil/etil ester asam lemak. Metode kristalisasi urea menghilangkan asam lemak jenuh dan asam lemak satu ikatan rangkap (MUFA = *Mono Unsaturated Fatty Acid*) atau asam monoenoat dari minyak ikan (Haagsma *et al.*, 1982).

Teknik konsentrasi asam lemak ω-3 dengan kristalisasi urea melalui beberapa tahap. Seperti telah dijelaskan di atas, kompleks yang terbentuk adalah antara urea dengan asam lemak bebas yang berantai lurus. Asam lemak yang mempunyai percabangan atau mempunyai struktur yang agak melekuk tidak dapat membentuk kompleks dengan urea (Stout *et al.,* 1990).

Asam lemak yang jenuh dan tidak jenuh dapat dipisahkan dengan kristalisasi urea karena perbedaan linearitas rantai alkil keduanya. Asam lemak jenuh mempunyai rantai alkil yang lurus. Asam lemak yang tidak jenuh karena mempunyai ikatan rangkap mempunyai lekukan pada ikatan rangkap tersebut, terutama untuk asam lemak cis. Sedangkan asam lemak trans mempunyai rantai yang lurus dan mempunyai panjang rantai yang lebih pendek (Hayes, 2002).

Tahapan teknik konsentrasi dengan kristalisasi urea meliputi: hidrolisis trigliserida (pembentukan asam lemak bebas), pelarutan, kristalisasi, dan rekoveri asam lemak ω-3 (Gambar 1).

a. Hidrolisis

Pada tahap awal pembuatan konsentrat, trigliserida dihidrolisis menjadi komponen-komponen asam lemak penyusunnya. Hidrolisis dapat dilakukan dengan asam atau alkali dengan KOH atau NaOH dalam alkohol untuk membentuk asam lemak bebas. Hidrolisis dikatalisis oleh asam atau basa dalam etanol. Jika digunakan basa, akan terbentuk fraksi sabun yang dipisahkan dengan fraksi tidak tersabunkan yang terdiri dari gliserol, sterol, dan komponen-komponen non asam lemak lainnya.

Pada proses pembuatan asam lemak bebas tersebut setelah dilakukan hidrolisis dengan alkali, asam lemak berikatan dengan logam alkali membentuk sabun. Fraksi tersabunkan dan tidak tersabunkan kemudian dipisahkan. Fraksi tersabunkan yang telah dipisahkan kemudian diberi asam sampai pH 1,0 dengan tujuan mengubah bentuk sabun (asam lemak bebas dengan logam alkali) menjadi asam lemak bebas (Wanasundara *and* Shahidi, 1999). Jika bentuk kimia asam lemak ω-3 yang diinginkan adalah bentuk metil atau etil ester, asam lemak bebas dapat diberi perlakuan lebih lanjut sehingga terjadi proses esterifikasi. Proses esterifikasi dapat dilakukan dengan metode transmetilasi yaitu dengan mereaksikan etanol atau metanol dengan minyak ikan dengan bantuan katalis kimia (natrium metoksida atau natrium etoksida). Jika pelarut yang digunakan etanol akan diperoleh etil ester asam lemak ω-3, sedangkan jika digunakan metanol akan dihasilkan metil ester asam lemak ω-3 (Hwang dan Liang, 2001).

Proses esterifikasi sering dilakukan karena stabilitas oksidasi asam lemak ω-3 dalam bentuk metil/etil ester asam lemak lebih baik dibandingkan bentuk asam lemak bebas (Song *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003).

Seperti halnya asam lemak bebas, bentuk etil/metil ester juga dapat difraksinasi dengan kristalisasi urea. Metil/etil ester asam lemak yang jenuh atau asam monoenoat akan membentuk kompleks dengan urea, sedangkan metil/etil ester asam lemak ω-3 tidak dapat membentuk kompleks inklusi urea.

