

**OPTIMASI KRISTALISASI II PADA KRISTALISASI BERTINGKAT MENGGUNAKAN
SUHU RENDAH UNTUK SEPARASI FRAKSI KAYA FITOSTEROL
DARI DISTILAT ASAM LEMAK MINYAK SAWIT**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN



KHUMAIROH KHOLILA

166100100111032

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2021



**OPTIMASI KRISTALISASI II PADA KRISTALISASI BERTINGKAT MENGGUNAKAN
SUHU RENDAH UNTUK SEPARASI FRAKSI KAYA FITOSTEROL**

DARI DISTILAT ASAM LEMAK MINYAK SAWIT

Oleh :

KHUMAIROH KHOLILA

166100100111032

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN



TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Magister Teknologi Pertanian Strata 2 (S2)**

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

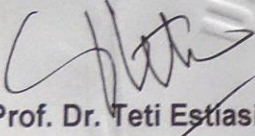
TESIS

Optimasi Kristalisasi II pada Kristalisasi Bertingkat Menggunakan
Suhu Rendah pada Separasi Fraksi Kaya Fitosterol
dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit

Oleh :
Khumairoh Kholila

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal 4 Juni 2021
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,


Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP.

Ketua


Prof. Dr. Ir. Harijono, M.App.Sc.

Anggota

Anggota

Malang,

Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Brawijaya

Dekan,


Prof. Dr. Ir. Imam Santoso, MP

NIP. 19681005 199512 1 001



PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang,

Mahasiswa



Nama : KHUMAIROH KHOLILA
NIM : 166100100111032
PS : TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
PPSFTPUB

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillahirobbil 'Alamin atas limpahan rahmat dan karunia Allah SWT, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian tesis yang berjudul "Optimasi Kristalisasi II pada Kristalisasi Bertingkat Menggunakan Suhu Rendah untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit".

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Umar Faruq, S.Pd.I dan ibu Nuris Syamsiyah, S.Pd.I yang selalu memberikan kasih sayang luar biasa dan dukungan penuh baik secara materi maupun non materi sebagai orangtua dari penulis, juga kepada kakak dan adik yang selalu menghibur dan menguatkan ketika penulis mengalami kesulitan.
2. Suami tercinta Eko Isro Riyanto, STP., MP yang tidak henti-hentinya memberikan semangat dan motivasi sepanjang perjalanan penulisan tesis ini
3. Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP dan Prof. Dr. Ir. Harijono, M.App.Sc selaku dosen pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu dan kesabaran yang luar biasa untuk memberikan bimbingan, dukungan, serta saran dalam penyusunan tesis ini.
4. Dr. Ir. Kgs. Ahmadi, MP selaku dosen pembimbing dari Universitas Tribhuwana Tungadewi yang telah memberikan kesempatan, arahan, serta fasilitas penelitian kepada penulis dalam melaksanakan proyek penelitian sebagai tugas akhir ini.
5. Teman-teman Magister Teknologi Hasil Pertanian (THP) angkatan 2016.
6. Teman-teman dan pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan laporan tesis ini.

Menyadari adanya keterbatasan pengetahuan, referensi, dan pengalaman, penulis mohon maaf yang sebesar-besarnya dan tetap berbesar hati untuk menerima masukan ataupun kritik yang membangun. Semoga laporan tesis ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis sendiri maupun semua pihak yang membutuhkan.

Malang, 21 Januari 2021

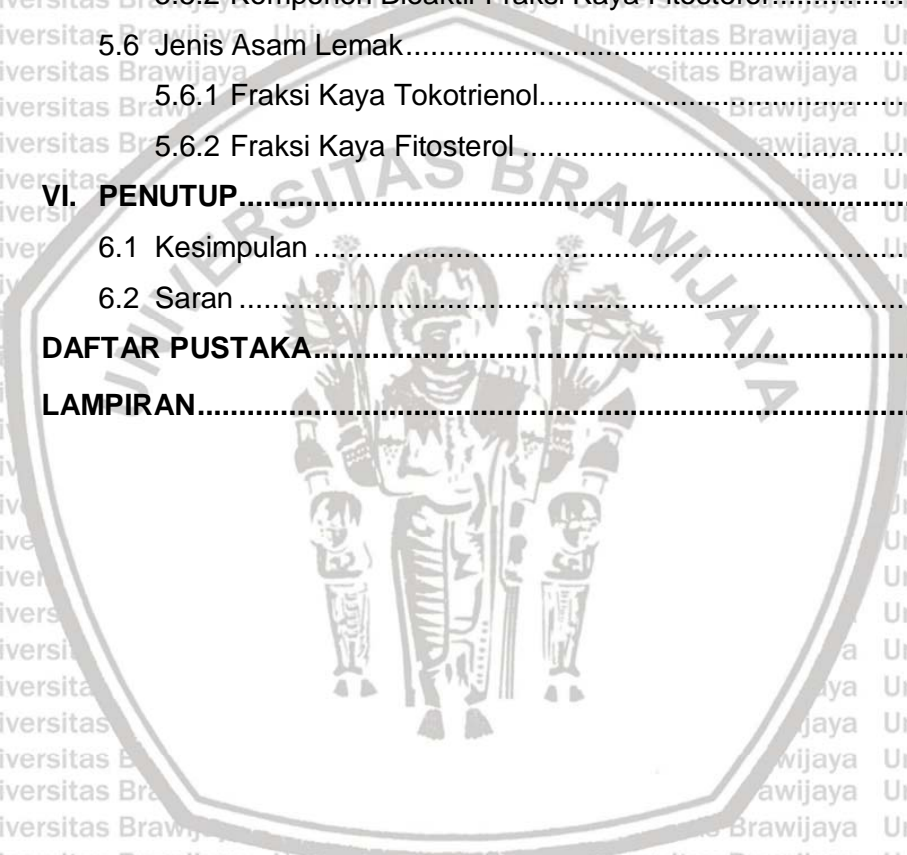
Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kelapa Sawit dan Minyak Kelapa Sawit	5
2.2 Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS)	10
2.3 Peran Fitosterol bagi Kesehatan	19
2.4 Separasi Fitosterol	22
2.5 Saponifikasi	25
2.6 Kristalisasi	28
2.7 Kristalisasi Pada Suhu Rendah	31
III. LANDASAN TEORI	33
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	33
3.2 Kerangka Operasional Penelitian	35
3.3 Hipotesis	36
IV. METODE PENELITIAN	39
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	39
4.2. Bahan dan Alat Penelitian	39
4.3. Pelaksanaan Penelitian	40
4.4. Rancangan Penelitian	42
4.5. Diagram Alir Penelitian	44
4.6. Metode Analisis	46
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	48
5.1 Karakteristik Bahan Baku	48

5.1.1 Asam Lemak Bebas.....	48
5.1.2 Komponen Bioaktif.....	51
5.2 Optimasi Kristalisasi II untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol.....	55
5.3 Analisa Permukaan Respon Kadar Fitosterol.....	56
5.3.1 Evaluasi Pemilihan Model Respon.....	56
5.3.2 Analisa Ragam dari Permukaan Respon.....	58
5.4 Penentuan Titik Optimum Respon dan Verifikasi.....	64
5.5 Karakteristik Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum.....	66
5.5.1 Komponen Kimia Fraksi Kaya Fitosterol.....	66
5.5.2 Komponen Bioaktif Fraksi Kaya Fitosterol.....	71
5.6 Jenis Asam Lemak.....	73
5.6.1 Fraksi Kaya Tokotrienol.....	75
5.6.2 Fraksi Kaya Fitosterol.....	76
VI. PENUTUP.....	79
6.1 Kesimpulan.....	79
6.2 Saran.....	80
DAFTAR PUSTAKA.....	81
LAMPIRAN.....	92



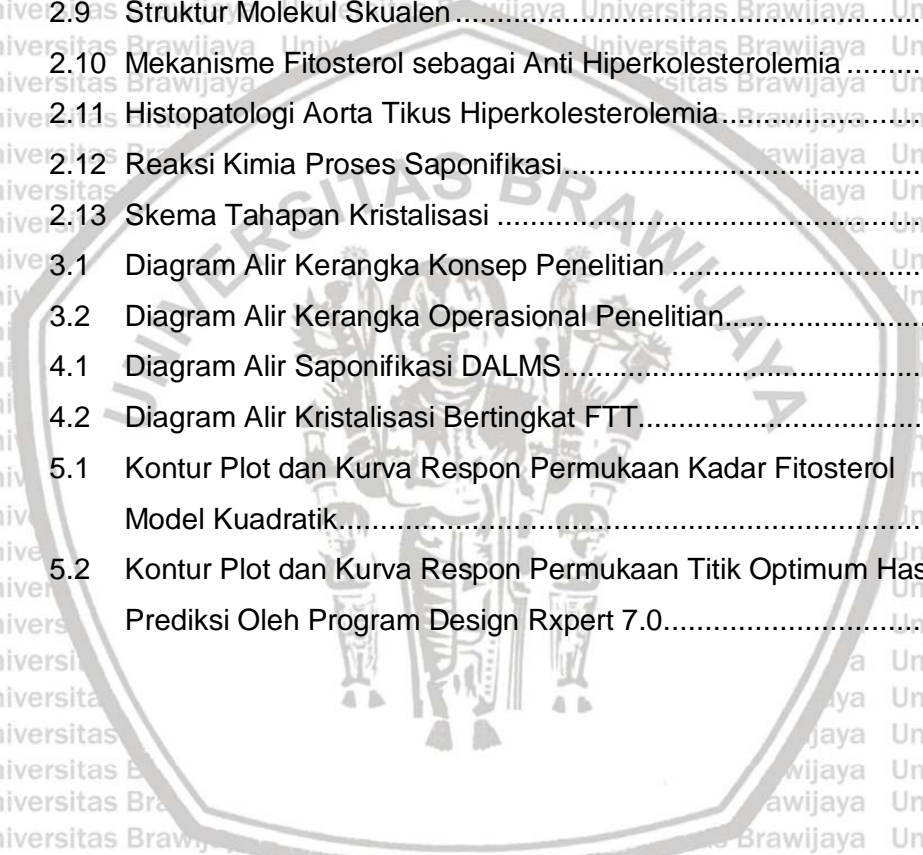
DAFTAR TABEL

2.1	Komposisi Kimia DALMS	12
2.2	Komposisi Asam Lemak Bebas dari DALMS	12
2.3	Kandungan Tokoferol dan Tokotrienol dalam DALMS	13
2.4	Karakteristik Heksana	25
2.5	Perbandingan Komponen Fitokimia DALMS dan FTT	27
4.1	Rancangan Komposit Pusat untuk Optimasi Kristalisasi II Pelarut Suhu Rendah pada Fraksi Kaya Fitosterol	42
5.1	Kadar Asam Lemak Bebas pada Beberapa Sampel	47
5.2	Kadar Komponen Bioaktif pada Distilat Asam Lemak Minyak Sawit dan Fraksi Tidak Tersabunkan	52
5.3	Kadar Komponen Bioaktif pada Fraksi Kaya Tokotrienol dan Fraksi Kristal dari Kristalisasi I	53
5.4	Hasil Optimasi Kristalisasi II pada Suhu Rendah untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol	56
5.5	Hasil Pemilihan Model Urutan Jumlah Kuadrat (sequential model Sum of squares) terhadap Respon Kadar Fitosterol	57
5.6	Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Uji Ketidaktepatan Model (lack of fit test) terhadap Respon Kadar Fitosterol	58
5.7	Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Statistik (model summary statistics) terhadap Respon Kadar Fitosterol	58
5.8	Hasil Analisis Ragam (ANOVA) pada Respon Kadar Fitosterol Model Kuadrat	59
5.9	Data Solusi Titik Optimum dan Hasil Verifikasi	65
5.10	Komponen Kimia Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum	67
5.11	Persentase Nilai Rendemen pada Beberapa Sampel	70
5.12	Komponen Bioaktif Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum	71
5.13	Perbandingan Kadar Fitosterol pada Kristalisasi I dan II	73
5.14	Profil Asam Lemak Fraksi Kaya Tokotrienol	76
5.15	Profil Asam Lemak Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum	77



DAFTAR GAMBAR

2.1	Buah Kelapa Sawit	5
2.2	Varietas Kelapa Sawit.....	8
2.3	Skema Industri Minyak Kelapa Sawit.....	11
2.4	Struktur Molekul Tokoferol dan Tokotrienol.....	14
2.5	Skema Biosintesis Tokoferol.....	15
2.6	Struktur Kimia Kolesterol dan Kampesterol.....	16
2.7	Struktur Molekul Fitosterol	18
2.8	Kandungan Senyawa Fitosterol dalam Berbagai Produk Pangan	18
2.9	Struktur Molekul Skualen	19
2.10	Mekanisme Fitosterol sebagai Anti Hiperkolesterolemia	20
2.11	Histopatologi Aorta Tikus Hiperkolesterolemia.....	22
2.12	Reaksi Kimia Proses Saponifikasi.....	26
2.13	Skema Tahapan Kristalisasi	29
3.1	Diagram Alir Kerangka Konsep Penelitian	37
3.2	Diagram Alir Kerangka Operasional Penelitian.....	38
4.1	Diagram Alir Saponifikasi DALMS.....	44
4.2	Diagram Alir Kristalisasi Bertingkat FTT.....	45
5.1	Kontur Plot dan Kurva Respon Permukaan Kadar Fitosterol Model Kuadratik.....	61
5.2	Kontur Plot dan Kurva Respon Permukaan Titik Optimum Hasil Prediksi Oleh Program Design Rxpert 7.0.....	65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Analisa..... 90
Lampiran 2. Hasil Analisa Komponen Kimia 95
Lampiran 3. Hasil Analisa Komponen Vitamin E..... 97
Lampiran 4. Hasil Analisa Komponen Fitosterol..... 110
Lampiran 5. Hasil Analisa Komponen Skualen..... 141
Lampiran 6. Hasil Analisa Jenis Asam Lemak..... 144



KHUMAIROH KHOLILA. 166100100111032. Optimasi Kristalisasi II pada Kristalisasi Bertingkat Menggunakan Suhu Rendah untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit.

**Dosen Pembimbing : 1. Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP
2. Prof. Dr. Ir. Harijono, M.App.Sc**

RINGKASAN

Indonesia merupakan negara produsen kelapa sawit nomor satu di dunia yang merupakan salah satu sumber minyak nabati. Selain dihasilkan produk utama berupa CPO (*Crude Palm Oil*), juga dihasilkan produk samping yang disebut DALMS (Distilat Asam Lemak Minyak Sawit). DALMS kaya akan asam lemak bebas serta komponen fitokimia lain seperti karoten, vitamin E, fitosterol, serta skualen. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan separasi komponen fitokimia dari DALMS terutama untuk mendapatkan fraksi kaya fitosterol (FKF) menggunakan teknik kristalisasi bertingkat pada suhu rendah (*supercooling crystallization*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum dari proses kristalisasi ke-II. Penentuan kondisi optimum tersebut menggunakan *Response Surface Methodology* dengan dua variabel bebas yaitu rasio pelarut:fraksi kristal (X_1) dan lama kristalisasi II (X_2). Variabel terikat (Y) atau respon yang dioptimumkan adalah kadar fitosterol. Rancangan yang digunakan adalah rancangan komposit pusat dengan model kuadratik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum yang disarankan pada proses kristalisasi II adalah menggunakan rasio pelarut:fraksi kristal sebanyak 7,81:1 dengan lama kristalisasi II yaitu 70,82 jam. Hasil verifikasi menunjukkan bahwa kondisi tersebut dapat menghasilkan kadar fitosterol yang maksimum sebesar 48,74% dengan rendemen 0,03%. Hasil analisa kimia dan komponen bioaktif menunjukkan bahwa sampel FKF kondisi optimum memiliki kandungan asam lemak bebas $2,51 \pm 0,03$ %; bilangan peroksida $2,498 \pm 0,29$ meq/kg; bilangan anisidin $2,34 \pm 0,20$; total oksidasi 8,43; total vitamin E 60161,41 ppm (α -tokoferol 4708,07 ppm; α -tokotrienol 33855,16 ppm; λ -tokotrienol 7712,78 ppm; dan δ -tokotrienol 13885,39 ppm); total fitosterol 487457,32 ppm (β -sitosterol 183455,78 ppm; stigmasterol 333105,92 ppm; dan kampesterol 129879,45 ppm); serta kadar skualen 117,70 ppm. Selain itu juga mengandung asam oleat 59,51%; asam stearat 38,20%; asam miristat 1,66%; serta asam pentadekanoat 0,62%.

Kata Kunci : DALMS, Fitosterol, Saponifikasi, *Supercooling Crystallization*

KHUMAIROH KHOLILA. 166100100111032. Optimization of the 2nd Crystallization on Multistages Supercooling Crystallization for Separation of Phytosterol Rich Fractions from Palm Fatty Acid Distillates.

**Supervisors : 1. Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP
2. Prof. Dr. Ir. Harijono, M.App.Sc**

SUMMARY

Indonesia is the number one of palm producing country in the world. Palm is a source of vegetable oil that can produce the main product in the form of CPO (Crude Palm Oil) and by product called PFAD (Palm Fatty Acid Distillate). PFAD was rich of free fatty acid content and other phytochemical components, which has health benefits such as carotene, vitamin E, phytosterol and squalene. Therefore, a study was conducted on the separation of phytochemical components of PFAD, especially phytosterol-rich fraction using multistages supercooling crystallization techniques. The purpose of this study was determine the optimum condition of the 2nd crystallization process, using Response Surface Methodology (RSM) with two variables, namely the ratio of solvent to crystal (X_1) and crystallization time (X_2) in the second crystallization. While the observed response was the levels of phytosterol-rich fraction (Y) using central composite design (CCD) with quadratic model. The collected data were analyzed using Design Expert 7.0 software. The result of these research showed that the recommended optimum condition for the 2nd crystallization process was to use solvent to crystal ratio of 7,81:1 and the crystallization time of 70,82 hours. The verification showed that these condition can produce 48,74% of phytosterol level with 0,03% of yield. Data was analyzed and showed that the phytosterol-rich fraction sample contain $2,51 \pm 0,03$ % of free fatty acid; $2,498 \pm 0,29$ meq/kg of peroxide number; $2,34 \pm 0,20$ of p-anisidin value; 8,43 of total oxidation; 60161,41 ppm of total vitamin E (α -tocopherol 4708,07 ppm; α -tocotrienol 33855,16 ppm; λ -tocotrienol 7712,78 ppm; and δ -tocotrienol 13885,39 ppm); 487457,32 ppm of total phytosterol (β -sitosterol 183455,78 ppm; stigmasterol 333105,92 ppm; and campesterol 129879,45 ppm), and 117,70 ppm of squalene. In addition, it also contain some of fatty acid such as 59,51% of olein acid, 38,20% of stearic acid, 1,66% of myristic acid, and 0,62% of pentadecanoic acid.