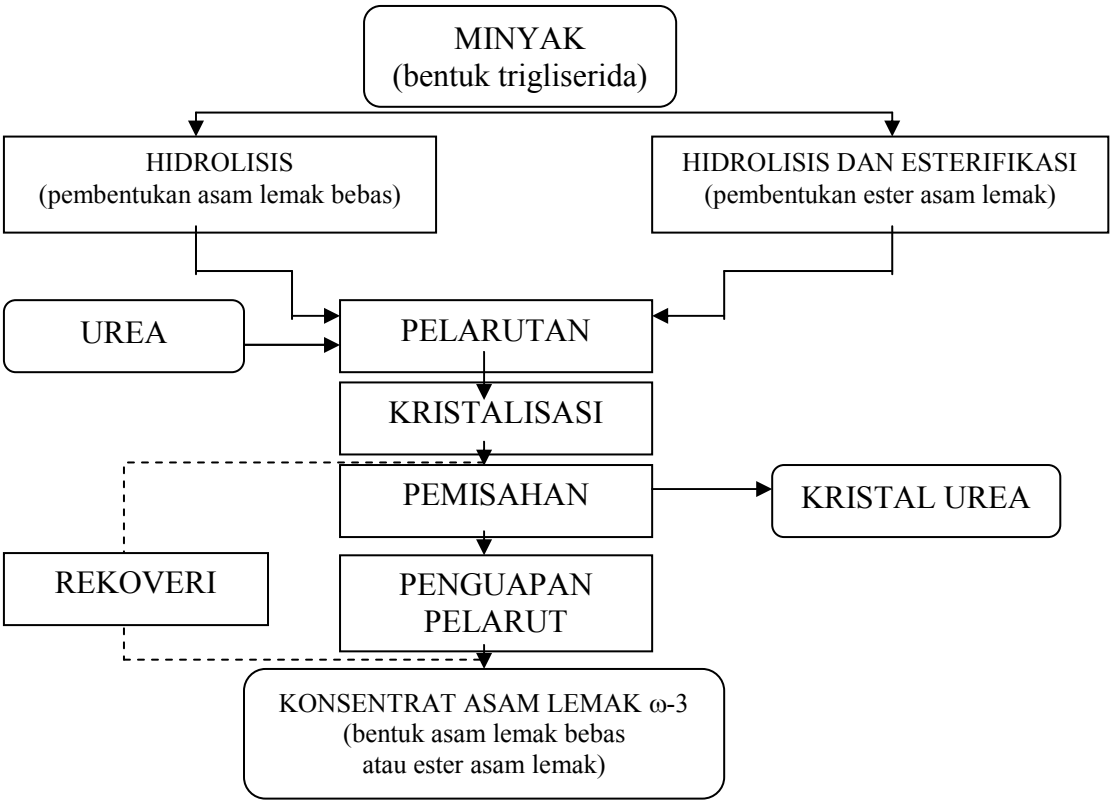
b. Pelarutan

Setelah asam lemak bebas atau metil/etil ester asam lemak terbentuk, senyawa ini kemudian dilarutkan bersama-sama dengan urea. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang bersifat polar seperti metanol, etanol, dioksan, atau metilen klorida. Syarat pelarut yang digunakan adalah pelarut tersebut tidak dapat membentuk kompleks inklusi dengan urea atau tidak dapat berperan sebagai senyawa tamu (Hayes, 2002).

Jumlah urea yang digunakan atau rasio antara urea dengan asam lemak bebas atau metil/etil ester asam lemak bervariasi. Biasanya variasi ini tergantung dari jenis minyak yang digunakan. Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk menentukan rasio terbaik untuk setiap jenis minyak ikan yang dibuat konsentrat asam lemak ω-3. Rasio yang paling optimum dapat ditentukan dengan teknik-teknik optimasi seperti metoda permukaan respon. Penelitian Wanasundara *and* Shahidi (1999) yang menentukan rasio optimum untuk minyak anjing laut menunjukkan bahwa rasio urea:asam lemak bebas yang optimum untuk jenis asam lemak ω-3 yaitu EPA dan DHA ternyata juga berbeda.