Keywords : PFAD, Phytosterol, Saponification, *Supercooling* Crystallization

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara penghasil minyak sawit terbesar di dunia. Produksi kelapa sawit di Indonesia terus mengalami peningkatan sejak tahun 70-an. Pada tahun 2015 angka produksi kelapa sawit di Indonesia sebesar 31,07 juta ton, kemudian semakin meningkat pada tahun-tahun berikutnya yaitu sebesar 31,49 juta ton (2016); 34,94 juta ton (2017); 42,88 juta ton (2018); dan 48,42 juta ton (2019) dengan luas total area perkebunan kelapa sawit sekitar 14,60 juta ha pada tahun 2019. Perkebunan kelapa sawit tersebut tersebar di kepulauan Riau, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Sumatra Utara, Sumatra Selatan, Sulawesi, serta 22 provinsi lainnya (Badan Pusat Statistik, 2019).

Kelapa sawit merupakan komoditas bernilai ekonomis tinggi karena merupakan salah satu sumber minyak nabati yang banyak dibutuhkan oleh sektor industri diantaranya sebagai minyak masak, minyak industri maupun bahan bakar (biodiesel). Selain dihasilkan produk utama berupa CPO (*Crude Palm Oil*), juga dihasilkan produk samping yang disebut DALMS (Distilat Asam Lemak Minyak Sawit). Gapor *et al.*, (2002) menyebutkan bahwa DALMS kaya akan asam lemak bebas serta beberapa bahan fitokimia lain yang sangat bermanfaat bagi kesehatan seperti tokoferol, tokotrienol, fitosterol dan skualen. Estiasih *et al.*, (2013) juga menyebutkan dalam penelitiannya bahwa DALMS mengandung 85-90 % asam lemak bebas serta senyawa bioaktif lainnya berupa vitamin E (60-200 ppm), fitosterol (400-7500 ppm), dan skualen (400-2800 ppm).

Fitosterol merupakan salah satu komponen fitokimia penting dari DALMS. Fitosterol mampu menurunkan kadar kolesterol darah dan meningkatkan kadar kolesterol feses dengan mengganggu penyerapan pada usus (Stock, 2014) serta meningkatkan kadar asam empedu feses (Parker *et al.*, 2013). Fitosterol tergolong kelompok steroid alkohol yang tidak dapat ditemukan pada mamalia melainkan ada secara alami pada tumbuhan seperti minyak mentah dari biji-bijian, kacang-kacangan dan polong-polongan. DALMS sebagai produk samping pemurnian minyak sawit mempunyai kandungan fitosterol lebih tinggi yaitu 0,37% dibandingkan dengan beberapa sumber fitosterol lain seperti minyak bunga matahari (0,12-0,15%) dan minyak zaitun (0,15-0,17%) (Oktafa, 2015). Meskipun demikian, DALMS ini masih kurang dimanfaatkan sebagai sumber senyawa bioaktif. Selama ini DALMS hanya dimanfaatkan sebagai sumber asam lemak dalam industri pembuatan sabun, lilin, kosmetik, emulsifier,

maupun campuran untuk pakan hewan (Ping dan Yusof, 2009). Oleh karena itu peneliti bermaksud untuk melakukan separasi senyawa fitosterol dari DALMS sehingga dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan farmasi.

Beberapa teknik separasi atau pemisahan yang telah banyak dilakukan antara lain adalah teknik pemisahan dengan pelarut seperti ekstraksi soxhlet (Sahriawati, 2016), teknik pemisahan *Supercritical Fluid Extraction* (SFE) menggunakan fluida superkritis berupa CO₂ (Garcia et al., 2017) serta teknik pemisahan menggunakan mikroba strain tertentu (Han et al., 2018). Teknik pemisahan dengan pelarut pada umumnya menggunakan suhu tinggi yaitu 70-80°C. Penggunaan suhu tinggi dikhawatirkan dapat merusak komponen bioaktif dalam bahan. Sedangkan teknik pemisahan dengan SFE maupun mikroba masih terbilang mahal, lebih sulit dalam sistem operasionalnya serta biasa digunakan dalam industri-industri besar. Oleh karena itu teknik pemisahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah teknik pemisahan dengan kristalisasi pelarut pada suhu rendah. Berbeda dengan teknik kristalisasi pada proses pembuatan garam ataupun gula yang memanfaatkan tingkat kejenuhan senyawa (Santoso, 2015), teknik ini justru memanfaatkan titik beku senyawa yang akan dipisahkan.

Menurut Gapor et al., (2002), fitosterol dapat dipisahkan dari fraksi lain melalui teknik kristalisasi. Hal ini disebabkan karena fitosterol dapat mengkristal pada suhu tertentu. Teknik kristalisasi ini dilakukan pada suhu rendah sehingga disebut juga kristalisasi lewat dingin (*supercooling crystallization*) yang memanfaatkan perbedaan titik beku dari masing-masing komponen yang ingin dipisahkan. Tujuannya adalah untuk memisahkan fraksi kaya fitosterol (FKF) dengan senyawa pengotor lain. Keuntungan dari teknik ini adalah proses yang sederhana, ramah lingkungan, serta dapat mencegah kerusakan komponen yang sensitif terhadap panas. Ahmadi dan Estiasih (2011) telah melakukan penelitian tentang optimasi kristalisasi fraksi tak tersabunkan untuk memperoleh fraksi kaya tokotrienol (FKT). Dalam penelitian tersebut disebutkan bahwa tokotrienol diduga memiliki titik beku yang lebih rendah dibandingkan tokoferol karena sifatnya yang lebih tidak jenuh. Perbedaan kejenuhan tersebut juga mengakibatkan sedikit perbedaan polaritas. Hal inilah yang menjadi dasar penerapan metode kristalisasi dalam separasi kedua komponen tersebut.

Hasil penelitian membuktikan FKT ditemukan terdapat dalam fraksi cair larutan sedangkan dalam fraksi padatnya diduga mengandung FKF serta sedikit

tokoferol. Oleh karena itu perlu dilakukan rekristalisasi atau metode kristalisasi bertingkat menggunakan suhu yang berbeda untuk memisahkan FKF dengan tokoferol. Menurut Wardhana (2012) rekristalisasi bertujuan untuk meningkatkan kadar fitosterol pada fraksi kristal karena akan melarutkan komponen-komponen yang tidak diinginkan seperti tokotrienol, tokoferol, dan senyawa pengotor lainnya.

Faktor yang mempengaruhi proses kristalisasi pada suhu rendah adalah jenis pelarut, rasio pelarut, suhu, serta lama kristalisasi. Jenis pelarut berhubungan dengan polaritas suatu senyawa yang ingin diekstrak. Vogel (1978) menyatakan bahwa kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut dalam pelarut polar sebaliknya senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar. Faktor rasio berhubungan dengan viskositas larutan. Menurut Krishnamurthy dan Kellens (1995), semakin tinggi viskositas suatu sistem, maka pertukaran bahan antara larutan dengan permukaan kristal akan semakin sulit sehingga pertumbuhan kristal akan terhambat. Sedangkan faktor suhu didasari atas perbedaan titik leleh atau titik beku antar senyawa yang ingin dipisahkan.

Wardhana (2012), menemukan bahwa rekristalisasi menggunakan heksana dengan rasio pelarut 8:1 pada suhu 5° C selama 72 jam merupakan perlakuan terbaik untuk mendapatkan FKF dari DALMS, dengan kadar fitosterol sebesar 17,9% (β -sitosterol 10,91%; stigmasterol 5,85%; dan kampesterol 1,14%). Namun kelemahan dari penelitian diatas adalah belum menemukan titik optimum proses karena rancangan percobaannya masih menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Oleh karena itu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan rancangan metode lain untuk menentukan titik optimum rekristalisasi atau kristalisasi ke-II pada proses separasi FKF. Respon Surface Methodology (RSM) merupakan rancangan metode yang dipilih untuk menentukan titik optimum proses dari separasi senyawa fitosterol. Keunggulannya yaitu dapat mengurangi jumlah total percobaan dan mempermudah evaluasi antara interaksi dari banyak parameter. Sehingga dapat menghemat waktu dan tenaga dibandingkan dengan rancangan metode lainnya (Zhu *et al.*, 2010). Faktor yang dipilih dalam penelitian ini adalah rasio pelarut terhadap bahan (X_1) serta lama kristalisasi II (X_2) dengan respon yang dicari adalah kadar fitosterol (Y) yang tertinggi.

1.2 Perumusan Masalah

Fraksi kaya fitosterol (FKF) dalam DALMS merupakan senyawa bioaktif yang masih tercampur dengan senyawa lain yang merupakan pengotor. FKF dan senyawa pengotor mempunyai titik beku (kristalisasi) yang berbeda. Keduanya mungkin dapat dipisahkan dengan cara kristalisasi pada suhu rendah secara bertingkat. Belum diketahui berapa rasio pelarut dan lama kristalisasi ke-II yang optimum untuk pemisahan kedua komponen tersebut. Oleh karena itu disusunlah perumusan masalah sebagai berikut : bagaimana kondisi optimum terkait dengan rasio pelarut terhadap bahan serta lama kristalisasi ke-II pada suhu rendah agar diperoleh FKF dengan kadar fitosterol tertinggi.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum terkait dengan rasio pelarut terhadap bahan serta lama kristalisasi ke-II pada suhu rendah agar diperoleh FKF dengan kadar fitosterol tertinggi.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Pemanfaatan potensi DALMS dari produk samping pengolahan minyak sawit sebagai salah satu sumber senyawa bioaktif yang bermanfaat dalam pencegahan dan pengobatan penyakit tertentu.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang optimasi kondisi kristalisasi bertingkat agar diperoleh FKF dengan kadar fitosterol tertinggi dari DALMS.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelapa Sawit dan Minyak Kelapa Sawit

Kelapa sawit tergolong famili *Arecaceae* dengan sub-famili *Cocoideae*, genus *Elaeis*, dan spesies *E. guineensis* Jacq. Buah kelapa sawit tersusun atas beberapa bagian yaitu perikarp (serabut buah) dan kernel (inti sawit). Perikarp kelapa sawit terdiri dari tiga lapis bagian yaitu epikarp, mesokarp dan endokarp. Epikarp merupakan lapisan paling luar atau kulit buah dengan struktur yang keras dan licin. Mesokarp merupakan bagian buah yang berserabut dan mengandung minyak dengan rendemen tertinggi yaitu rata-rata sebesar 56%. Sedangkan endokarp merupakan lapisan berwarna hitam dan keras serta tidak mengandung minyak. Inti kelapa sawit (kernel) terdiri dari lapisan kulit biji (tesla), endosperm dan embrio. Inti sawit mengandung minyak rata-rata sebesar 44% (Pasaribu, 2004).



Gambar 2.1 Buah Kelapa Sawit: (kiri) belum matang; (tengah) matang; dan (kanan) lewat matang (Shabdin *et al.*, 2016)

Berdasarkan ketebalan tempurung atau cangkangnya, kelapa sawit dibedakan menjadi tiga varietas, yaitu varietas Dura, Pisifera, dan Tenera (Pusat Penelitian Kelapa sawit, 2017).

a. Dura

Varietas ini memiliki cangkang yang cukup tebal yaitu 2-8 mm dan tidak terdapat lingkaran sabut pada bagian luar cangkang. Daging buah relatif tipis yaitu 35-50% terhadap buah. Kernel (daging biji) besar dengan kandungan minyak sedikit. Dalam persilangan, dipakai sebagai pohon induk betina.

b. Pisifera

Varietas ini memiliki ketebalan cangkang yang sangat tipis, bahkan hampir tidak ada. Daging buahnya tebal dibanding varietas Dura sedangkan daging biji sangat tipis. Tidak dapat diperbanyak tanpa menyilangkan dengan jenis/ varietas lain dan dipakai sebagai pohon induk jantan.

c. Tenera

Varietas ini merupakan hasil persilangan antara Dura yang bercangkang tebal dengan Pisifera yang bercangkang tipis. Tempurung tipis (0,5-4 mm) dan terdapat lingkaran serabut di sekeliling tempurungnya. Daging buah sangat tebal (60-96% dari buah). Tandan buah lebih banyak, tetapi ukurannya relatif lebih kecil.

Pusat Penelitian Kelapa sawit (2017) juga telah memproduksi tanaman kelapa sawit yang berstandar internasional sesuai dengan Sistem Manajemen Mutu (ISO 900:2008). Beberapa varietas ini sudah terjamin memiliki mutu yang baik sebagai varietas unggul, yang merupakan hasil persilangan dari Dura, Pisifera, Tenera maupun turunannya.

a. Varietas Dy x P Sungai Pancur 1 (DUMPY)

Varietas Dy x P Sungai Pancur 1 atau yang lebih dikenal sebagai Varietas Dumpy merupakan varietas kelapa sawit dengan keunggulan spesifik laju pertumbuhan meninggi lambat (40-55 cm/ tahun) dan rerata bobot tandan yang tinggi. Dengan karakter pertumbuhan yang lambat, varietas Dumpy mampu mencapai umur produksi hingga 30 tahun, lebih lama dari varietas lain. Varietas ini merupakan hasil persilangan antara Dura Dumpy dengan Pisifera turunan SP540. Dura dumpy merupakan mutan dari Dura Deli yang diintroduksi dari Elmina, Malaysia dan hanya dimiliki oleh Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS). Varietas ini memiliki rerata produksi sebesar 25-28 ton TBS/ha/tahun dengan rerata produksi CPO sebesar 6,5-7,3 ton/ha/tahun.

b. Varietas DxP Avros

DxP Avros merupakan varietas hasil seleksi awal pada program pemuliaan di PPKS. Varietas ini menjadi material bahan turunan yang digunakan dalam pengembangan industri kelapa sawit di Indonesia. Varietas ini diperoleh dari hasil persilangan Dura Deli dengan Pisifera turunan SP540T. Varietas DxP Avros memiliki rerata produksi sebesar 24-27 ton TBS/ha/tahun dengan rerata produksi CPO sebesar 5,5-7 ton/ha/tahun.

c. Varietas DxP Simalungun

Varietas DxP Simalungun merupakan hasil perbaikan dan rekombinasi dari tetua-tetua terbaik pada program pemuliaan Reciprocal Recurrent Selection (RRS). Sebagai material induk digunakan Dura Deli terbaik sebagai induk betina sedangkan untuk induk jantannya digunakan Pisifera keturunan SP. 540 murni.

Varietas ini memiliki rerata produksi sebesar 28,4 ton/ha/tahun dengan potensi produksi CPO sebesar 7,53 ton/ha/tahun.

d. Varietas DxP PPKS 540

Varietas DxP PPKS 540 merupakan varietas yang dihasilkan dari persilangan antara Dura Deli PA 131 D self /TI 221 D X GB 30 D dengan tetua unggulan SP540T murni. Karakter unggulan dari varietas ini adalah quick starter dan persentase mesokarp per buah yang sangat tinggi 83-90%. Rerata produksi varietas ini adalah sebesar 28,1 ton TBS/ha/tahun dengan potensi produksi CPO mencapai 8-9 ton/ha/tahun. Dengan daya adaptasi yang luas, varietas ini dapat ditanam di berbagai tipe lahan mulai dari areal datar hingga bergelombang.

e. Varietas DxP Langkat

Varietas DxP Langkat merupakan varietas pertama yang dirakit PPKS dari hasil rekombinasi tetua Pisifera SP540, Yangambi dan Marihat, disilangkan dengan Dura Deli terbaik. Karakter unggul yang dimiliki varietas ini adalah pelepah yang relatif pendek (compact palm), cocok ditanam di areal bergelombang dan berbukit, serta dapat mulai berbuah pada umur 22 bulan setelah tanam. Varietas ini memiliki rerata produksi sebesar 27,5 ton TBS/ha/tahun dengan rerata produksi CPO sebesar 7,23 ton/ha/tahun.

f. Varietas DxP Yangambi

Varietas DxP Yangambi merupakan salah satu generasi pertama dari beberapa varietas kelapa sawit yang dihasilkan PPKS pada periode 1980. Varietas ini memiliki potensi CPO dan PKO yang tinggi. Petani umumnya menyukai DxP Yangambi karena rerata bobot tandan yang besar. Rerata produksi varietas DxP Yangambi adalah sebesar 25-28 ton TBS/ha/tahun dengan potensi produksi CPO sebesar 5,8-7,3 ton/ha/tahun.

g. Varietas DxP PPKS 239

Varietas ini merupakan hasil persilangan khusus antara Dura turunan DA128D x LM270D dengan Pisifera turunan LM239T self. Varietas ini memiliki keunggulan dalam produksi CPO dan PKO serta mampu menghasilkan TBS yang tinggi sekitar 32 ton/ha/tahun, baik pada usia muda maupun dewasa. Rerata produksi CPO dari varietas ini sebesar 8,4 ton/ha/tahun sedangkan rerata produksi PKO adalah sebesar 1,3 ton/ha/tahun. Oleh karena itu varietas DxP PPKS 239 ini dapat dijadikan alternatif bagi pekebun yang ingin mendapatkan total economic value yang baik dari kedua jenis minyak yang dihasilkan.

h. Varietas DxP PPKS 718

Varietas DxP PPKS 718 merupakan varietas turunan Yangambi yang memiliki karakter bobot tandan yang besar (big bunch), 10% lebih tinggi dari rerata bobot tandan pada umumnya. Rerata bobot tandan pada umur 6-9 tahun sebesar 22,8 kg/ tandan, potensi produksi TBS sebesar 32 ton/ha/tahun dan rerata produksi CPO sebesar 6,9 ton/ha/tahun. Varietas ini merupakan hasil persilangan spesifik antara Dura DA1150 self x LM718T self.

i. Varietas DxP 540 NG

Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) telah melakukan rangkaian penelitian sejak 2009 untuk mengidentifikasi dan mengkontruksi bahan tanaman dengan tingkat produktivitas minyak yang tinggi sekaligus memiliki sifat ketahanan terhadap Genoderma. Varietas DxP 540 NG inilah yang kemudian berhasil menunjukkan sifat ketahanan terhadap Genoderma. Frasa "NG" sendiri memiliki arti New Generation for Genoderma. Varietas ini merupakan hasil persilangan dari tetua varietas DxP PPKS SP540T. Selain tahan terhadap Genoderma, varietas ini juga memiliki karakter produksi TBS sebesar 35 ton/ha/tahun dengan produksi minyak sawit yang sangat baik (potensi CPO sebesar 9,6 ton/ha/tahun sedangkan potensi PKO sebesar 0,5 ton/ha/tahun).



Gambar 2.2 Varietas Kelapa Sawit : a) DxP Dumpy; b) DxP Avros; c) DxP Simalungun; d) DxP PPKS 540; e) DxP Langkat; f) DxP Yangambi; g) DxP PPKS 239; h) DxP PPKS 218; i) DxP 540 NG (Pusat Penelitian Kelapa Sawit, 2017)

Kelapa sawit menghasilkan dua jenis minyak, yaitu crude palm oil (CPO) atau minyak sawit mentah serta palm kernel oil (PKO) atau minyak inti sawit.