Selama proses pelarutan asam lemak dan urea membentuk kompleks inklusi dan terjadi transformasi bentuk urea dari tetragonal menjadi heksagonal (Stout *et al.*, 1990). Pelarut tertentu dapat berperan sebagai ko-solven yang berperan meningkatkan proses transformasi urea seperti benzena.

Urea murni berbentuk tetragonal, apabila berikatan dengan molekul asam lemak, dua molekul urea akan berikatan membentuk struktur heksagonal (Stout *et al.*, 1990). Bentuk heksagonal terjadi jika urea berikatan dengan molekul yang mempunyai diameter kurang dari 5,2 A°. Hanya molekul dengan diamater lebih kecil yang dapat membentuk kompleks inklusi urea, yaitu selain senyawa alifatik, seperti alkohol, keton, ester, eter amina, nitrit, asam mono dan di karboksilat (Hayes, 2002).



Gambar 1. Tahapan pembuatan konsentrat asam lemak ω-3 dengan metode kristalisasi urea

Asam lemak yang berantai lurus dan mempunyai diamater kurang dari 5,2 A° yang dapat membentuk kompleks dengan urea. Karena asam lemak tidak jenuh mempunyai struktur yang melekuk atau bengkok pada ikatan rangkapnya, diameternya menjadi lebih besar dibandingkan asam lemak jenuh sehingga tidak dapat membentuk kompleks inklusi urea (Stout *et al.*, 1990).

c. Kristalisasi

Selama proses kristalisasi asam lemak jenuh dan monoenoat akan membentuk kompleks dengan urea, tetapi PUFA tidak dapat membentuk kompleks sehingga terjadi proses separasi atau fraksinasi.

Teknik kristalisasi tidak dapat menghasilkan konsentrat dengan kadar PUFA 100%, karena tidak semua asam lemak jenuh dan asam monoenoat membentuk kompleks inklusi dengan urea. Asam monoenoat rantai panjang seperti C20 dan C22 secara cepat membentuk kompleks dengan urea, tetapi asam monoenoat dengan rantai lebih pendek seperti C14 dan C16 lebih lambat dalam membentuk kompleks inklusi urea (Hwang *and* Liang, 2001).

Beberapa faktor yang harus diperhatikan pada proses kristalisasi ini adalah suhu kristalisasi, rasio urea:asam lemak, dan lama proses (Wanasundara *and* Shahidi, 1999). Ketiga faktor tersebut mempengaruhi proses kristalisasi atau pembentukan kompleks inklusi urea-asam lemak, sehingga mempengaruhi rendemen dan kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat yang dihasilkan.

Selama proses kristalisasi banyak faktor yang mempengaruhi proses secara simultan, sehingga kondisi proses kristalisasi optimal pada pembuatan konsentrat asam lemak ω-3 dari suatu jenis minyak ikan tertentu perlu ditentukan. Penentuan kondisi optimal tersebut dapat didasarkan pada kadar EPA, DHA atau total asam lemak ω-3 tergantung dari jenis konsentrat asam lemak ω-3 yang diinginkan. Kondisi optimal ini dapat bervariasi tergantung dari jenis minyak

ikan yang digunakan.

Selain kadar asam lemak ω-3, penentuan kondisi proses kristalisasi juga harus mempertimbangkan rendemen yang diperoleh. Rendemen penting diperhatikan karena jika diproduksi secara komersial akan mempengaruhi nilai ekonomi produk konsentrat yang dihasilkan.

Suhu

Ada kecenderungan peningkatan pembentuk kompleks inklusi asam lemak jenuh dan monoenoat dengan urea seiring meningkatnya konsentrasi urea. Sedangkan untuk suhu, semakin rendah suhu yang digunakan kecenderungan pembentukan kompleks inklusi antara asam lemak jenuh atau monenoat dengan urea semakin tinggi. Sebaliknya, semakin tinggi suhu tendensi asam lemak membentuk kompleks dengan urea semakin menurun (Wanasundara *and* Shahidi, 1999). Suhu optimum kristalisasi urea tergantung dari jenis asam lemak ω-3 yang diinginkan. Pada suhu yang sangat rendah PUFA juga dapat membentuk kompleks inklusi dengan urea.Rendemen konsentrat asam lemak ω-3 yang diperoleh sangat tergantung pada suhu. Demikian juga kadar asam lemak ω-3. Semakin tinggi suhu, rendemen semakin tinggi tetapi kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat semakin rendah. Sebaliknya semakin rendah suhu, rendemen semakin rendah tetapi kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat semakin tinggi atau dengan kata lain konsentrat semakin murni. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa rekoveri asam lemak ω-3 yang optimal adalah pada suhu kristalisasi 4°C. Beberapa suhu yang telah digunakan oleh beberapa peneliti dan kadar asam lemak ω-3 yang dihasilkan seperti pada Tabel 1.

Suhu optimum kristalisasi juga tergantung dari jenis asam lemak ω-3 yang ingin ditingkatkan konsentrasinya. Menurut Guil-Guerrero dan Belarbi (2001). umumnya jika DHA yang diinginkan suhu yang digunakan adalah 4°C. Sedangkan jika diinginkan konsentrat dengan kadar EPA tinggi, suhu yang biasa digunakan umumnya adalah 20-28°C, karena pada kisaran suhu ini kadar EPA dalam fraksi yang tidak membentuk kristal paling tinggi.

Hasil penelitian Hwang *and* Liang (2001) dengan menggunakan minyak *viscera* cumi-cumi menunjukkan bahwa persentase EPA cenderung konstan pada suhu 0-30°C dengan kadar yang lebih rendah diperoleh pada kisaran suhu 20-28°C. Sebaliknya untuk DHA, pada kisaran suhu 18-30°C kadar DHA cenderung turun dengan kadar terendah diperoleh pada suhu 22°C. Kadar total asam lemak ω-3 yang maksimum dicapai pada suhu 2-6°C, dengan kadar terendah pada suhu -10°C.

Wille *et al*. (1987) (*cit* Stout *et al.*, 1990) berpendapat pembuatan konsentrat DHA lebih efisien jika digunakan suhu-5°C, kadar EPA yang maksimum diperoleh pada suhu 10°C, dan kadar total asam lemak ω-3 maksimum adalah pada suhu 15°C. Ada kecenderungan penggunaan suhu harus lebih rendah jika konsentrat yang diinginkan adalah konsentrat DHA, sedangkan suhu lebih tinggi dapat digunakan untuk mendapat konsentrat EPA.

Hasil penelitian Elizabeth (1992) dengan minyak limbah industri pengalengan ikan tuna menunjukkan bahwa penggunaan suhu yang bervariasi (-20°C, 5°C, dan suhu ruang) tidak mempengaruhi kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat hasil.

Hasil penelitian Wanasundara *and* Shahidi (1999) yang mengkaji suhu optimum kristalisasi asam lemak dari minyak anjing laut menunjukkan bahwa jika kadar DHA yang ingin dimaksimumkan, maka kadar EPA akan minimum. Kadar DHA optimum diperoleh pada suhu kristalisasi -10°C, dan pada suhu tersebut kadar EPA minimum. Kadar DHA yang diperoleh adalah 88,1% dengan rendemen 21,5% dari berat minyak anjing laut asal.

Lama kristalisasi

Pembentukan kompleks inklusi urea membutuhkan waktu tertentu sehingga pembentukan kompleks maksimum dan sempurna. Jika lama kristalisasi terlalu singkat, hanya sedikit asam lemak yang membentuk kompleks dengan urea, sehingga diperoleh konsentrat rendemen tinggi tetapi kadar asam lemak ω-3 rendah.