CPO merupakan minyak yang berasal dari serabut (mesokarp) kelapa sawit, sedangkan PKO berasal dari inti (kernel) kelapa sawit. Perbedaan kedua jenis minyak ini terletak pada kandungan asam lemaknya. Minyak inti sawit mengandung asam kaproat dan asam kaprilat yang tidak terdapat dalam minyak sawit mentah. Perbedaan lainnya adalah adanya pigmen karotenoid yang berwarna kuning merah pada minyak sawit mentah yang tidak terdapat pada minyak inti sawit (Naibaho, 1998).

Minyak sawit bersifat setengah padat pada suhu kamar dengan titik cair antara 40-70°C serta berwarna kuning jingga. Minyak sawit dibedakan menjadi dua fraksi berdasarkan titik cairnya, yaitu fraksi olein berbentuk cair serta fraksi stearin berbentuk padat pada suhu kamar (Muchtadi, 1992). Minyak sawit memiliki bau yang khas, disebabkan karena adanya senyawa β -ionone. Bau ini akan semakin kuat jika asam-asam lemak rantai pendek dalam minyak sawit teroksidasi (Ketaren, 2005). Minyak sawit dapat dimanfaatkan di berbagai industri seperti industri pangan, farmasi dan kosmetik karena memiliki susunan dan kandungan gizi yang cukup lengkap. Minyak sawit juga telah dikembangkan sebagai salah satu bahan bakar atau biodiesel. Minyak sawit yang digunakan sebagai produk pangan dihasilkan dari minyak sawit maupun minyak inti sawit melalui proses fraksinasi, rafinasi, dan hidrogenasi. Produksi CPO Indonesia sebagian besar difraksinasi sehingga dihasilkan fraksi olein cair dan fraksi stearin padat. Fraksi olein tersebut digunakan untuk memenuhi kebutuhan domestik sebagai pelengkap minyak goreng dari minyak kelapa (Fauzi *et al.*, 2007).

Adapun cara pemurnian minyak sawit yang biasa dilakukan terdiri dari beberapa tahapan, yaitu:

a. Pengendapan (Degumming)

Pengendapan bertujuan untuk menghilangkan partikel-partikel halus yang tersuspensi atau yang berbentuk koloidal (Winarno, 2002), pemisahan getah lendir yang terdiri dari fosfatida, protein, residu, karbohidrat, resin dan air tanpa mengurangi jumlah asam lemak bebas yang terdapat dalam minyak (Ketaren, 2005). Pemisahan ini dilakukan dengan cara pemanasan uap, pemberian asam, hidrasi, pemberian adsorben dan sentrifugasi (Winarno, 2002).

b. Netralisasi

Netralisasi merupakan suatu proses untuk memisahkan asam lemak bebas dari minyak dengan cara mereaksikan asam lemak bebas dengan basa atau pereaksi lainnya sehingga membentuk sabun (Ketaren, 2005). Lemak dengan kandungan asam lemak bebas tinggi dipisahkan menggunakan uap panas dalam kondisi vakum, selanjutnya ditambahkan alkali. Sedangkan lemak dengan kandungan asam lemak bebas rendah cukup ditambahkan NaOH atau garam Na_2CO_3 sehingga asam lemak akan terikut pada fraksi cair dan terpisah dari lemak (Buckle *et al.*, 1987).

c. Pemucatan (Bleaching)

Pemucatan adalah suatu tahapan proses pemurnian minyak untuk menghilangkan zat-zat warna yang tidak disukai dalam minyak. Pemucatan dilakukan dengan mencampur minyak dengan adsorben seperti tanah serap, arang aktif dan lempung aktif atau menggunakan bahan kimia. Keuntungan lain dari pemucatan adalah menghilangkan peroksida dan hasil lainnya serta membersihkan residu dari sabun dan fosfatida. Warna utama yang diperbaiki adalah merah coklat (karotenoid, xantophil, gosipol) atau warna hijau (klorofil) (Akoh dan David, 1998).

d. Penghilangan Bau (Deodorisasi)

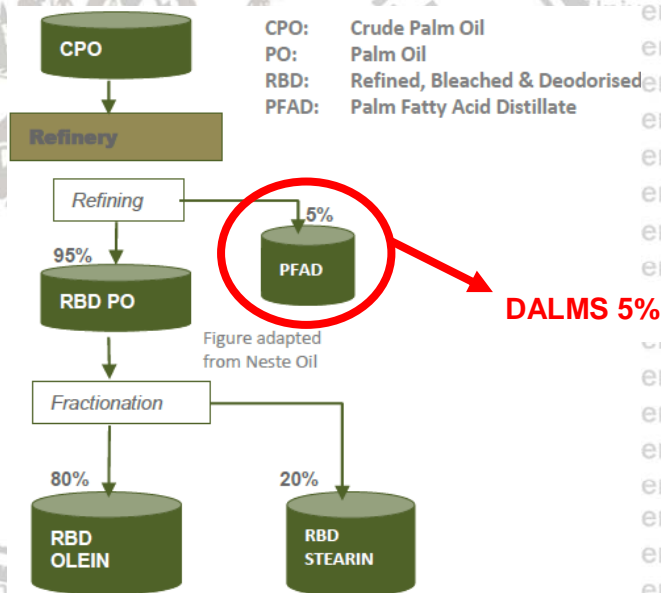
Senyawa volatil yang terbentuk sebelum dan selama pemurnian minyak seperti aldehyd dan keton dapat dihilangkan dengan deodorisasi. Deodorisasi adalah suatu tahap proses pemurnian minyak yang bertujuan untuk menghilangkan bau dan rasa (flavor) yang tidak disukai konsumen. Prinsip deodorisasi adalah penyulingan minyak dan lemak menggunakan uap panas dalam kondisi vakum. Deodorisasi dilakukan dalam botol vakum lalu dipanaskan dengan mengalirkan uap panas yang akan membawa senyawa volatil. Pada akhir proses, lemak dan minyak harus segera didinginkan untuk mencegah kontak dengan oksigen (Winarno, 2002). Pada tahap inilah kemudian akan dihasilkan fraksi tidak tersabunkan (FTT) dari DALMS yang masih mengandung beberapa senyawa fitokimia (Gapor *et al.*, 2002).

2.2 Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS)

Distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) adalah produk samping dari proses pemurnian minyak sawit mentah yang banyak mengandung asam lemak bebas sekitar 80%. Jumlah DALMS yang dihasilkan dari proses pemurnian minyak sawit di Indonesia sangat besar yaitu sekitar 166.000 ton/tahun dan

diprediksikan akan meningkat di tahun mendatang (Christina, 2000). Puah *et al.*, (2009) menyebutkan bahwa pada proses pemurnian fisik, dapat dihasilkan sekitar 5% DALMS dari berat minyak sawit. Sebagai sumber asam lemak, DALMS biasanya dimanfaatkan dalam industri sabun, lilin, kosmetik, maupun campuran untuk pakan hewan. Selain itu dapat juga diaplikasikan dalam pembuatan emulsifier bahan pangan yang dapat membantu mempertahankan kestabilan produk (Ping dan Yusof, 2009).

DALMS merupakan hasil samping dalam tahap *refining* dalam industri pemurnian minyak sawit. Secara keseluruhan proses *refining* akan menghasilkan 73% RBD Olein (*Refine Bleach Deodorization*), 21% stearin, 2,5–5% DALMS, dan 0,5% buangan. DALMS yang dihasilkan dari proses pemurnian fisik diperoleh sebanyak 5% dari berat minyak sawit (Puah *et al.*, 2009). Gapor *et al.* (2002) menyatakan bahwa DALMS yang merupakan *by-product* pemurnian minyak sawit mengandung beberapa bahan fitokimia seperti tokoferol, tokotrienol, fitosterol, skualen, dan hidrokarbon.



Gambar 2.3 Skema Industri Minyak Kelapa Sawit (Rainforest Foundation Norway, 2016)

Menurut Estiasih *et al.*, (2013), DALMS mengandung asam lemak dan gliserida sebagai komponen terbesarnya disertai komponen bioaktif lainnya. Asam lemak dan gliserida dalam DALMS sebanyak 96,1%, senyawa bioaktif seperti tokoferol dan tokotrienol 0,48%, fitosterol 0,37%, skualen 0,76%, dan hidrokarbon lainnya 0,71%. Meskipun demikian, DALMS belum banyak dieksplor mengenai kandungan senyawa bioaktif multikomponen serta manfaatnya

terhadap kesehatan. Sejah ini DALMS hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku sabun, pakan hewan, industri oleochemical seperti lilin dan kosmetik, serta emulsifier (Ping dan Yusof, 2009).

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Distilat Asam Lemak Minyak Sawit

Komponen	Kadar (%)	Kadar (%)
Asam Lemak Bebas	81.70	40
Gliserida	14.40	28.50
Trigliserida	4.10	13.20
Digliserida	7.10	10.50
Monogliserida	2.70	0.30
Sterol	0.37	
Stigmasterol	0.01	
Kampesterol	0.09	
Beta sitosterol	0.21	
Hidrokarbon	1.47	0.50
Skualen	0.76	6.00
Lain-lain	0.71	
Tokoferol dan Tokotrienol	0.48	1.00
Lin-lain	1.60	

Sumber: Zulkifli dan Estiasih (2014)

Tabel 2.2 Komposisi Asam Lemak Bebas dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit

Jenis Asam Lemak Bebas	Kadar (% mol)
Asam palmitat	41.46
Asam Oleat	43.02
Asam Stearat	1.95
Digliserida	6.68
Docenal/ Dodekan-11-al	3.25
Siklotetradekan	3.64

Sumber: Budiastuti *et al.*, (2015)

a. Vitamin E

Vitamin E bersifat hidrofobik sehingga tidak larut air, namun larut pada lemak dan pelarut non polar (Almatsier, 2006). Kelarutan vitamin E dalam lemak merupakan sifat yang menguntungkan karena sebagian besar kerusakan akibat radikal bebas terjadi di dalam membran sel dan lipoprotein yang terbuat dari molekul lemak (Eitenmiller and Lee, 2004). Karena tidak larut air, vitamin E dalam tubuh hanya dapat dicerna dengan bantuan empedu hati, sebagai pengemulsi minyak saat melalui duodenum. Vitamin E stabil terhadap pemanasan namun akan rusak bila pemanasan terlalu tinggi. Sifatnya basa jika tidak ada oksigen dan tidak terpengaruh oleh asam pada suhu 100°C. Bila

terkena oksigen di udara, akan teroksidasi secara perlahan-lahan, sedangkan bila terkena cahaya warnanya akan menjadi gelap secara bertahap (Traber, 1999).

Vitamin E terdiri atas dua kelas substansi aktif biologis yaitu tokoferol dan tokotrienol. Tokoferol dan tokotrienol merupakan antioksidan fenolik yang terdapat secara alami dalam minyak nabati dan berperan menjaga kualitas minyak dengan cara mengakhiri reaksi berantai radikal bebas (Evan *et al.*, 2002).

Tokotrienol memiliki aktivitas antioksidan 15 kali lipat dibanding tokoferol (Podda *et al.*, 1996). Menurut Estiasih *et al.*, (2013), komposisi vitamin E dalam minyak sawit adalah α -tokoferol (20%), α -tokotrienol (22%), γ -tokotrienol (46%) dan δ -tokotrienol (12%).

Tabel 2.3. Kandungan Tokoferol dan Tokotrienol dalam Distilat Asam Lemak Minyak Sawit

Tokoferol / Tokotrienol	Kisaran (ppm)
α -tokoferol	35 – 725
α -tokotrienol	124 – 1.286
γ -tokotrienol	217 – 2.807
δ -tokotrienol	218 – 1.548

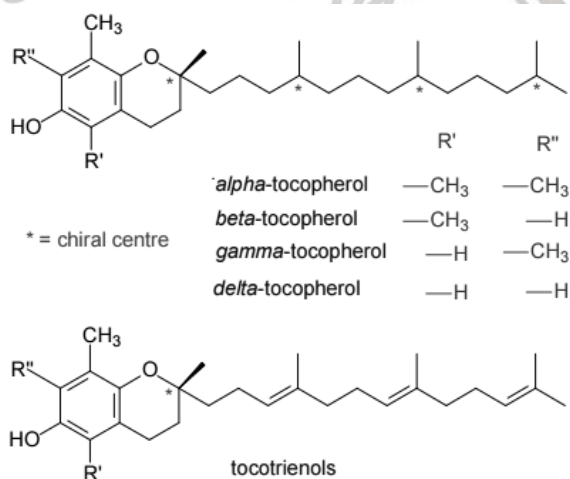
Sumber: Ping and Yusof (2009)

Vitamin E banyak terdapat pada buah-buahan, susu, mentega, telur, sayur-sayuran, terutama kecambah (Youngson, 2005). Selain dapat melindungi tubuh dari radikal bebas, vitamin E juga berfungsi untuk mencegah penyakit hati, mengurangi kelelahan, membantu memperlambat penuaan karena vitamin E berperan dalam suplai oksigen ke darah sampai dengan ke seluruh organ tubuh. Vitamin E juga menguatkan dinding pembuluh kapiler darah dan mencegah kerusakan sel darah akibat racun (Papas, 2008). Vitamin E secara alami memiliki 8 isomer yang dikelompokkan dalam 4 tokoferol dan 4 tokotrienol yang dinyatakan sebagai α , β , δ dan γ yang dibedakan berdasarkan jumlah dan posisi gugus metil (Watkins *et al.*, 2004).

Tokoferol berbentuk cairan yang bersifat transparan, kental, sedikit berbau dan mempunyai warna berkisar dari kuning muda sampai coklat kemerahan. Tokoferol bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik seperti etanol, kloroform, dan heksana. Tokoferol terutama α tokoferol telah diketahui sebagai antioksidan yang mampu mempertahankan integritas

membran. Senyawa tersebut dilaporkan bekerja sebagai scavenger radikal bebas oksigen, peroksidasi lipid, dan oksigen singlet. Berdasarkan jumlah gugus metil pada inti aromatik, dikenal 4 tokoferol yaitu α , β , δ dan γ . Di antara keempat bentuk tokoferol tersebut yang paling aktif adalah α -tokoferol. Oleh sebab itu, aktivitas vitamin E diukur sebagai α tokoferol (Winarsi, 2005).

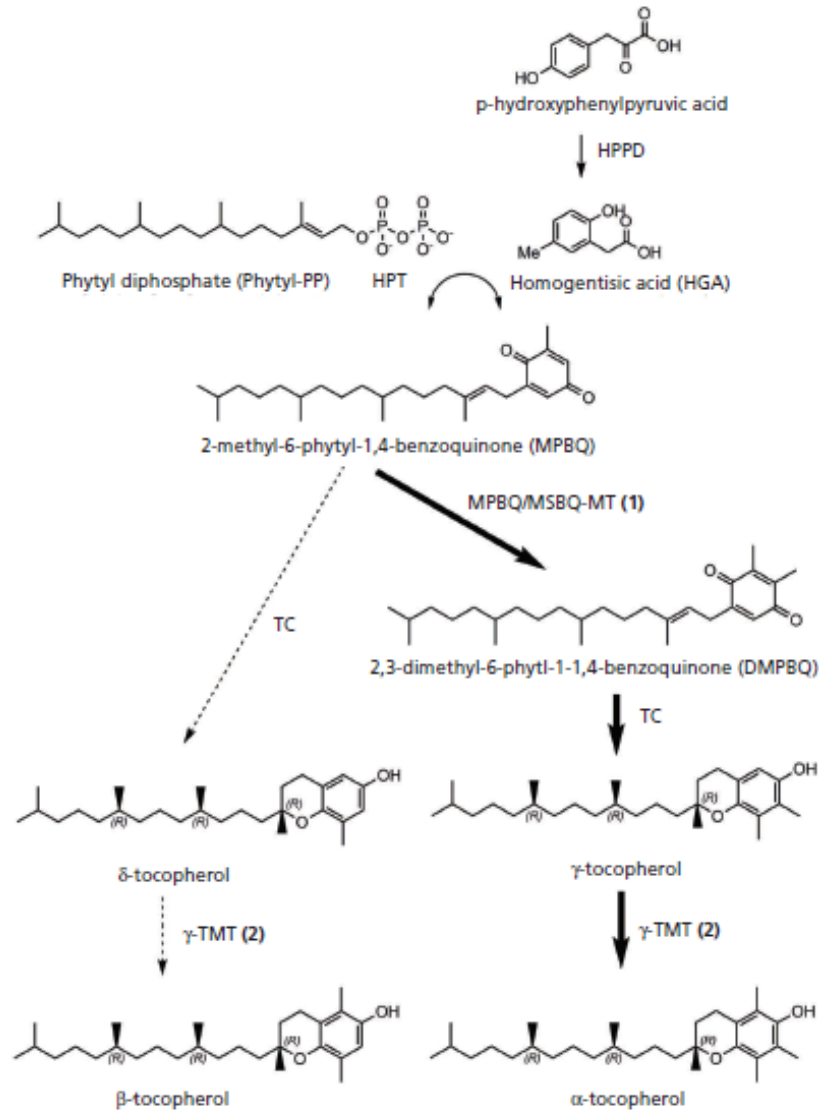
Perbedaan tokoferol dan tokotrienol yaitu pada tokotrienol memiliki tambahan ikatan rangkap pada posisi 3', 7', 11', dengan adanya rantai samping tokotrienol yang tidak jenuh tersebut, menyebabkan penetrasi pada lapisan lemak jenuh pada otak dan hati lebih baik (Zulkifli dan Estiasih, 2014). Tokotrienol merupakan antioksidan ampuh, dapat bekerja cepat 40-60 kali lebih efektif dalam mencegah kerusakan akibat radikal bebas daripada α -tokoferol. Tokotrienol merupakan antioksidan potensial dan lebih efektif dibandingkan tokoferol. Hal ini berkaitan dengan distribusi yang lebih baik pada lapisan berlemak membran sel (Ng *et al.*, 2004).



Gambar 2.4 Struktur Molekul Tokoferol dan Tokotrienol (Christie, 2014)

Tokoferol terbentuk melalui fotosintesis makhluk hidup, seperti tumbuhan, alga serta cyanobacteria. Pada tumbuhan, tokoferol disintesis dan disimpan dalam plastida. Biosintesis tokoferol dimulai dengan reaksi kondensasi senyawa homogentisic acid dan phytyl diphosphate ke dalam bentuk 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone (MPBQ), yang dikatalis oleh enzim homogentisic acid phytyl transferase (HPT). Selanjutnya terjadi reaksi metilasi oleh enzim 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone/ 2-methyl-6-solanyl-1,4-benzoquinone methyltransferase (MBPQ/ MSBQ-MT) menghasilkan senyawa 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone (DMPBQ). MBPQ dan DMPBQ kemudian mengalami siklus reaksi oleh enzim tocopherol cyclase (TC) menjadi δ -tocopherol dan γ -

tocopherol. Selain itu dapat juga mengalami konversi ke dalam bentuk β -tocopherol dan α -tocopherol melalui reaksi metilasi yang dikatalis oleh enzim γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) (Mène-Safrané dan DellaPenna, 2010). Skema biosintesis tokoferol dapat dilihat pada Gambar 2.5 di bawah ini.



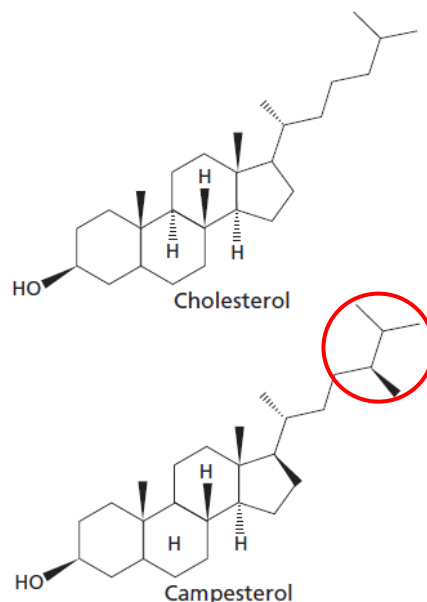
Gambar 2.5 Skema Biosintesis Tokoferol (Mène-Safrané dan DellaPenna, 2010)

α -Tokoferol merupakan komponen terbesar diantara tokoferol lainnya. Jika kandungan α -tokoferol dalam vitamin E bernilai 1.0, maka dapat diasumsikan bahwa kandungan β -tokoferol bernilai 0.5, γ -tokoferol bernilai 0.1, dan δ -tokoferol bernilai 0.01 (Eitenmiller dan Lee, 2004). Oleh karena itu α -tokoferol memiliki nilai fungsional yang lebih tinggi dibanding jenis tokoferol yang lain.

b. Fitosterol

Fitosterol atau sterol tumbuhan merupakan kelompok senyawa steroid yang memiliki manfaat fisiologis baik pada tanaman maupun hewan. Pada tanaman, yang termasuk dalam kelompok ini adalah triterpenoid, brassinosteroid, fitosterol, glikoalkaloid dan saponin. Fitosterol mempunyai fungsi esensial pada sel tanaman yaitu mengatur permeabilitas dan fluiditas membran sel. Selain itu berperan sebagai prekursor biogenetik yang terlibat pada pertumbuhan tanaman seperti brassinosteroid. Fitosterol juga berfungsi sebagai substrat untuk sintesa metabolit sekunder seperti glikoalkaloid dan saponin (Soupas, 2006).

Fitosterol mempunyai struktur yang mirip kolesterol, akan tetapi fitosterol mengandung gugus etil (-CH₂-CH₃) pada rantai cabang atau rantai sampingnya. Pada hewan, kolesterol terdapat dalam bentuk bebas (seperti alkohol) dan sebagian kecil sebagai ester rantai asam lemak panjang. Namun fitosterol memiliki berbagai derivatif lebih beragam pada tanaman. Fitosterol muncul dalam bentuk bebas (free sterols) maupun terkonjugasi, yaitu sebagai ester asam lemak (fatty acid sterols), glikosida steril (steryl glycosides), atau glikosida steril terasilasi (acylated steryl glycosides). Misalnya pada jagung, benih padi, serta beberapa biji-bijian lain juga mengandung fitosterol hidroksinamat-asam ester, dimana sterol yang diesterifikasi untuk ferulic acid atau p-coumaric acid (Soupas, 2006).

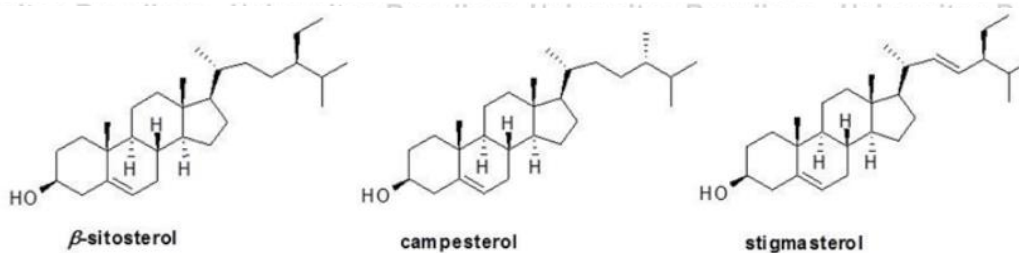


Gambar 2.6 Struktur Kimia Kolesterol dan Campesterol (Velasco dan Ruiz-Méndez, 2015)

Fitosterol yang paling umum dikenal adalah 4-desmethylsterols dengan 28- atau 29- tulang karbon. Sebagian besar fitosterol memiliki ikatan ganda antara C5 dan C6 pada struktur tetracyclic sehingga biasa disebut sebagai Δ^5 -sterols. Senyawa fitosterol lainnya diantaranya adalah Δ^7 -sterols dengan ikatan ganda diantara C7 dan C8, serta $\Delta^{5,22}$ -sterols dengan ikatan ganda diantara C5 dan C6, juga diantara C22 dan C23. Fitosterol yang bersifat jenuh tanpa ikatan ganda disebut fitostanol, namun senyawa ini lebih jarang ditemukan dibandingkan fitosterol. Fitosterol utama pada tumbuhan adalah β -sitosterol (C29, Δ^5), stigmasterol (C29, $\Delta^{5,22}$), dan kampesterol (C28, Δ^5) (Velasco dan Ruiz-Méndez, 2015)

Fitosterol tergolong senyawa kimia yang stabil, memiliki titik lebur yang tinggi, tidak larut air, tetapi larut dalam pelarut non polar seperti heksana, iso-oktana dan 2-propanol (Cantrill, 2008). Setelah dipurifikasi, fitosterol tampak seperti bubuk putih yang berbau khas. Senyawa ini biasanya digunakan sebagai bahan tambahan pangan obat-obatan dan kosmetik. Fitosterol terdiri dari 3 kelas yang sering ditemukan yaitu beta sitosterol, stigmasterol serta kampesterol (Soupas, 2006). Ketiga macam senyawa tersebut terdapat pada beberapa jenis tanaman tinggi. Beberapa jenis sterol tertentu seperti ergosterol, dapat ditemukan pada tanaman tingkat rendah seperti khamir dan jamur yang berfungsi sebagai precursor bagi vitamin D2 (kalsiferol) (Harborne, 1998).

Fitosterol yang terdapat dalam DALMS memiliki konsentrasi yang rendah. Fitosterol utama yang terdapat dalam *vegetable deodorizer distillate* adalah kolesterol, β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol, dan isofukosterol. Komponen ini mencakup bagian besar dari fraksi tidak tersabunkan dalam minyak. Menurut Estiasih *et al.*, (2013), komposisi fitosterol dalam minyak sawit yaitu kampesterol (13%), β -sitosterol (60%), dan stigmasterol (24%). Muharram dan Nur (2009) menyebutkan juga bahwa β -sitosterol memiliki titik leleh sebesar 140°C, stigmasterol dengan titik lelehnya 160-164°C serta kampesterol dengan titik lelehnya 157-158°C.



Gambar 2.7 Struktur Molekul Fitosterol (Suttiarporn *et al.*, 2015)

Phytosterol Content In Various Vegetable Oils			
Sr. no.	Source	Amount present (g/kg)	Reference
1	Crude vegetable oil	1-5	Welhrauch and Gardner, 1978; Pilonen <i>et al.</i> , 2000.
2	Corn oil and rapeseed oil	8-22 and 5-11	Gunstone, 2005
3	Wheat germ and corn germ oil	17-26 and 10.7	Homberg and Bielefeld, 1989
4	Palm oil and coconut oil	0.7-0.8 and 0.7	Verleyn <i>et al.</i> 2002
5	Crude soybean oil	3-4.4	Moreau <i>et al.</i> , 2002

Composition Of Phytosterols In Different Cereals (Mg/Kg)						
Sample	Campesterol	Sitosterol	Stigmasterol	Avenasterol	Stanols	Total
Barley	150-192	437-484	24-36	56-69	17-19	720-801
Buck wheat	93	775	Tr	40	23	963
Corn	--	--	--	--	--	662-1205
Millet	112	371	18	87	ND	770
Oats	32-46	237-321	11-21	15-56	8-9	350-491
Rice	146	375	104	20	32	723
Rye	128-210	358-607	22-37	5-42	122-220	707-1134
Wheat	108-150	288-486	15-24	ND-22	151-171	447-830

Gambar 2.8 Kandungan Senyawa Fitosterol dalam Berbagai Produk Pangan (Chawla dan Nitika, 2014)

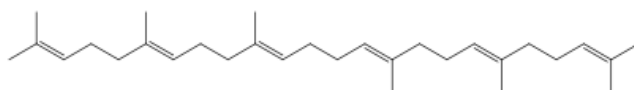
c. Skualen

Skualen merupakan natural lipid yang termasuk dalam kelompok triterpen hidrokarbon (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexane) yang mengandung 6 buah isoprene (Norhidayah *et al.*, 2012). Skualen adalah zat organik berupa cairan encer seperti minyak, namun bukan minyak karena tidak mengandung asam lemak atau gugus COOH, berwarna semu kuning atau putih bening, serta berbau khas (Bhattacharjee dan Singhal, 2003). Skualen terdapat secara alami pada minyak zaitun, minyak sawit, minyak inti gandum, dan minyak sayur lainnya, namun dalam konsentrasi yang lebih rendah.

(Chris, 2005). Menurut Posada *et al.*, (2007), skualen yang terkandung dalam distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) yaitu sebanyak 1,03% (w/w).

Pada manusia, skualen disintesis dalam hati dan kulit, lalu disebarkan ke seluruh jaringan tubuh melalui pembuluh darah 60%. Apabila mengonsumsi skualen, skualen tersebut akan bereaksi dengan cairan tubuh atau air (H₂O) di dalam tubuh. Skualen dapat membantu memenuhi kebutuhan oksigen yang diperlukan pada proses metabolisme sel tubuh karena bereaksi dengan air atau cairan tubuh (Vazquez *et al.*, 2007).

Skualen banyak digunakan dalam bidang farmasi dan kosmetik. Fungsi utama skualen adalah melindungi permukaan kulit dari sinar ultraviolet dan sumber radiasi lainnya. Oleh karena itu, senyawa ini sering digunakan sebagai salah satu komposisi dalam perawatan kulit. Skualen juga menjadi salah satu komposisi dalam suplemen untuk meningkatkan kekebalan tubuh. Selain itu skualen dimanfaatkan sebagai bahan untuk detoksifikasi, antistatic, bactericidal dan fungicidal agent (Bahttachrjee and Shingal, 2003). Skualen juga dapat berperan sebagai antioksidan, anti kanker serta dapat dipergunakan untuk menghambat sintesis kolesterol (Loganathan *et al.*, 2009).



Gambar 2.9 Struktur Molekul Skualen (Huang *et al.*, 2009)

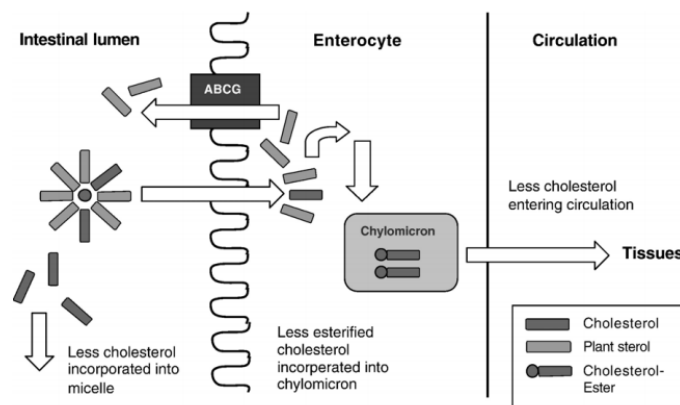
2.3 Peran Fitosterol bagi Kesehatan

Fitosterol merupakan komponen sejenis kolesterol yang ada pada tumbuhan. Struktur kimia fitosterol memiliki kesamaan dengan kolesterol, namun memiliki perbedaan ikatan rangkap pada rantai sampingnya (Rudzinska *et al.*, 2014). Karena kemiripan tersebut, fitosterol dikenal dapat berperan sebagai agen antihiperkolesterolemia. Hiperkolesterolemia ini sendiri merupakan penyakit gangguan metabolisme kolesterol yang ditandai dengan kadar kolesterol dalam darah melebihi batas normal. Hiperkolesterolemia menyebabkan peningkatan kadar LDL (Low Density Lipoprotein) dan LDL teroksidasi. Hiperkolesterolemia terjadi karena adanya penumpukan kolesterol pada pembuluh darah yang akan menghalangi jalan aliran darah, khususnya pada pembuluh darah koroner. Beberapa penyebab dari hiperkolesterolemia yaitu kelainan genetik, perubahan pola makan, kurang olahraga dan stress. Usaha-usaha yang dapat dilakukan untuk menurunkan kolesterol dalam darah yaitu diet, olahraga atau dengan

konsumsi obat-obatan, baik dengan obat-obatan sintetis maupun upaya alternatif memanfaatkan tanaman obat (Oktavia *et al.*, 2018)

Fitosterol memiliki efek hipokolesterolemik yang dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah dengan cara mencegah penyerapan asupan kolesterol dari makanan serta mencegah penyerapan kembali asam empedu di usus. Dalam mekanisme lainnya, fitosterol juga mampu mencegah kolesterol untuk bergabung membentuk misel yang siap di serap dalam tubuh (Boyer, 2005). Menurut Normen *et al.*, (2004) keberadaan fitosterol dan kolesterol secara bersama-sama menyebabkan kedua senyawa ini berkompetisi untuk mendapatkan tempat pada saat pembentukan misel dengan asam empedu.

Mekanisme fitosterol menurunkan kadar kolesterol berkaitan dengan kinerja beberapa gen yang berhubungan dengan transportasi dan absorpsi kolesterol di hati. Fitosterol meningkatkan aktivitas gen *Abcg5* dan *Abcg8* serta menurunkan aktifitas gen *Niemann Pick C1 Like 1 (NPC1L1)*. *Abcg5* dan *Abcg8* bekerja dalam keseimbangan transport kolesterol. Kerusakan pada gen tersebut dapat menyebabkan akumulasi kolesterol dalam jaringan dan ekskresi kolesterol yang rendah. Gen *NPC1L1* merupakan gen yang meningkatkan absorpsi kolesterol ke dalam jaringan. Dengan menurunkan aktifitas gen tersebut, maka akumulasi kolesterol dalam jaringan dapat berkurang (Chen *et al.*, 2009).



Gambar 2.10

Mekanisme Fitosterol sebagai Anti Hiperkolesterolemia (Marinangeli, C.P.F., Varady, K.A., dan Jones, P.J.H., 2006)

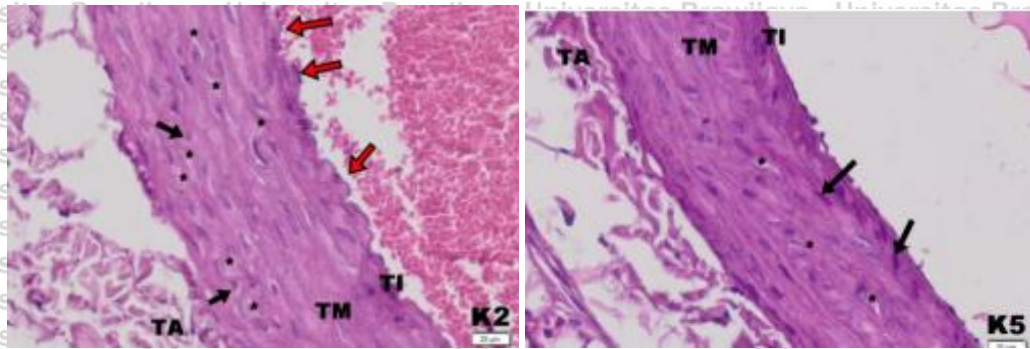
Penelitian tentang fitosterol yang memiliki efek hipokolesterolemik ini pun sudah banyak dilakukan. Salah satunya dalam penelitian *in vivo* oleh Aweisheh *et al.*, (2013). Peneliti mengkaji efek pemberian fitosterol pada tikus

yang telah diberikan diet tinggi lemak. Pemberian fitosterol sebanyak 25 mg/hari pada tikus menghasilkan kadar total kolesterol, LDL dan trigliserida darah yang lebih rendah dibanding tikus tanpa penambahan fitosterol. Kadar total kolesterol lebih rendah 21,6%, LDL lebih rendah 25,1% dan kadar trigliserida lebih rendah 17,1% dari pada tikus tanpa pemberian fitosterol. Dalam usus fitosterol dan kolesterol akan berkompetisi untuk diabsorpsi. Fitosterol akan menggantikan kolesterol pada proses pembentukan misel dengan garam empedu.

Selain secara *in vivo*, pernah juga dilakukan penelitian secara *in vitro* pada sel Caco-2 sebagai gambaran sel usus serta sel HepG2 sebagai gambaran sel hati untuk melihat efek fitosterol dalam menghambat absorpsi kolesterol di usus dan hati. Efek hipokolesterolemik dilihat dari sisi molekuler dimana diduga fitosterol menghambat ekspresi gen tertentu yang berpengaruh dalam penyerapan kolesterol. Fitosterol menurunkan ekspresi gen NPC1L1 dan SR-B1 yang keduanya berperan dalam proses transportasi kolesterol baik di usus maupun di hati yang akhirnya menyebabkan rendahnya absorpsi kolesterol (Park dan Carr, 2013).

Penelitian lainnya tentang fortifikasi fitosterol dalam berbagai produk makanan serta efeknya terhadap kesehatan pun telah dilakukan. Wulansari (2017) melakukan penelitian *in vivo* dengan cara menambahkan senyawa fitosterol kedalam tiga produk pangan yaitu mie instan, roti tawar dan biskuit, yang kemudian diberikan pada tikus hiperkolesterolemia. Hasil penelitian membuktikan bahwa kadar total kolesterol pada tikus hiperkolesterolemia mengalami penurunan sebesar 48,45%, trigliserida menurun sebanyak 40,90%, LDL menurun sebanyak 57,64%, serta HDL mengalami peningkatan sebesar 186,76% pada kelompok tikus hiperkolesterolemia yang diberi pakan roti tawar.

Ahmadi *et al.*, (2017) juga memaparkan bahwa fortifikasi FTT yang mengandung fitosterol dan vitamin E dalam produk pangan dapat menghambat pengembangan plak aterosklerosis serta membantu memperbaiki sel-sel aorta yang telah rusak pada tikus hiperkolesterolemia. Dalam hal ini senyawa bioaktif tersebut bekerja aktif untuk mengurangi pengembangan sel busa, mengurangi akumulasi lemak, serta meningkatkan performa morfologi dinding aorta meliputi *tunica intima* (TI), *tunica media* (TM), dan *tunica adventitia* (TA). Hal ini dapat dilihat pada gambar histopatologi aorta tikus hiperkolesterolemia di bawah ini.