Tabel 1. Suhu kristalisasi dan kadar asam lemak ω-3 yang dihasilkan dari beberapa jenis minyak

Peneliti	Jenis Minyak	Suhu (°C)	Kadar Asam Lemak ω-3 (%)		
			EPA	DHA	Total
Haagsma *et al.* (1982)	Minyak hati ikan kod	suhu ruang	27,6	44,6	86,7
Ackman *et al.* (1988)	*Redfish oil*		32,5	29,2	-
Estiasih (1996)	Minyak ikan lemuru	20	36,60	22,90	70,22
Ganga *et al.* (1998)	Minyak ikan sardin	10	41,1	50.2	-
Wanasundara dan Shahidi (1999)	Minyak anjing laut	-11	67,6	-	88,2
Hwang dan Liang (2001)	Minyak *viscera* cumi-cumi:				
	Illex argentinus	20	28,2	35,6	-
	Ommasthrepes bartrami	20	10,1	30,0	-

Lama kristalisasi dipengaruhi oleh jenis minyak yang digunakan sebagai sumber asam lemak ω-3. Lama kristalisasi optimal juga tergantung jenis asam lemak ω-3 yang ingin ditingkatkan kadarnya.

Beberapa penelitian mengenai kristalisasi urea menggunakan lama proses yang bervariasi dengan jenis minyak yang digunakan juga berbeda-beda (Tabel 2).

Penelitian Estiasih (1996) mengenai kristalisasi urea dengan menggunakan bahan baku minyak hasil samping pengalengan ikan lemuru menunjukkan bahwa lama kristalisasi 24 dan 48 jam tidak menyebabkan perbedaan kadar asam lemak ω-3. Hal tersebut menunjukkan bahwa setelah 24 jam tidak terjadi pembentukan kompleks inklusi urea lagi.

Rasio urea:asam lemak

Seperti halnya suhu dan lama kristalisasi, rasio urea:minyak atau asam lemak mempengaruhi proses kristalisasi. Pada rasio urea:asam lemak yang rendah ada kemungkinan asam lemak jenuh dan monoenoat tidak dapat membentuk kompleks inklusi dengan urea karena jumlah urea tidak cukup. Akibatnya kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat hasil akan rendah. Sebaliknya, rasio urea:asam lemak yang rendah rendemen akan tinggi karena hanya sedikit asam lemak yang membentuk kompleks inklusi urea.

Pada rasio urea:asam lemak yang tinggi, ada kemungkinan asam lemak jenuh atau asam monoenoat telah sempurna membentuk kompleks sehingga ada kelebihan urea yang tidak membentuk kompleks dengan asam lemak. Oleh karena itu perlu ditentukan rasio urea:asam lemak yang optimal. Rasio optimal ini tergantung dari jenis minyak yang dibuat konsentrat asam lemak ω-3.

Beberapa rasio urea:minyak yang telah digunakan oleh beberapa peneliti dapat dilihat pada Tabel 3. Jika minyak yang dibuat konsentrat mengandung kadar asam lemak jenuh dan monenoat yang tinggi, rasio urea:asam lemak yang diperlukan juga akan tinggi. Sebaliknya jika kadar asam lemak jenuh dan asam monoenoat lebih rendah, rasio urea:asam lemak yang dibutuhkan akan lebih rendah pula (Hayes, 2002). Sehingga komposisi asam lemak dalam minyak asal sangat menentukan.

Pada proses kristalisasi ada kesetimbangan antara asam lemak dan urea dengan kristal yang terbentuk (Stout *et al.*, 1990). Sampai kristal yang terbentuk mencapai optimum, penambahan jumlah urea tidak akan menambah jumlah asam lemak yang membentuk kompleks inklusi sehingga tidak meningkatkan kadar asam lemak ω-3 dalam konsentrat yang dihasilkan. Oleh karena itu rasio urea: minyak yang optimum harus diketahui dan rasio tersebut tergantung dari komposisi asam lemak dalam minyak.