Gambar 2.11. Histopatologi aorta tikus hiperkolesterolemia yang diberi makan mie instan tanpa fortifikasi senyawa bioaktif (K2) dan tikus hiperkolesterolemia yang diberi makan mie instan dengan fortifikasi senyawa bioaktif (K5) (Ahmadi et al., 2017)

Fitosterol juga dikenal dapat mengurangi resiko penyakit kanker, terutama beta-sitosterol yang mampu melindungi tubuh dari kanker kolon, kanker prostat, dan kanker payudara. Hasil penelitian *in vivo* membuktikan bahwa fitosterol mampu menurunkan ukuran sel-sel tumor pada tikus sebanyak 33% setelah 8 minggu. Selain itu juga terjadi penurunan metastasis sebanyak 20% pada *lymph nodes* dan paru-paru tikus, serta terjadi penurunan berat tumor. Hal ini membuktikan bahwa diet fitosterol dapat memperlambat pertumbuhan dan penyebaran sel tumor atau kanker. Senyawa fitosterol juga dapat mengubah sinyal transduksi pada jalur metabolisme pertumbuhan tumor serta menstimulasi terjadinya mekanisme apoptosis. Selain itu dapat pula meningkatkan produksi sel limfosit dan sel T dalam jaringan perifer, yang mana akan memungkinkan stimulasi kerja sel-sel imun menjadi lebih baik (Jones dan Suhad, 2009).

2.4 Separasi Fitosterol

Separasi atau ekstraksi fitosterol telah banyak dilakukan dengan beragam metode. Hal ini dikarenakan fitosterol merupakan senyawa yang mudah dijumpai pada tumbuhan tingkat tinggi serta memiliki manfaat yang baik bagi kesehatan. Namun yang paling banyak dilakukan adalah metode Cantrill (2008) memaparkan bahwa separasi fitosterol dapat dilakukan dengan cara ekstraksi, distilasi dan kristalisasi. Fitosterol murni dapat diperoleh dari minyak yang disaponifikasi dengan soda kaustik *food grade* untuk menghidrolisis ester fitosterol dan menyabunkan asam lemak. Campuran tersebut kemudian dinetralkan dengan asam mineral *food grade* (seperti asam sulfat, asam klorida atau asam fosfat). Setelah itu, fraksi cair dihilangkan dan air yang masih tersisa dihilangkan dengan penguapan. Sisa pemekatan didistilasi dengan beberapa

langkah untuk memulihkan fraksi fitosterol. Fraksi ini akhirnya dimurnikan melalui kristalisasi pelarut menggunakan pelarut *food grade*.

Muharram dan Nur (2009) melakukan separasi senyawa sterol yang diduga fitosterol pada daun meniran hijau (*Phyllanthus niruri L.*) meliputi empat tahapan, yaitu ekstraksi, fraksinasi, pemurnian dan identifikasi.

a. Ekstraksi secara Maserasi

Serbuk halus daun meniran hijau (1,5 kg) dimaserasi dengan n-heksana selama 1x48 jam. Pada hari ketiga, ekstrak dikeluarkan dan residu dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama. Prosedur ini dilakukan hingga hasil perendaman terakhir tidak berarti lagi kandungan kimianya. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan cara destilasi hingga diperoleh ekstrak kental (74,8 g).

b. Fraksinasi

Sebelum difraksinasi, ekstrak tersebut dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan jenis pelarut yang sesuai pada kromatografi kolom cair vakum dan untuk mengetahui jumlah komponen kandungan kimianya. Dari hasil analisis KLT tersebut diperoleh eluen etilasetat : heksan (2:8). Cairan kental yang terdiri dari beberapa komponen tersebut difraksinasi dengan metode kromatografi kolom cair vakum menggunakan silika gel G 60 sebagai fase diam, sedangkan eluennya dimulai dari n-heksana yang ditingkatkan kepolarannya secara bergradien dengan etilasetat sebagai fase gerak. Volume setiap sistem eluen yang digunakan adalah 100 mL.

Dari hasil fraksinasi ini, diperoleh 29 fraksi. Hasil fraksinasi dianalisis dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen etilasetat : heksan (2:8). Fraksi-fraksi dengan kromatogram yang sama digabung dan diuapkan pelarutnya yang kemudian diuji dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Fraksi 16-18 setelah digabung dan diuapkan pelarutnya, diperoleh padatan berwarna hijau (0,28 g). Padatan ini difraksinasi kembali dengan kromatografi kolom flash menggunakan adsorben silika gel G 60 GF254 sebagai fase diam dan eluennya dimulai dari etilasetat : heksan (1:9) dan ditingkatkan kepolarannya secara bergradien sebagai fase gerak. Volume yang digunakan pada setiap sistem eluen adalah 50 mL. Dari hasil fraksinasi ini diperoleh 34 fraksi.

c. Pemurnian

Fraksi 22 dan 23 hasil fraksinasi ulang digabung kemudian diuapkan pelarutnya. Selanjutnya direkristalisasi dengan n-heksana, sehingga diperoleh kristal sebanyak 20 mg.

d. Identifikasi

Kristal yang diperoleh diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis dan ditentukan titik lelehnya. Selanjutnya, diidentifikasi dengan pereaksi LiebermannBurchard.

Novrianto *et al.*, (2016) melakukan ekstraksi senyawa fitosterol dari daun soma (*Ploiarium alternifolium Melch*) menggunakan metode sokhletasi.

Metode sokhletasi merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang relatif baru serta menggunakan alat khusus berupa sokhlet. Pada metode ini digunakan teknik pemanasan untuk menguapkan pelarut. Suhu pemanasan akan bergantung pada titik didih pelarut. Setelah pelarut diuapkan, pelarut akan terkondensasi akibat kontak dengan suhu dingin yang berasal dari pendingin balik kemudian kembali turun ke sampel. Dalam prosedur pelaksanaannya, sebanyak 2 kg sampel daun soma dikeringkan, dihaluskan, lalu dimasukkan kedalam kertas saring sebanyak 45 g. Kertas saring yang berisi sampel tersebut dimasukkan ke dalam sokhlet, lalu proses sokletasi segera dimulai menggunakan pelarut n-heksana. Hasil sokletasi kemudian dievaporasi pada suhu sekitar 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental sebanyak 20 g. Ekstrak kental tersebut diuji skrining fitokimia dan KLT dengan perbandingan eluen tertentu antara n-heksana dengan etil asetat.

Dalam proses separasi fitosterol, baik itu menggunakan metode kristalisasi ataupun sokhletasi dibutuhkan pelarut untuk melarutkan senyawa yang ingin dipisahkan/ diekstrak. Pelarut adalah zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan atau mengekstrak zat lain. Keberhasilan ekstraksi salah satunya bergantung pada jenis pelarut yang digunakan (Ncube *et al.*, 2008). Pemilihan pelarut juga akan bergantung pada senyawa yang ditargetkan. Faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan pelarut diantaranya adalah jumlah senyawa yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, keragaman senyawa yang akan diekstraksi, kemudahan dalam penanganan ekstrak untuk perlakuan berikutnya, toksisitas pelarut serta potensibahaya kesehatan dari pelarut (Tiwari *et al.*, 2011).

Metode ekstraksi dan penetapan sterol tanaman oleh Diack dan Saska (1994) menggunakan kombinasi pelarut etanol dan heksan. Etanol digunakan

untuk mengekstrak sterol, sedangkan heksana digunakan untuk memisahkan bagian yang tidak tersabunkan. Metode lain yang digunakan oleh Ham *et al.*, (2000) adalah menggunakan kombinasi etanol dan petroleum eter, sedangkan Andayani (2003) menggunakan etanol saja. Petroleum eter merupakan bahan kimia yang berbahaya bagi kesehatan manusia apabila masih tertinggal di dalam produk. Selain itu petroleum eter tidak tersedia dalam bentuk teknis sehingga penggunaannya mahal (Marliyati *et al.*, 2005).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Wardhana (2012), perlakuan terbaik untuk mendapatkan fraksi kaya fitosterol adalah menggunakan pelarut heksana. Hal ini disebabkan karena pelarut ini mampu mengikat senyawa-senyawa pengotor nonpolar seperti tokoferol dan tokotrienol dibandingkan dengan pelarut etanol dan isopropanol. Heksana merupakan senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} (isomer utama n-heksana memiliki rumus $CH_3(CH_2)_4CH_3$). Seluruh isomer heksana sangat tidak reaktif dan sering digunakan sebagai pelarut organik inert. Senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut air. Adapun karakteristik heksana dapat dilihat dalam tabel berikut ini.

Tabel 2.4 Karakteristik Heksana

Kategori	Sifat
Struktur Kimia	$CH_3(CH_2)_4CH_3$
Titik Didih (°C)	69°C
Titik Beku (°C)	-95.3°C
Momen Dipol	0.08 D pada 25°C
Konstanta Dielektrik	1.88 pada 25°C
Kelarutan dalam Air	0.014% pada 20°C
Berat Molekul	86.18

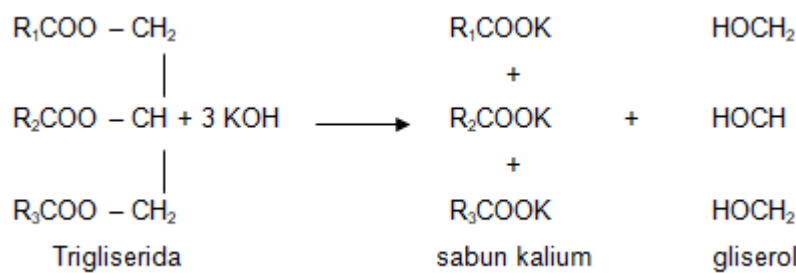
Sumber: Wardhana (2012)

2.5 Saponifikasi

Saponifikasi atau penyabunan adalah reaksi hidrolisis asam lemak oleh adanya basa misalnya KOH atau NaOH. Saponifikasi dapat dilakukan dengan cara mereaksikan minyak dengan KOH dalam etanol dan air. Saponifikasi bertujuan untuk memisahkan asam lemak dengan fraksi tidak tersabunkan yang terdapat di dalam minyak seperti sterol, zat warna dan hidrokarbon. Pemisahan fraksi tidak tersabunkan dari minyak dilakukan dengan menambahkan heksana kemudian lapisan atas yang mengandung fraksi tersabunkan dibuang. Penambahan NaOH pada proses penyabunan harus dalam jumlah yang tepat.

Apabila jumlah NaOH yang ditambahkan terlalu sedikit maka sabun yang dihasilkan akan mengandung asam lemak bebas yang tinggi. Sebaliknya jika terlalu banyak maka alkali bebas yang tidak berikatan dengan trigliserida atau asam lemak semakin tinggi (Estiasih 1996).

Sabun adalah alkali karboksilat (RCOOK) dimana gugus R bersifat hidrofobik karena bersifat nonpolar dan COOK bersifat hidrofilik karena bersifat polar. Bagian nonpolar akan larut dalam minyak, sedangkan bagian polar akan larut dalam air. Asam lemak dapat diperoleh kembali dengan cara mereaksikan dengan HCl. Menurut Pasaribu (2004), proses penyabunan dapat menghilangkan beberapa senyawa trigliserida kecuali beberapa senyawa yang tidak tersabunkan, disebut fraksi tidak tersabunkan (FTT). Fraksi tidak tersabunkan adalah senyawa-senyawa yang larut dalam minyak tetapi tidak dapat disabunkan dengan soda alkali. Komponen tidak tersabunkan terdiri dari alkohol suhu tinggi, sterol, zat warna, dan hidrokarbon (Ketaren, 2005).



Gambar 2.12 Reaksi Kimia Proses Saponifikasi (Ketaren, 2005)

Ahmadi *et al.*, (2012) melakukan saponifikasi dengan cara mereaksikan distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) dengan KOH 40% pada suhu pemanasan 69,1°C selama 38 menit. Fraksi tidak tersabunkan yang dihasilkan mengandung vitamin E sebanyak 20,13% (w/w). Sementara itu menurut Silangen (2014), saponifikasi DALMS dilakukan dengan dua perlakuan yang berbeda yaitu suhu pemanasan 60°C dan 70°C dengan waktu dan konsentrasi KOH yang sama yaitu waktu 30 menit dan KOH 2M. Hasil dari perlakuan tersebut menunjukkan adanya perbedaan jumlah fraksi tidak tersabunkan (FTT) yang dihasilkan. Pada suhu 60°C fraksi tidak tersabunkan yang dihasilkan yaitu 75,3%, sedangkan pada suhu 70°C fraksi tidak tersabunkan yang dihasilkan yaitu 85,25%. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dapat berpengaruh terhadap hasil dari proses saponifikasi. Suhu yang rendah akan memberikan hasil yang kurang baik karena tidak cukup panas untuk terjadinya reaksi.

Proses pemisahan FTT dari DALMS dapat mengacu pada penelitian yang telah dilakukan Estiasih *et al.*, (2013). Peneliti menggunakan 10 g DALMS dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml dengan menggunakan tutup karet. Selanjutnya ditambahkan etanol 188,3 ml, asam askorbat 0,5 g dan larutan KOH 50% (b/v). Campuran tersebut kemudian dikocok dan dipanaskan dengan suhu 65°C selama 32 menit dalam shaker waterbath. Setelah itu ditambahkan 150 ml heksan dan air distilat sebanyak 200 ml dan diaduk secara perlahan. Campuran tersebut dibiarkan memisah dalam corong pisah selama kurang lebih satu jam pada suhu ruang. Lapisan bawah yang encer merupakan Fraksi Tersabunkan (FT) sementara lapisan heksan di bagian atas merupakan Fraksi Tidak Tersabunkan (FTT). Selanjutnya FTT diambil dan dievaporasi dengan evaporator vakum untuk menghasilkan FTT yang telah bebas dari pelarut.

Tabel 2.5 Perbandingan Komponen Fitokimia Distilat Asam Lemak Minyak Sawit dan Fraksi Tidak Tersabunkan

Senyawa Fitokimia	DALMS		FTT	
	Ppm	%	Ppm	%
Vitamin E	47,68 ± 517	4,77	342,37 ± 6.095	34,24
α tokoferol	775 ± 86	0,08	7,49 ± 234	0,75
α tokotrienol	10,79 ± 101	1,08	166,70 ± 4.576	16,67
δ tokotrienol	1,91 ± 98	0,19	32,12 ± 287	3,21
γ tokotrienol	34,20 ± 232	3,42	136,06 ± 998	13,61
Total tokotrienol	46,91 ± 431	4,69	334,88 ± 5.861	33,49
Fitosterol	64,64 ± 229	0,65	154,76 ± 1.175	15,48
β sitosterol	1,95 ± 67	0,20	78,51 ± 456	7,85
Stigmasterol	1,51 ± 28	0,15	5,25 ± 65	0,53
Kampesterol	2,99 ± 134	0,30	70,99 ± 654	7,10
Skualen	1,41 ± 347	0,14	2,10 ± 487	2,10

Sumber: Estiasih *et al.*, (2012)

FTT dari hasil saponifikasi kemudian dimanfaatkan sebagai sumber vitamin E (tokoferol dan tokotrienol), fitosterol, skualen, pigmen, dan senyawa hidrokarbon lainnya. Estiasih *et al.*, (2014) menyebutkan bahwa kandungan fitosterol dalam FTT sebanyak 0,55% atau 5.5 mg/g, artinya dalam 1 g FTT mengandung 5.5 mg fitosterol. Konsentrasi tersebut adalah yang paling rendah dibanding konsentrasi senyawa bioaktif lainnya seperti vitamin E (1.96%) dan skualen (32.30%). Walaupun demikian senyawa tersebut memiliki efek hipokolesterolemik sehingga dapat mencegah penyerapan kolesterol berlebih.

2.6 Kristalisasi Pada Suhu Rendah

Kristalisasi merupakan teknik pemisahan kimia antara bahan padat-cair, dimana terjadi perpindahan massa (mass transfer) dari suatu zat terlarut (solute) dari cairan larutan ke fraksi kristal yang padat. Pemisahan secara kristalisasi dilakukan untuk memisahkan zat padat dari larutannya dengan jalan menguapkan pelarutnya. Zat padat tersebut dalam keadaan lewat jenuh akan bentuk kristal. Kristal kristal dapat terbentuk bila uap dari partikel yang sedang mengalami sublimasi menjadi dingin. Selama proses kristalisasi, hanya partikel murni yang akan mengkristal. Pemisahan dengan teknik kristalisasi ini, didasari atas pelepasan pelarut dari zat terlarutnya dalam sebuah campuran homogen atau larutan, sehingga terbentuk kristal dari zat terlarutnya. Proses ini adalah salah satu teknik pemisahan padat-cair yang sangat penting dalam industri, karena dapat menghasilkan kemurnian produk hingga 100%.

Kristalisasi merupakan proses transfer massa dan transfer panas, dimana solute akan mendifusi dari larutan dan terkristalkan di permukaan layer demi layer. Kristalisasi dilakukan dengan cara proses pendinginan secara bertahap misalnya dari 90°C didinginkan hingga 30°C, kemudian didinginkan kembali pada suhu 25°C atau hingga 15°C. Kristal akan terbentuk pada setiap tahap pendinginan (Pinalla, 2011). Seluruh proses kristalisasi dapat dibagi menjadi dua tahapan yaitu nukleasi atau pembentukan inti dan pertumbuhan. Ketika inti kristal sudah terbentuk, maka kristal akan mulai tumbuh seiring dengan faktor-faktor pertumbuhannya (Gosh dan Bandyopadhyay, 2005).

Mubarok (2014) juga menjelaskan tentang mekanisme kristalisasi yang terdiri dari nukleasi dan pertumbuhan kristal, adalah sebagai berikut :

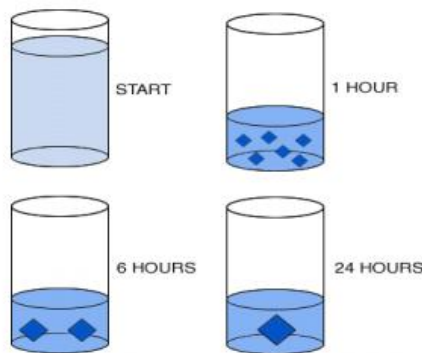
a. Nukleasi

Nukleasi merupakan proses terbentuknya inti kristal dari zat terlarut murni dalam pelarut murni, yang didasarkan pada prinsip kejenuhan larutan. Kejenuhan didefinisikan sebagai konsentrasi maksimum zat terlarut yang dapat eksis dalam suatu larutan dengan pelarut tertentu dan pada suhu tertentu. Jika larutan jenuh ini lebih terkonsentrasi atau didinginkan perlahan-lahan, zat terlarut masih tinggal di dalam larutan, maka larutan tersebut dikatakan lewat jenuh (supersaturated). Ketika tingkat kejenuhan larutan meningkat, zat terlarut mulai membentuk agregat/ kumpulan dalam larutan dalam satu kluster. Pada tingkat kejenuhan rendah, kluster yang terbentuk kecil dan tidak stabil. Namun ketika tingkat kejenuhan tertentu tercapai, kluster akan menjadi stabil dan cukup besar

untuk membentuk suatu kristal. Pada titik ini, klaster menjadi *nuclei*, yaitu partikel padat yang dapat tumbuh menjadi kristal (Mubarok, 2014).

b. Pertumbuhan Kristal

Kristal akan tumbuh disekitar *nuclei*/ inti kristal sebagai akibat dari pengendapan zat terlarut dari larutan jenuh. Campuran antara kristal dan mother liquor disebut dengan *magma*. *Magma* mengandung kristal dengan berbagai ukuran. Kristal yang kecil memiliki *specific surface* yang lebih besar dibandingkan kristal yang berukuran besar sehingga kristal yang sangat kecil lebih terlarut (Mubarok, 2014).



Gambar 2.13. Skema Tahapan Kristalisasi (Mubarok, 2014)

Ukuran dan bentuk kristal sangat dipengaruhi oleh dua faktor penting, yaitu laju pembentukan inti dan laju pertumbuhan kristal. Semakin tinggi laju pembentukan inti, maka makin banyak kristal yang dapat terbentuk dengan ukuran kristal yang tidak terlalu besar sehingga endapan yang terbentuk pun terdiri dari partikel-partikel kristal yang kecil (Svehla, 1979). Menurut Krishnamurthy dan Kellens (1995), inti kristal pada proses kristalisasi dapat terbentuk pada saat suhu pelelehan lemak cair jauh lebih rendah dibandingkan suhu kesetimbangan termodinamikanya, yaitu ketika zat tersebut menjadi lewat jenuh. Adapun parameter yang mempengaruhi terbentuknya inti kristal adalah sebagai berikut (Hartel, 2001) :

a. Kondisi lewat jenuh atau lewat dingin

Seiring dengan meningkatnya gaya diatas titik kristis yang diperlukan untuk pembentukan inti kristal, tingkat pembentukan inti kristal pun ikut meningkat sementara waktu induksinya menurun.

b. Suhu

Penurunan suhu dibawah area metastabil akan menginduksi pembentukan kristal secara cepat. Tingkat pembentukan inti kristal akan

meningkat dengan waktu induksi yang menurun seiring dengan perlakuan suhu di bawah titik leleh atau kondisi kelarutannya.

c. Viskositas

Ketika viskositas meningkat akibat menurunnya suhu dan meningkatnya konsentrasi larutan, proses pembentukan inti kristal akan terbatas. Hal ini disebabkan oleh berkurangnya pergerakan molekul pembentuk inti kristal dan terhambatnya pindah panas sebagai energi pembentukan inti kristal.

d. Laju agitasi

Agitasi meningkatkan laju pindah massa baik bagi zat pembentuk kristal untuk mendekati permukaan maupun bagi zat yang tidak dapat membentuk kristal untuk menjauh dari permukaan. Laju agitasi akan meningkatkan laju pertumbuhan kristal sampai pada titik dimana pindah massa tidak membatasi pertumbuhan kristal.

e. Laju pendinginan

Pendinginan yang cepat akan menghasilkan proses pembentukan inti kristal pada suhu yang lebih rendah dibandingkan dengan pendinginan lambat.

f. Bahan tambahan dan pengotor

Beberapa bahan dapat ditambahkan ke dalam larutan yang akan dikristalkan. Bahan-bahan tersebut dapat berperan baik untuk membantu maupun menghambat pembentukan inti kristal.

Dalam industri makanan, proses kristalisasi dapat berfungsi untuk pemulihan produk kristal (gula, glukosa, laktosa, asam sitrat dan garam), untuk menghilangkan komponen tertentu yang tidak diinginkan (wintering minyak nabati, yaitu suatu proses yang terdiri dari pendinginan minyak tertentu dalam rangka untuk memadatkan dan menghilangkan lilin dan komponen lainnya yang mempunyai titik leleh tinggi), atau untuk modifikasi produk makanan tertentu untuk mendapatkan struktur yang diinginkan (Berk, 2009). Metode kristalisasi juga dapat diterapkan dalam memproduksi amonium perklorat yang merupakan oksidator propelan (Pinalla, 2011)

Kristalisasi ini mudah dilakukan dan dapat pula menggunakan suhu rendah hingga di bawah 0°C sehingga dapat mencegah komponen yang sensitif terhadap suhu tinggi mengalami kerusakan (Khatoun *et al.*, 2010). Untuk mengkristalkan senyawa, biasanya dilakukan penjuanan terlebih dahulu secara perlahan sampai terbentuk kristal. Pengkristalan dapat pula dilakukan dengan mendinginkan larutan jenuh pada temperatur yang sangat rendah di dalam

lemari es atau freezer (Oktafa, 2015). Seperti penelitian Ahmadi *et al.*, (2012) yang melakukan optimasi kristalisasi pelarut suhu rendah dengan tujuan memisahkan senyawa vitamin E dengan senyawa pengotor lainnya. Konsep pemisahan tersebut didasarkan pada perbedaan titik beku komponen senyawa yang ingin dimurnikan. Kemudian dalam prosesnya tersebut akan terbentuk fraksi padat dan fraksi cair. Senyawa yang diinginkan bisa terdapat pada fraksi padat ataupun pada fraksi cairnya, bergantung pada tingkat kejenuhan senyawa tersebut.

Pan *et al.*, (2005), memisahkan fitosterol dari vitamin E dalam distilat minyak jarak menggunakan suhu kristalisasi -8°C . Ahmadi dan Estiasih (2011) melakukan optimasi separasi vitamin E pada fraksi tidak tersabunkan DALMS menggunakan kondisi kristalisasi suhu $-9,7^{\circ}\text{C}$, perbandingan rasio pelarut 5,89 : 1, dan lama kristalisasi 22,52 jam. Dari proses tersebut diperoleh kadar vitamin E paling tinggi yaitu sebesar 21,813 g/100 g. Selanjutnya Ahmadi *et al.*, (2012) kembali melakukan penelitian dengan menggunakan rancangan percobaan optimasi dan diperoleh kondisi optimal untuk separasi vitamin E menggunakan rasio pelarut 6.04:1, dengan suhu kristalisasi -10.54°C , selama 24.16 jam. Pada kondisi ini dihasilkan kadar vitamin E tertinggi sebanyak 20.13%. Kondisi optimal serta hasil yang diperoleh dari kedua penelitian tersebut tidak jauh berbeda sehingga dapat dijadikan acuan dalam optimasi separasi komponen fitosterol.

2.7 Kristalisasi Bertingkat Pada Suhu Rendah

Kristalisasi bertingkat adalah pemurnian suatu zat dari campuran atau dari pengotornya dengan jalan mengkristalkan kembali zat tersebut. Konsep kristalisasi didasarkan pada perbedaan kelarutan antara zat yang akan dimurnikan dengan zat pengotornya. Pada dasarnya proses rekristalisasi ini dapat dilakukan seperti melakukan kristalisasi. Zat terlarut yang akan dipisahkan, dikristalkan dengan cara menjenuhkannya. Penjenuhan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pendinginan dan penguapan. Pendinginan dapat menggerakkan kondisi larutan dari kondisi jenuh menjadi lewat jenuh pada konsentrasi zat terlarut yang sama. Teknik ini menggunakan suhu rendah sehingga disebut juga dengan rekristalisasi pelarut suhu rendah. Sedangkan penguapan dapat dilakukan dengan cara meningkatkan konsentrasi larutan menjadi lewat jenuh pada suhu kamar. Laju pembentukan inti kristal tergantung pada derajat lewat jenuh dari larutan. Makin tinggi derajat lewat jenuh, makin besarlah kemungkinan

untuk membentuk inti baru sehingga laju pertumbuhan inti kristal semakin tinggi (Svehla, 1979).

Menurut Pinalla (2011), parameter keberhasilan kristalisasi bertingkat dapat dilihat dari jumlah kristal yang terbentuk mendekati jumlah kristal sebelum rekristalisasi (tidak banyak kristal yang hilang), yang artinya rekristalisasi berjalan efisien. Selain itu bentuk kristal cenderung seragam dengan ukuran mendekati bulat. Penelitian yang dilakukan oleh Khatoun *et al.*, (2010) yaitu memisahkan komponen fitosterol dalam distilat minyak kedelai menggunakan suhu kristalisasi -20°C kemudian dilanjutkan rekristalisasi dengan suhu -5°C . Sedangkan Wardhana (2012), melakukan kristalisasi pada suhu $-9,7^{\circ}\text{C}$ dan rekristalisasi pelarut pada suhu 0°C . Dari proses tersebut diperoleh fraksi kaya fitosterol (FKF) dengan kadar fitosterol sebesar 17,9% (β -sitosterol 10,91%; stigmasterol 5,85%; dan kampesterol 1,14%).



BAB III LANDASAN TEORI

2.1 Kerangka Konsep Penelitian

Distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) merupakan produk samping dari poses pemurnian fisik minyak sawit mentah, yang masih banyak mengandung asam lemak bebas sekitar 80% (Christina, 2000). DALMS diperoleh sekitar 5% dari berat minyak sawit setelah melalui tahap deodorisasi (Puah *et al.*, 2009). Selain sebagai sumber asam lemak, DALMS juga merupakan sumber senyawa fitokimia seperti vitamin E, fitosterol serta skualen. Fitosterol merupakan salah satu komponen fitokimia penting dari DALMS yang struktur molekulnya mirip kolesterol sehingga memiliki efek untuk menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh. Mekanisme penurunan kadar kolesterol oleh fitosterol terjadi melalui beberapa cara yaitu penghambatan absorpsi kolesterol dan reabsorpsi endogen, peningkatan ekskresi kolesterol melalui feses, kompetisi kolesterol dengan fitosterol dalam pembentukan misel, kokristalisasi fitosterol dan kolesterol serta penghambatan aktivitas enzim acyl coenzim-A kolesterol acyltransferase (ACAT). Begitu pentingnya manfaat fitosterol tersebut sehingga sangat disayangkan jika tidak dimanfaatkan dengan semaksimal mungkin.

Menurut Gapor *et al.*, (2002), fitosterol dapat dipisahkan dari fraksi lain melalui teknik kristalisasi. Hal ini disebabkan karena fitosterol dapat mengkristal pada suhu tertentu. Teknik kristalisasi yang digunakan adalah pada suhu rendah atau disebut juga dengan kristalisasi lewat dingin (*supercooling crystallization*). Teknik ini memiliki kelebihan diantaranya mudah dioperasikan, ramah lingkungan, serta dapat mencegah kerusakan senyawa bioaktif yang sensitif terhadap panas (Ahmadi dan Estiasih, 2011). Sebelum dilakukan kristalisasi, DALMS perlu melewati beberapa tahapan proses yaitu saponifikasi, evaporasi, serta penyemprotan gas nitrogen. Saponifikasi atau penyabunan merupakan reaksi hidrolisis lemak atau trigliserida pada kondisi basa menggunakan pereaksi NaOH atau KOH konsentrasi tinggi. Selanjutnya asam lemak akan bereaksi membentuk sabun yang mengendap dengan membawa serta lendir, kotoran dan sebagian zat warna. Saponifikasi ini bertujuan untuk memisahkan asam lemak dengan FTT yang mengandung beberapa komponen fitokimia penting seperti vitamin E, fitosterol dan skualen (Estiasih, 1996; Zulkifli dan Estiasih, 2014). Setelah saponifikasi, dilanjutkan pada tahap evaporasi dan penyemprotan gas nitrogen. Hal ini bertujuan untuk menguapkan pelarut yang terkandung dalam FTT. FTT murni kemudian dilarutkan dalam pelarut non polar berupa heksana lalu

dilakukan kristalisasi. Teknik kristalisasi dilakukan secara bertingkat dan menggunakan suhu rendah. Menurut Khatoun *et al.*, (2010) teknik kristalisasi yang baik digunakan adalah menggunakan suhu rendah untuk mencegah terjadinya kerusakan pada komponen senyawa yang sensitif terhadap suhu tinggi.

Pemisahan dengan kristalisasi didasarkan pada perbedaan titik beku komponen fitosterol, vitamin E (tokoferol dan tokotrienol) dengan senyawa lain yang terdapat dalam FTT. FTT dilarutkan dalam pelarut heksana kemudian dipaparkan suhu dibawah 0°C sehingga akan terbentuk fraksi padat dan fraksi cair. Fraksi cair kaya akan tokotrienol (FKT) sedangkan kristal yang terbentuk merupakan fraksi padat yang kaya akan fitosterol (FKF) dan sedikit tokoferol (Gapoor *et al.*, 2002). Fitosterol diduga memiliki titik beku lebih tinggi dibandingkan tokoferol dan tokotrienol. Tokoferol memiliki titik beku sekitar 2,5-3,5°C sedangkan tokotrienol diduga memiliki titik beku lebih rendah dibandingkan tokoferol karena sifatnya yang lebih tidak jenuh. Hal inilah yang menyebabkan tokoferol dapat mengkristal dan terikut dalam fraksi padat ketika dikondisikan suhu di bawah 0°C. Oleh karena itu perlu dilakukan rekristalisasi atau kristalisasi bertingkat pada suhu yang lebih tinggi untuk mendapatkan FKF yang lebih murni.

Menurut Wardhana (2012) rekristalisasi bertujuan untuk meningkatkan kadar fitosterol pada fraksi kristal karena akan melarutkan komponen-komponen yang tidak diinginkan seperti tokotrienol, tokoferol, dan senyawa lainnya. Faktor-faktor yang mempengaruhi kristalisasi pada suhu rendah adalah jenis pelarut, rasio pelarut dengan fraksi padat (pelarut : kristal), suhu, serta lama kristalisasi. Jenis pelarut berhubungan dengan polaritas suatu senyawa yang ingin diekstrak (Vogel, 1978). Faktor rasio berhubungan dengan viskositas larutan. Sedangkan faktor suhu didasari atas perbedaan titik leleh atau titik beku suatu senyawa, dimana fitosterol memiliki titik beku lebih tinggi dibanding vitamin E (tokoferol dan tokotrienol) (Krishnamurthy dan Kellens, 1995). Saat proses kristalisasi, akan terbentuk inti kristal yang laju pembentukannya bergantung pada derajat lewat jenuh dari larutan. Makin tinggi derajat lewat jenuh, makin besarliah kemungkinan untuk membentuk inti baru sehingga laju pertumbuhan inti kristal semakin cepat (Svehla, 1979). Adapun parameter yang mempengaruhi terbentuknya inti kristal diantaranya adalah kondisi lewat jenuh atau lewat dingin larutan, suhu, viskositas, laju agitasi, laju pendinginan, serta adanya bahan tambahan maupun pengotor (Hartel, 2001).

Dalam penelitiannya, Wardhana (2012) menemukan bahwa perlakuan terbaik kondisi rekristalisasi untuk mendapatkan fraksi kaya fitosterol (FKF) dari DALMS adalah menggunakan pelarut heksana dengan rasio pelarut 8:1 pada suhu 5°C selama 72 jam. Perlakuan tersebut memiliki kadar total fitosterol sebesar 17,9 % (10,91% stigmasterol, 5,85 kampesterol, 1,14 sitosterol), rendemen 45,83 %, asam lemak bebas 76,17 %, peroksida 1,14 mek/kg dan bilangan anisidin 12,37. Berdasarkan penelitian tersebut maka dilakukan penelitian lanjutan untuk menentukan kondisi optimal proses karena belum diketahui titik optimal penggunaan rasio pelarut dan lama kristalisasi pada proses kristalisasi ke-II. Optimasi proses kristalisasi dapat dilakukan menggunakan rancangan percobaan Respon Surface Methodology (RSM), yang mana memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat mengurangi jumlah total percobaan dan mempermudah evaluasi antar interaksi dari banyak parameter. Hal ini yang membuat RSM dianggap lebih efektif dan efisien dibanding rancangan percobaan acak dan faktorial. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.2 Kerangka Operasional Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep penelitian maka disusun kerangka operasional penelitian yang terdiri dari dua tahap utama. Penelitian tahap I bertujuan untuk mendapatkan fraksi kristal yang kaya akan senyawa fitosterol (dengan sedikit tokoferol). Tahap ini diawali dengan proses saponifikasi pada bahan baku utama berupa DALMS untuk mendapatkan fraksi tidak tersabunkan (FTT). Selanjutnya dilakukan proses kristalisasi menggunakan pelarut heksan pada suhu rendah yaitu $\pm 10^{\circ}\text{C}$ untuk mendapatkan fraksi cair yang kaya akan tokotrienol sedangkan fraksi kristal diduga mengandung fitosterol dan sedikit tokoferol.

Penelitian tahap II bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum proses kristalisasi ke-II. Kristalisasi ke-II dilakukan pada suhu $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Kristalisasi bertingkat ini berperan dalam pemisahan atau separasi senyawa fitosterol dengan sedikit tokoferol sehingga akan didapatkan fraksi kaya fitosterol dengan respon kadar fitosterol tertinggi. Penentuan kondisi optimum tersebut menggunakan metode Respon Surface Methodology (RSM), Central Composite Design (CCD) dengan model kuadratik. Dengan metode tersebut dapat diketahui prediksi kondisi optimum yang dipengaruhi oleh interaksi antar variabel. Menurut Ratnawati, *et al.*, (2018), kondisi optimum terletak pada koordinat central point

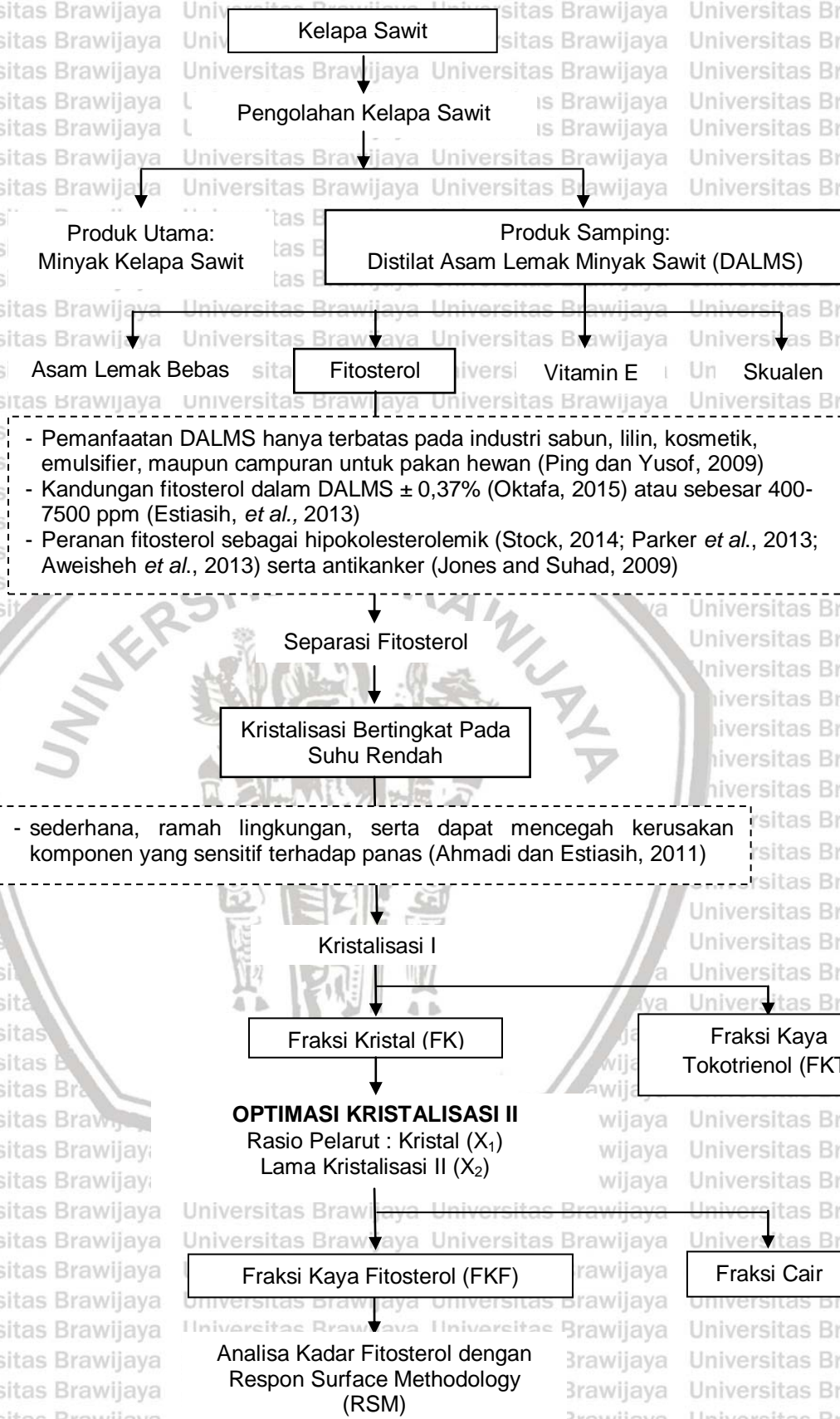
dimana slope maksimal mendekati titik nol atau titik tengahnya. Apabila sudah tercapai kondisi optimum dari interaksi antar variabel maka akan terlihat model kurva tiga dimensi seperti parabola terbalik.