Selain komposisi asam lemak dalam minyak, suhu yang digunakan juga turut mempengaruhi. Pada suhu yang sangat rendah, asam lemak tidak jenuh PUFA dapat membentuk kompleks dengan urea. Sehingga pada suhu yang rendah, rasio urea:minyak yang dibutuhkan akan lebih tinggi jika dibandingkan suhu yang lebih tinggi (Guerrero *and* Belarbi, 2001).

d. Rekoveri asam lemak ω-3

Kristal urea yang terbentuk berbentuk seperti jarum dengan ukuran yang besar. Oleh karena ukuran kristal yang besar maka pemisahan dapat dilakukan dengan penyaringan dan tidak memerlukan peralatan khusus seperti alat sentrifusa atau penyaring vakum.

Kelebihan kristalisasi urea dibanding kristalisasi pelarut adalah kristal yang terbentuk bersifat stabil pada suhu ruang, sehingga proses penyaringan tidak perlu dilakukan pada suhu rendah.

Rekoveri asam lemak ω-3 dilakukan dengan mengekstrak asam lemak ω-3 dari cairan induk setelah kristal urea yang terbentuk dipisahkan. Asam lemak yang membentuk kristal dengan urea merupakan asam lemak jenuh atau monenoat. Asam lemak ini dapat dimanfaatkan untuk industri yang tidak mensyaratkan asam lemak yang tidak jenuh seperti industri sabun atau cat.

Tabel 2. Lama kristalisasi dan kadar asam lemak ω-3 yang dihasilkan dari beberapa jenis minyak

Peneliti	Jenis Minyak	Lama (jam)	Kadar Asam Lemak ω-3 (%)		
			EPA	DHA	Total
Haagsma *et al.* (1982)	Minyak hati ikan kod	12	27.6	44,6	86,7
Ackman *et al.* (1988)	*Redfish oil*	24	32,5	29,2	-
Estiasih (1996)	Minyak ikan lemuru	24	36,60	22,90	70,22
Ganga *et al.* (1998)	Minyak ikan sardin	48	41,1	50.2	-
Wanasundara dan Shahidi (1999)	Minyak anjing laut	24	67,6	-	88,2
Hwang dan Liang (2001)	Minyak *viscera* cumi-cumi:				
	Illex argentinus	3	28,2	35,6	-
	Ommasthrepes bartrami	3	10,1	30,0	-

Tabel 3. Rasio urea:minyak dan kadar asam lemak ω-3 yang dihasilkan dari beberapa jenis minyak

Peneliti	Jenis Minyak	Rasio	Kadar Asam Lemak ω-3 (%)		
			EPA	DHA	Total
Haagsma *et al.* (1982)	Minyak hati ikan kod	3:1	27.6	44,6	86,7
Ackman *et al.* (1988)	*Redfish oil*	50:19,3	32,5	29,2	-
Estiasih (1996)	Minyak ikan lemuru	2:1	36,60	22,90	70,22
Ganga *et al.* (1998)	Minyak ikan sardin	3:1	41,1	50.2	-
Wanasundara dan Shahidi (1999)	Minyak anjing laut	4,3:1	67,6	-	88,2
Hwang dan Liang (2001)	Minyak *visce-ra* cumi-cumi:				
	Illex argentinus	3:1	28,2	35,6	-
	Ommasthrepes bartrami	3:1	10,1	30,0	-

Selama proses rekoveri asam lemak ω-3 dari cairan induk suhu proses diusahakan serendah mungkin untuk mencegah oksidasi termal. Demikian juga kontak dengan udara harus dihindari dengan cara penggunaan kondisi vakum atau pemberian gas nitrogen.