Penentuan titik tengah (center point) pada penelitian ini didasarkan pada nilai perlakuan terbaik penelitian Wardhana (2012) tentang rekristalisasi pelarut suhu rendah pada pembuatan fraksi kaya fitosterol dari DALMS dengan metode rancangan acak kelompok (RAK). Perlakuan terbaik dalam penelitian tersebut adalah menggunakan rasio pelarut 8:1 selama 72 jam. Dengan demikian dalam penelitian ini juga akan digunakan rasio pelarut 8:1 dengan waktu kristalisasi II selama 72 jam sebagai titik tengahnya. Sedangkan titik batas atas dan batas bawahnya untuk faktor rasio pelarut (x_1) serta lama waktu kristalisasi II (x_2) dirancang seperti Tabel 4.1 dengan kadar fitosterol sebagai responnya.

Kerangka Operasional Penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2.

3.3 Hipotesis

Diduga akan diperoleh kondisi optimum terkait dengan rasio pelarut terhadap bahan serta lama kristalisasi ke-II pada suhu rendah menggunakan rancangan RSM-CCD model kuadratik agar diperoleh FKF dengan kadar fitosterol tertinggi.



Gambar 3.1 Diagram Alir Kerangka Konsep Penelitian

Tahap 1

- Analisis:**
- Kadar dan jenis fitosterol, vitamin E, skualen
 - Kadar asam lemak bebas
 - Jenis asam lemak

DALMS

Saponifikasi

Fraksi Tersabunkan

Fraksi Tidak Tersabunkan

Fraksi Cair, Fraksi Kaya Tokotrienol (FKT)

KRISTALISASI I

- Analisis:**
- Kadar dan jenis fitosterol, vitamin E, skualen
 - Kadar asam lemak bebas

Fraksi Kristal (FK)

Tahap II

OPTIMASI KRISTALISASI II
Rasio Pelarut:Kristal,
Lama Kristalisasi

- Analisis:**
- Kadar dan jenis fitosterol, vitamin E, skualen
 - Jenis asam lemak
 - Kadar asam lemak bebas
 - Bilangan peroksida
 - Bilangan anisidin
 - Rendemen

Penyaringan

Fraksi cair

Fraksi Kaya Fitosterol (FKF)

Gambar 3.2 Diagram Alir Kerangka Operasional Penelitian

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Laboratorium Rekayasa dan Pengolahan Pangan, Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan, serta Laboratorium Instrumental Jurusan THP Universitas Brawijaya Malang, mulai bulan April 2017 hingga Desember 2018.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1. Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) yang diperoleh dari PT Salim Ivomas Pratama, Surabaya. Bahan yang digunakan untuk saponifikasi adalah etanol 96% teknis, heksana teknis, asam askorbat, KOH, nitrogen dan akuades. Bahan yang digunakan untuk kristalisasi dan rekristalisasi adalah heksana teknis dan nitrogen.

Bahan yang digunakan untuk analisa kandungan asam lemak bebas adalah alkohol 96% (Merck, USA), NaOH 0,1 N, serta kertas lakmus. Bahan yang digunakan untuk analisa bilangan peroksida adalah metanol p.a (Merck, USA) ammonium triosianat, BaCl₂, ferro sulfat, HCl 34%, FeCl₃ 6H₂O, H₂O₂, benzene, air deionisasi dan akuades. Bahan yang digunakan untuk analisa bilangan p-anisidin adalah heksana (Merck, USA) dan reagen p-anisidin.

Bahan yang digunakan untuk analisa kandungan bioaktif adalah etanol p.a (Merck, USA), metanol p.a (Merck, USA), akuabides, standar vitamin E (α -tokoferol, α -, δ -, dan γ -tokotrienol) (Santa Cruz Biotechnology), standar fitosterol (β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol) (Stigma-Aldrich), serta standar skualen (Santa Cruz Biotechnology).

4.2.2. Alat

Alat yang digunakan untuk saponifikasi DALMS adalah reaktor saponifikasi, *rotary vacuum evaporator* (IKA RV 10), erlenmeyer, corong pemisah, timbangan analitik, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur dan termometer.

Alat yang digunakan untuk kristalisasi bertingkat adalah freezer, timbangan analitik, gelas beaker, gelas ukur, pipet tetes, corong plastik, kertas whatman no.1 serta termometer.

Alat yang digunakan untuk analisa kandungan asam lemak bebas adalah kompor listrik, timbangan analitik, buret dan statif, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, pipet ukur, bola hisap dan spatula. Alat yang digunakan untuk analisa bilangan peroksida adalah spektrofotometer UV-Vis, lemari asam, kompor listrik, timbangan analitik, vortex, tabung reaksi, labu ukur, botol gelap, erlenmeyer, gelas ukur, pipet ukur, bola hisap, kertas saring halus dan spatula. Alat yang digunakan untuk analisa bilangan p-anisidin adalah spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, vortex, tabung reaksi, labu ukur, tabung reaksi, gelas beaker, pipet ukur, bola hisap, pipet tetes dan spatula.

Alat yang digunakan untuk analisis kandungan bioaktif (fitosterol, vitamin E, dan skualen) adalah seperangkat alat HPLC Shimadzu LC-20AT dengan kolom C18 PPODS 250x4,6 mm, detektor uv vis (Shimadzu SPD20A) pada panjang gelombang 295 dan 206 nm. Kemudian seperangkat alat GCMS (GCMS-QP2010S Shimadzu), kolom (Rtx 5 MS) 30 m, ID 0,25 mm, *film* 0,25 μm , gas pembawa helium, pengionan EI 70 Ev. Selain itu digunakan juga timbangan analitik, mikropipet, suntik injeksi, penyaring vakum, serta micropore 0.45 μm .

4.3 Pelaksanaan Penelitian

4.3.1 Penelitian Tahap 1

a. Saponifikasi

Proses saponifikasi didasarkan pada hasil penelitian Pengusul sebelumnya (Modifikasi Ahmadi, 1997) tentang penentuan kondisi optimum saponifikasi untuk mendapatkan fraksi tidak tersabunkan (FTT) dengan tingkat kemurnian tinggi yang dicirikan oleh kadar asam lemak bebas sebagai pengotor yang rendah. Berikut ini adalah tahapan proses saponifikasi:

DALMS sebanyak 490 g dimasukkan ke dalam alat reaktor. Kemudian ditambahkan alkohol sebanyak 4330 ml, 12 g asam askorbat, dan 294 ml KOH 50% (b/v). Tingkat penambahan KOH 50% ini merupakan kondisi optimum dari penelitian sebelumnya untuk mendapatkan FTT dengan kemurnian maksimum. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 62°C selama 32 menit yang merupakan kondisi optimum untuk mendapatkan FTT dengan kemurnian tinggi (kadar asam lemak bebas minimum). Setelah pemanasan selesai, campuran reaksi dipindahkan ke dalam wadah bervolume besar dan didinginkan pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 3450 ml heksana dan 4714 ml akuades, kemudian dilakukan pengocokan lambat dan didiamkan selama ± 2 jam. Lapisan air di bagian bawah mengandung fraksi tersabunkan (FT) sedangkan lapisan

heksana di bagian atas mengandung fraksi tidak tersabunkan (FTT). Heksana dipisahkan dari FTT dengan cara evaporasi vakum pada suhu 45°C dan dilanjutkan dengan penyemprotan gas nitrogen sehingga dihasilkan FTT yang bebas pelarut. FTT bebas pelarut selanjutnya digunakan untuk analisa senyawa bioaktif.

Analisa yang dilakukan pada senyawa DALMS dan FTT meliputi senyawa bioaktif yaitu analisis tokotrienol dan tokoferol (Nielsen dan Hansen, 2008), skualen (Mendez, *et al.*, 2003), fitosterol (Nielsen dan Hansen, 2008), serta kadar asam lemak bebas (Mehlenbacher, 1960 *dalam* Sudarmadji *et al.*, 2007).

b. Kristalisasi I Pada Suhu Rendah

Teknik kristalisasi ke-1 yang dilakukan pada suhu rendah ini berperan dalam proses separasi tokotrienol. Sebanyak 50 g FTT DALMS dilarutkan dalam heksana dengan rasio pelarut : FTT adalah 5,9:1, serta suhu kristalisasi $\pm -10^{\circ}\text{C}$. Setelah 22,52 jam, fraksi kristal dipisahkan dari fraksi cair dengan cara penyaringan. Pelarut dalam fraksi cair diuapkan dengan rotary evaporator sampai semua pelarut menguap. Residu atau fraksi kristal (FK) diduga mengandung fitosterol dan sedikit tokoferol sedangkan fraksi cairnya merupakan fraksi kaya tokotrienol (FKT). Baik FK maupun FKT dianalisa kandungan senyawa bioaktifnya meliputi tokotrienol dan tokoferol (Nielsen dan Hansen, 2008), skualen (Mendez *et al.*, 2003), fitosterol (Nielsen dan Hansen, 2008), serta kadar asam lemak bebas (Mehlenbacher, 1960 *dalam* Sudarmadji *et al.*, 2007).

4.3.2 Penelitian Tahap II

a. Optimasi Kristalisasi II pada Suhu Rendah

Teknik kristalisasi bertingkat (kristalisasi I dan II) pada suhu rendah berperan dalam separasi senyawa fitosterol untuk menghasilkan fraksi kaya fitosterol dengan kemurnian yang tinggi. Sebanyak 5 g FK dilarutkan dalam heksana, dengan rasio pelarut:FK bervariasi bergantung perlakuan, yaitu 6:1 hingga 10:1 dengan suhu rekristalisasi adalah $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Setelah waktu tertentu sesuai perlakuan, yaitu 48 hingga 96 jam, fraksi kristal dipisahkan dari fraksi cair dengan cara penyaringan menggunakan kertas Whatman No.1. Fraksi kristal yang diperoleh merupakan fraksi kaya fitosterol (FKF) sedangkan fraksi cairnya disebut FFKF. Selanjutnya FKF maupun FFKF yang didapat dianalisis meliputi

tokotrienol dan tokoferol (Nielsen dan Hansen, 2008), skualen (Grigoriadou *et al.*, 2007), fitosterol (Nielsen dan Hansen, 2008), jenis asam lemak bebas, bilangan peroksida (Kim, 2005), bilangan p-anisidin (IUPAC, 1993) serta nilai rendemen (Pontes *et al.*, 2016).

b. Analisa Data dan Verifikasi

Data hasil analisa kadar fitosterol dimasukkan dalam tabel rancangan RSM-CCD menggunakan software Design Expert 7.0 sehingga akan didapatkan nilai prediksi kondisi optimum pada faktor rasio pelarut : fraksi kristal serta lama waktu proses kristalisasi II pada suhu rendah. Kemudian dilakukan langkah verifikasi data dengan melakukan penelitian kembali pada titik optimumnya sesuai prediksi. Kecocokan antara nilai verifikasi dengan prediksi dianalisa data menggunakan uji Paired T-Test menggunakan software Minitab 16.

4.4 Rancangan Penelitian

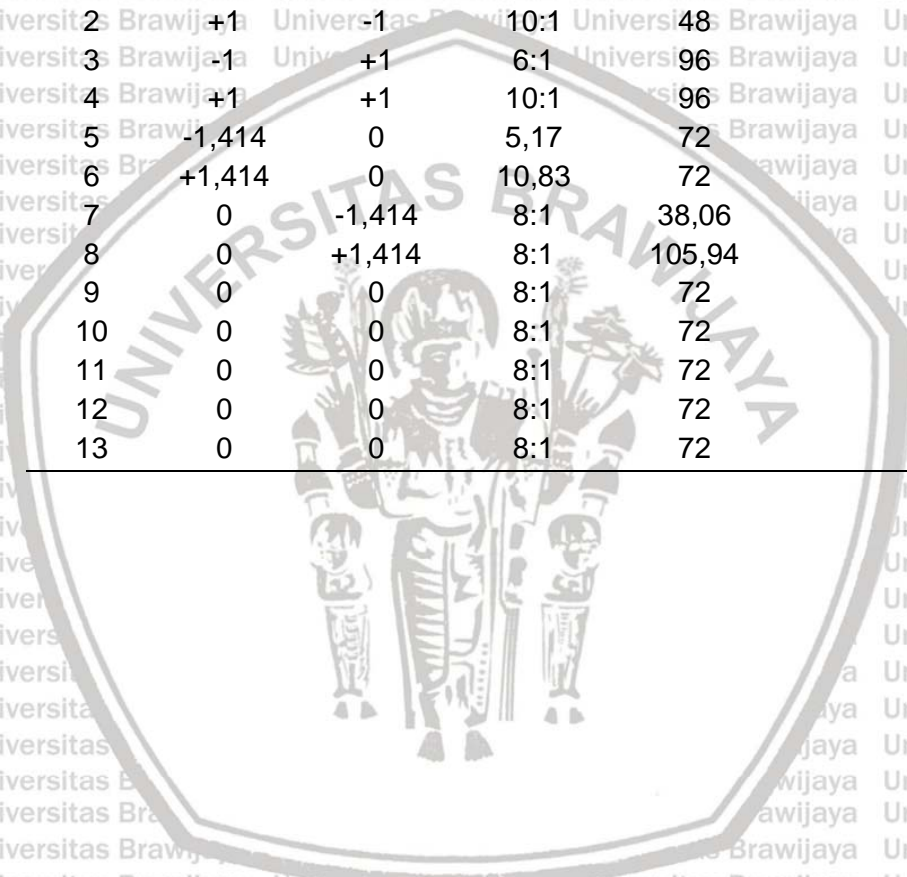
Rancangan percobaan yang digunakan adalah Response Surface Methodology dengan Central Composite Design (RSM-CCD) atau disebut dengan rancangan komposit pusat RSM. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan software Design Expert 7.0. Kondisi optimum yang diperoleh pada respon kadar fitosterol (%) kemudian diverifikasi. Hasil verifikasi dari fraksi kaya fitosterol (FKF) kemudian dianalisis kandungan kimianya seperti kadar bilangan peroksida, p-anisidin, serta nilai rendemen. Selain itu dianalisis pula kadar komponen bioaktif menggunakan HPLC meliputi kadar fitosterol, tokotrienol, tokoferol, serta skualen. Analisa jenis asam lemak dengan GC juga dilakukan pada fraksi kaya tokotrienol (FKT) dan fraksi kaya fitosterol (FKF). Tujuannya adalah untuk mengetahui jenis-jenis asam lemak bermanfaat yang kemungkinan terkandung dalam sampel. Hal ini dapat menjadi acuan untuk pengembangan penelitian selanjutnya.