KESIMPULAN

Teknik kristalisasi urea pada pembuatan konsentrat asam lemak ω-3 didasarkan pada ketidakmampuan urea untuk membentuk kompleks inklusi dengan asam lemak yang sangat tidak jenuh seperti asam lemak ω-3 disebabkan strukturnya yang melekuk. Teknik ini telah diaplikasikan secara luas dengan kadar asam lemak ω-3 yang tinggi dalam konsentrat yang dihasilkan. Bentuk kimia asam lemak ω-3 yang dihasilkan dari kristalisasi urea adalah bentuk asam lemak bebas atau metil/etil ester asam lemak.

Parameter proses yang mempengaruhi kristalisasi urea adalah suhu, lama kristalisasi dan rasio urea:minyak yang besarnya berbeda untuk setiap jenis minyak. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi parameter proses untuk mendapatkan konsentrat dengan kadar asam lemak ω-3 optimum dari suatu jenis minyak ikan.

DAFTAR PUSTAKA

Ackman, R.G., W.M.N. Ratnayake, and B. Olsson. 1988. The "basic": fatty acid composition of Atlantic fish oils: potential similarities useful for enrichment of polyun-saturated fatty acids by urea complexation. *JAOCS, 65(1):136-138*.

Ahmadi, K. 2006. Optimasi kristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan minyak kaya asam lemak ω-3 dari hasil samping pengalengan ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). Agritek, 14(3): 580-593.

Baik, M-Y., E.L. Suhendro, W.W. Nawar, D.J. McClements, E.A. Dekker, and P. Chinachoti. 2004. *Effects of Antioxidants and Humidity on the Oxidative Stability of Microencapsulated Fish Oil*. JAOCS, 81(4): 355-360.

Becker, C.C. and D.J. Kyle. 1998. Developing functional foods containing algal docosahexaenoic acid. *Food Technology, 52(7): 68-71.*

Bimbo, A.P. 1998. Guidelines for characterizing food-grade fish oil. *INFORM, 9(5): 473-483.*

Choe, B. and D.B. Min. 2005. Chemistry and Reaction of Reactive Oxygen Species in Foods. *J. Food Sci., R142-R159.*

Crawford, M.A., M. Bloom, C.I. Broadhurst, W.F. Schmidt, S.C. Cunnane, C. Galli, K. Gehbremeskel, F. Linseisen, J. Llyod-Smith, and J. Parkington. 1999. *Evidence for the Unique Function of Docosahexaenoic Acid During the Evolution of the Modern Hominid Brain.* Lipids, 34: S39-S45.

Elizabeth, J. 1992. Isolasi Asam Lemak Omega-3 dari Hasil Limbah Industri Pengalengan Ikan Tuna. Thesis S_2. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Estiasih, T. 1996. Mikroenkapsulasi Konsentrat Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Cair Pengalengan Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*). Thesis S_2. Program Pascasarjana – Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Ganga, A., S. Nieto, J.Sanhuez, C.Romo, H.Speisky, and A.Valenzuela. 1998. Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids from sardine oil. *JAOCS, 75(6): 233-235.*

Garcia, D.J. 1998. Omega-3 long chain PUFA nutraceuticals. *Food Technology, 52(6): 44-49.*

Guil-Guerrero, J.L. and E-H. Belarbi. 2001. Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids. *JAOCS, 78(5): 472-484.*

Haagsma, N., C.M. van Gent, J.B. Luten, R,W, de Jong, and E. van Doorn. 1982. Preparation of an n-3 fatty acids concentrate from cod liver oil. *JAOCS, 59(3): 117-118.*

Hardman, W.E. 2002. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J. Nutr., 132:3508S-3512S.*

Hardman, W.E. 2004. (n-3) fatty acids and cancer terapi. *J. Nutr., 134: 3427S-3430S.*

Hayes, D.G. 2002. Urea inclusion compound formation. *INFORM, 13: 781-783*.

Huang, M.T., G. Ghai, and C.T. Ho. 2004. *Inflammatory Process and Molecuklar Targets for Anti-inflammatory Nutraceuticals*. Comprehensive Reviews in Food Sci and Food Safety, 3: 127-139.

Hwang, L.S. and J-H. Liang. 2001. Fractionation of urea-pretreated squid visceral oil ethyl esters. *JAOCS, 78(5): 473-476*.

Jolly, C.A., A. Muthukumar, C.P.R. Avula, D. Troyer, and G. Fernandes. 2001. *Autoimmune-Prone (NZBXNZW) (1) Mice Fed a Diet Enriched with (n-3) Fatty Acids*. J. Nutr., 131: 2753-2760.

Lee, H., Kizito, S.A., Weeseem S.J., Craig-Schmidt, M.C., Lee, Y., Wei, C.I., and H.An. 2003. Analysis of headspace volatile and oxidized volatile compounds in DHA-enriched fish oil on accelarated oxidative storage. *J. Food Sci., 68(7): 2169-2177*.

Leitzmann, M.F., M.J. Stampfer, D.S. Michaud, K. Augustsson, G.C. Colditz, W.C. Willett, and E.L. Giovannuci. 2004. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer.*Am.J.of Clin.Nutr., 80(1):204-216.*

Moffat, C.F., McGill, A.S., Hardy, R., and R.S. Anderson. 1993. *The Production of Fish Oils Enriched in Polyunsaturated Fatty Acid-Containing Triglycerides*. JAOCS, 70(2): 133-138.

Mori, T.A., D.Q. Bao, V. Burke, I.E. Puddey, G.F. Watts. And L.J. Beilin, 1999. *Dietary Fish as a Major Component of a Weight-loss Diet: Effect on Serum Lipids, Glucose, and Insulin Metabolism in Overweight Hypertensive Subjects*. Am. J. Clin, Nutr., 70(5): 817-825.

Nettleton, J.A. 1995. *Omega-3 Fatty Acids and Health*. Chapman & Hall, New York.

Nettleton, J.A. 2005. Omega-3 fatty acids in food and health. *Food Technology, 59:120*.

Rotsstein, N.P., M.I. Avedalno, and L.E. Politi. 1999. *Essentiality of Docosahexaenoic Acid in Retina Photoreceptor Cell Development*. Lipids, 34: S115.

Song, J-H., Inoue, Y., and T. Miyazawa. 1997. Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters. *Biosci.Biotech.Biochem., 61(12): 2085-2088*.

Spector, A.A. 1999. *Essentiallity of Fatty Acids*. Lipids, 34: S1-S3.

Sridhar, R. and G. Lakhsminarayana. 1992. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid into groundnut oil by lipase-catalyzed ester interchange. *JAOCS, 69(10): 1041-1042.*

Stout, V.F., W.B. Nilsson, J. Krzynowek, and H. Schlenk. 1990. Fractionation of Fish Oil and Their Fatty Acids. In M.E. Stansby (ed.). Fish Oil in Nutrition. Van Norstand Reinhold, New York.

Tatum and C.K Chow. 2000. Fat in Food and Their Health Implication 2nd Ed. Marcell Dekker Inc. New York

Terry, P.D., T.E. Rohan, and A. Wolk. 2003. Intakes of fish marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am. J. Clin. Nutr., 77(3): 532-543.*

Tiemeier, H., H.R. van Tuije, A. Hofman, A.J.Kilian, and M.M.B. Breteler. 2003. *Plasma Fatty Acid Composition and Depression Are Associated in the Elderly: the Rotterdam Study*. Am. J. Clin. Nutr. 78(1): 40-46.

Uauy, R. and D.R. Hoffman. 2000. Essential fat requirements of preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr. 71(1): 245S-250S*.

Wanasundara, U.N. and F. Shahidi. 1999. Concentration of Omega-3 Polyun-saturated Fatty Acids of Seal Bubbler Oil by Urea Complexation: Optimization of Reactions Conditions. *Food Chemistry 65: 41-49*.

Yamane, T., T. Suzuki, Sahashi, L. Vikersveen, and T. Hoshino. 1992. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil by lipase-catalyzed acydolisis without solvent. *JAOCS 69(11): 1104-1107*.