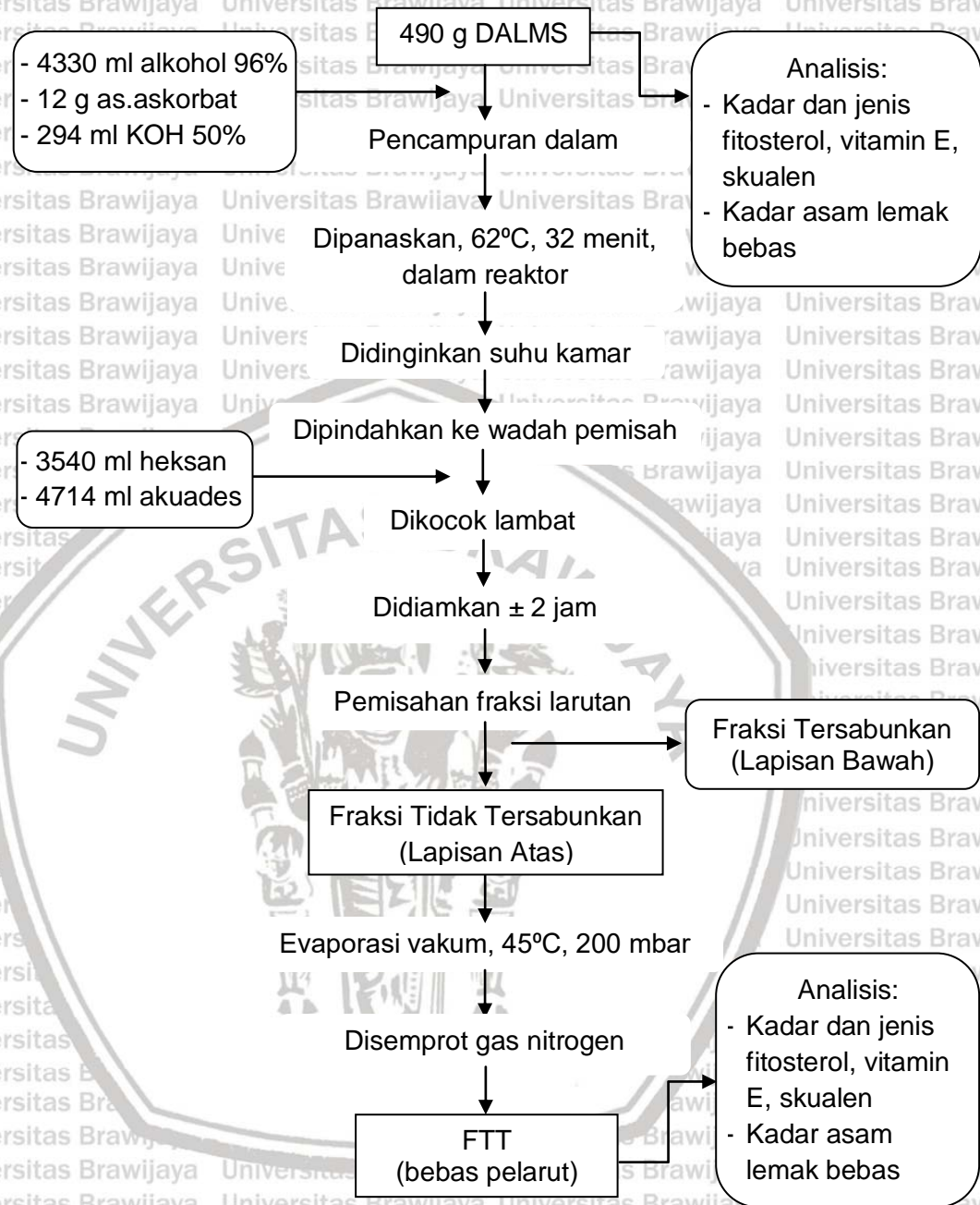
Tabel 4.1 Rancangan Komposit Pusat untuk Optimasi Kristalisasi II pada Suhu Rendah untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol

Faktor	Satuan	Level		Alfa (α)		
		-1	+1	-1,414	+1,414	
X_1	Rasio Pelarut : Kristal	v/b	6:1	10:1	5,17	10,83
X_2	Lama Kristalisasi II	Jam	48	96	38,06	105,94

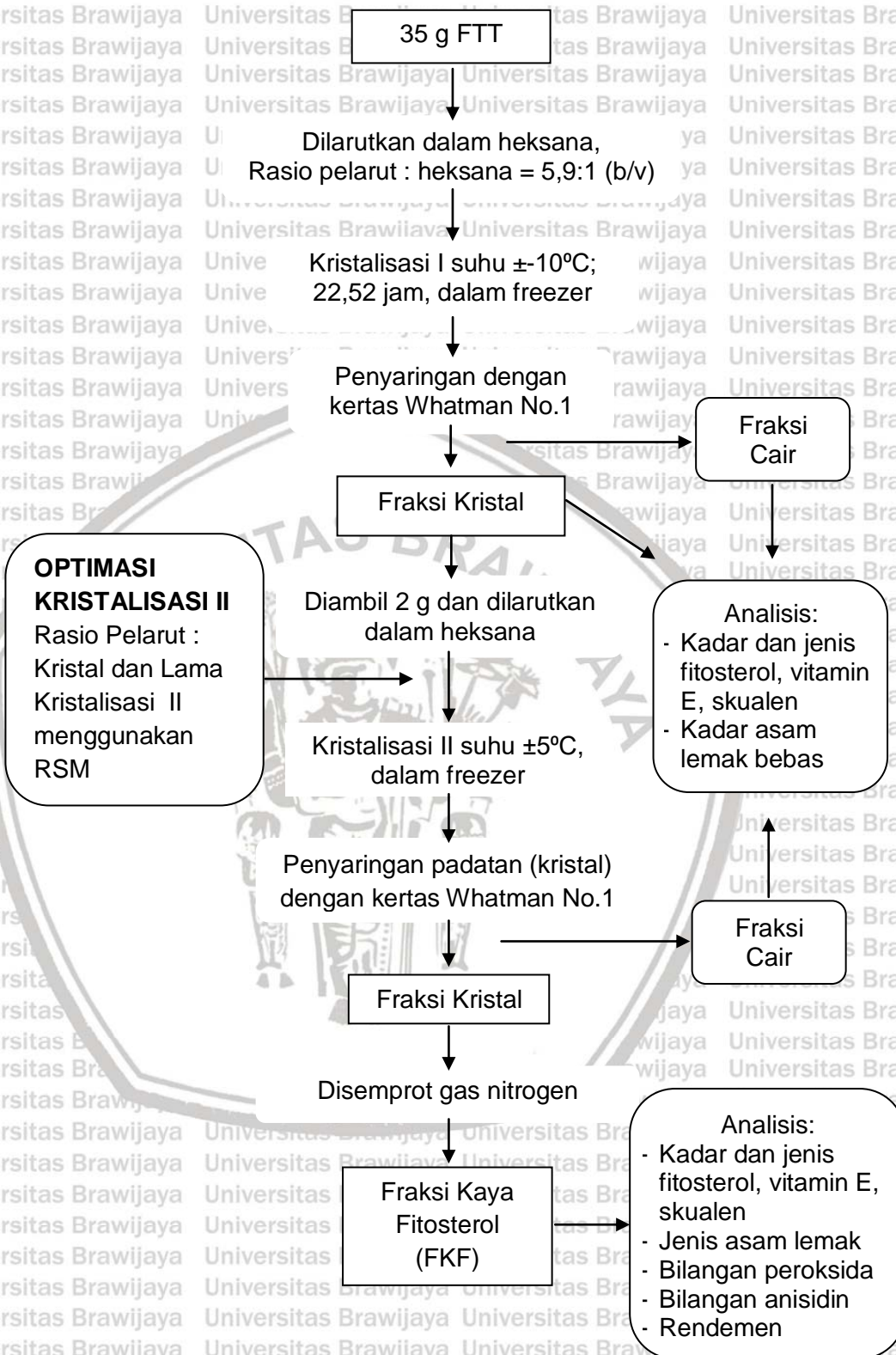
Run	Kode		Faktor		Respon Kadar Fitosterol (%)
	X_1	X_2	X_1	X_2	
1	-1	-1	6:1	48	
2	+1	-1	10:1	48	
3	-1	+1	6:1	96	
4	+1	+1	10:1	96	
5	-1,414	0	5,17	72	
6	+1,414	0	10,83	72	
7	0	-1,414	8:1	38,06	
8	0	+1,414	8:1	105,94	
9	0	0	8:1	72	
10	0	0	8:1	72	
11	0	0	8:1	72	
12	0	0	8:1	72	
13	0	0	8:1	72	



4.5 Diagram Alir Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alir Saponifikasi DALMS



Gambar 4.2 Diagram Alir Kristalisasi Bertingkat FTT

4.6. Metode Analisis

4.6.1 Analisis Vitamin E (Tokoferol dan Tokotrienol) (Nielsen dan Hansen, 2008)

DALMS, FTT, FKT, FK, FKF maupun FFKF dari proses separasi tokotrienol dan fitosterol, masing-masing sebanyak 1 mg dan ditambah dengan etanol 1 ml lalu disaring menggunakan micropore 0,45 μm . Selanjutnya sampel diinjeksikan ke dalam kolom HPLC dengan satu kali ulangan. Kolom C18 ODS dimensi 250X4,6 mm, detektor uv-vis panjang gelombang 295 nm, fase mobil metanol:air (95:5 v/v), kecepatan aliran 1 ml/menit, dan volume injeksi 20 μl .

4.6.2 Analisis Fitosterol (Nielsen dan Hansen, 2008)

DALMS, FTT, FKT, FK, FKF maupun FFKF dari proses separasi tokotrienol dan fitosterol, masing-masing sebanyak 1 mg dan ditambah dengan etanol 1 ml lalu disaring menggunakan micropore 0,45 μm . Selanjutnya sampel diinjeksikan ke dalam kolom HPLC dengan satu kali ulangan. Kolom C18 ODS dimensi 250X4,6 mm, detektor uv-vis panjang gelombang 206 nm, fase mobil metanol:air (99:1 v/v), kecepatan aliran 1 ml/menit, dan volume injeksi 20 μl .

4.6.3 Analisis Skualen (Grigoriadou *et al.*, 2007)

DALMS, FTT, FKT, dan FKF dari proses separasi tokotrienol dan fitosterol, masing-masing sebanyak 5 mg dan ditambah dengan etanol 5 ml lalu disaring menggunakan micropore 0,45 μm . Kemudian sampel dipipet sebanyak 1 ml untuk dilarutkan dalam 1 ml acetonitrite lalu disaring menggunakan micropore 0,45 μm . Selanjutnya dibuat kurva standar menggunakan standar skualen dengan konsentrasi 75, 100, 125, dan 150 ppm sehingga akan didapat persamaan regresi linear. Persamaan tersebut kemudian digunakan dalam menghitung kadar skualen pada sampel yang telah diinjeksikan pada kolom HPLC C18 ODS dimensi 250X4,6 mm, detektor uv-vis panjang gelombang 208 nm, fase mobil metanol:air (99:1 v/v), kecepatan aliran 1 ml/menit, dan volume injeksi 20 μl . Analisa senyawa skualen dilakukan sebanyak satu kali ulangan.

4.6.4 Analisis Jenis Asam Lemak dengan GCMS (Park and Goin, 1994).

Analisis jenis asam lemak dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sebanyak 1 μl sampel FKT dan FKF yang telah diderivatisasi menjadi metil ester asam lemak diinjeksikan ke dalam kolom (AGILENT DB-1, GCMS-QP2010S Shimadzu) selama 30 menit, dengan i.d 0,25 mm, gas helium sebagai gas pembawa, dan ionisasi EI 70 Ev. Kondisi operasional GCMS adalah suhu oven kolom 70°C, temperature injektor

300°C, tekanan 13,7 kPa, total flow rate 28,0 ml/menit, coloum flow rate 0,50 ml/menit, linear velocity 25,9 cm/detik, supporting gas rate 3,0 ml/menit, dan split ratio 49,0. Initial temperature ada pada 70°C dengan holding time 5 menit. Temperatur dinaikkan 5°C/menit sampai 300°C dan ditahan selama 29 menit.

Analisa MS dilakukan pada ion source temperature 250°C, interface temperature 305°C, solvent cut time 5 menit, scan speed 1250, start m/z 28,0 dan end m/z 600,0.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Karakteristik Bahan Baku

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah distilat asam lemak minyak sawit (DALMS) yang diperoleh dari PT. Salim Ivomas Pratama, Surabaya. DALMS ini kemudian melalui beberapa tahapan proses ekstraksi yaitu saponifikasi, evaporasi serta kristalisasi ke-I sehingga diperoleh semi produk berupa fraksi tidak tersabunkan (FTT), fraksi kaya tokotrienol (FKT), serta fraksi kristal (FK). Bahan baku beserta semi produk tersebut dianalisa kandungan asam lemak bebasnya (% ALB) serta komponen bioaktifnya seperti vitamin E (α -tokoferol, α -, β -, δ -, dan γ -tokotrienol), fitosterol (β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol), serta skualen.

5.1.1 Asam Lemak Bebas

Asam lemak bebas (ALB) adalah asam yang dibebaskan pada hidrolisa lemak. Kadar asam lemak bebas dalam minyak kelapa sawit biasanya hanya dibawah 1%. Jika kadarnya lebih besar dari 1%, ketika dicicipi akan terasa pahit di permukaan lidah dan berbau tengik (Sopianti, *et al.*, 2017). Sementara kadar asam lemak bebas pada DALMS yang merupakan hasil samping pada proses pemurnian fisik minyak sawit kasar adalah sebesar 80% (Puah *et al.*, 2009). Hasil analisa kadar asam lemak bebas dari bahan baku DALMS, FTT, FKT, serta FK dicantumkan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Kadar Asam Lemak Bebas pada Beberapa Sampel

Sampel	ALB (%)	Literatur (%)
DALMS	88,74 \pm 0,23	80,74*
FTT	4,75 \pm 0,37	4,29**
FKT	2,15 \pm 0,50	0,0913***
FK	2,32 \pm 0,34	

Sumber: * = Estiasih *et al.*, 2015; ** = Wulansari, 2017; *** = Ahmadi dan Estiasih, 2011

Keterangan: DALMS = Distilat Asam Lemak Minyak Sawit; FTT = Fraksi Tidak Tersabunkan; FKT = Fraksi Kaya Tokotrienol; FK = Fraksi Kristal

Kadar ALB dari DALMS dalam penelitian ini adalah sebesar 88,74 \pm 0,23%. Hasil analisa tersebut kurang lebih sesuai dengan penelitian sebelumnya dimana kadar ALB DALMS sebanyak 80,74% (Estiasih *et al.*, 2015). Menurut sumber lain pun kadar asam lemak bebas pada DALMS adalah sebesar 85%

(Tapanowang, 2011), 95,75% (Ahmadi *et al.*, 2012), 85,42 – 92,93% (Estiasih *et al.*, 2013), 90-93% (Latifah dan Estiasih, 2016). Tingginya kadar ALB tersebut disebabkan karena pada proses destilasi minyak sawit, terjadi penguapan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan seperti asam lemak bebas, aldehid, keton, alkohol, dan senyawa volatil lainnya yang kemudian terakumulasi dalam bentuk DALMS. Menurut Gapoor *et al.*, (2002) DALMS dihasilkan pada tahapan deodorisasi, yaitu proses menghilangkan bau dari minyak dengan destilasi uap menggunakan suhu 245-265°C dalam kondisi vakum. Penggunaan suhu tinggi dan tekanan rendah (vakum) menyebabkan komponen asam lemak bebas dan senyawa volatil lainnya menguap. Hasil penguapan tersebut berupa DALMS dengan jumlah 3,36% dari berat minyak sawit kasar (Norhidayah *et al.*, 2012). Hal inilah yang menyebabkan kadar ALB dari DALMS tinggi.

Adapun perbedaan nilai ALB dari beberapa penelitian tersebut bisa disebabkan oleh jenis bahan baku, kondisi proses, serta kondisi penyimpanan yang berbeda. Kondisi proses serta penyimpanan berkaitan dengan terjadinya reaksi hidrolisis lemak. Hidrolisis lemak merupakan suatu reaksi pelepasan asam lemak bebas dari gliserin dalam struktur molekul lemak. Hidrolisis lemak disebut juga lipolisis. Reaksi ini dapat dipicu oleh adanya aktivitas enzim lipase atau pemanasan yang menyebabkan pemutusan ikatan ester dan pelepasan asam lemak bebas. Setiap pelepasan satu molekul asam lemak bebas memerlukan satu molekul air. Oleh karena itu reaksi hidrolisis ini dapat terjadi jika ada air dan perlakuan panas (Mirsyad, 2019). Menurut Su'i *et al.*, (2010) enzim lipase mampu menghidrolisis ikatan ester terutama lemak seperti trigliserida, digliserida, dan monogliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Dalam waktu 1 jam, hanya 0,8% total minyak yang dihidrolisis menjadi asam lemak bebas. Gunawan (2003) juga menyebutkan bahwa hidrolisis lemak atau minyak dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pemanasan, adanya air, terpapar udara, penyimpanan yang kurang baik serta aktivitas dari enzim tertentu. Selain itu, jumlah ALB pun bergantung pada keefektifan proses deodorisasi. Semakin baik proses deodorisasi maka jumlah ALB dalam DALMS hasil *recovery* pun akan semakin tinggi.

Tabel 5.1 juga menunjukkan kadar ALB dari FTT DALMS adalah sebesar $4,75 \pm 0,37\%$. Nilai tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya dengan nilai ALB sebesar 4,29% (Wulansari, 2017). Data tersebut menunjukkan terjadinya penurunan nilai ALB secara signifikan hingga 84%. Hal ini disebabkan karena

FTT DALMS telah mengalami proses saponifikasi. Saponifikasi adalah suatu proses untuk memisahkan asam lemak bebas dari minyak atau lemak dengan cara mereaksikan asam lemak bebas dengan basa atau pereaksi lainnya sehingga membentuk sabun. Sabun yang terbentuk akan mengendap dengan membawa serta lendir, kotoran, dan sebagian zat warna (Zulkifli dan Estiasih, 2014). Pada penelitian ini digunakan pereaksi basa berupa KOH untuk proses saponifikasi. Dari proses tersebut kemudian terbentuk dua fraksi yaitu fraksi tersabunkan (FT) dan fraksi tidak tersabunkan (FTT) yang memiliki kandungan ALB rendah. Estiasih *et al.*, (2012) menjelaskan bahwa ALB pada FTT merupakan asam lemak yang tidak tersabunkan pada proses saponifikasi. Kadar ALB pada FTT merupakan residu asam lemak yang jumlahnya menurun drastis karena sebagian besar asam lemak tersaponifikasi menjadi fraksi tersabunkan. Keberadaan asam lemak dalam FTT ini tidak diinginkan karena kadar asam lemak yang tinggi menunjukkan proses saponifikasi tidak sempurna.

Kadar ALB pada FTT bisa berbeda-beda antara penelitian satu dengan lainnya disebabkan oleh faktor oksidasi, dimana terjadi kontak dengan udara serta adanya perlakuan panas saat proses saponifikasi atau separasi. Menurut Nurhasnawati *et al.*, (2015), asam lemak bebas merupakan asam lemak yang keberadaannya bebas dan tidak terikat sebagai trigliserida. Asam lemak bebas dihasilkan oleh proses hidrolisis. Hasil reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit adalah gliserol dan asam lemak bebas. Reaksi ini dipercepat dengan adanya faktor panas, air, keasaman, serta katalisator (enzim). Semakin lama reaksi hidrolisis berlangsung maka semakin banyak kadar asam lemak bebas yang terbentuk.

Selanjutnya pada sampel fraksi kaya tokotrienol (FKT) dan fraksi kristal (FK), kadar ALB adalah berturut-turut sebesar $2,15 \pm 0,50\%$ dan $2,32 \pm 0,34\%$. Dalam hasil penelitian ini, kadar ALB setelah kristalisasi I tidak jauh berbeda antara fraksi cair (FKT) dengan fraksi kristal. Namun sangat berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa kadar ALB dalam FKT sebesar 0,0913% (Ahmadi dan Estiasih, 2011). Hal ini diduga karena perbedaan aktivitas enzim lipase sebagai katalisator dalam reaksi hidrolisis lemak atau minyak. Pahoja *et al.*, (2001) menyebutkan bahwa proses hidrolisis terjadi dalam rentang waktu tertentu. Pada lama waktu hingga 180 menit akan menghasilkan peningkatan aktivitas enzim lipase. Namun jika hidrolisis terus dilanjutkan maka aktivitas enzim lipase akan menurun. Menurunnya aktivitas enzim tersebut tentu

berpengaruh terhadap rendahnya produk hasil hidrolisis berupa asam lemak bebas. Su'i *et al.*, (2010) pun memaparkan hal yang sama yakni penurunan produk hidrolisis berupa asam lemak bebas ini diduga karena pada jumlah atau konsentrasi tertentu keberadaan asam lemak bebas justru akan menghambat reaksi hidrolisis selanjutnya bahkan dapat menyebabkan inaktivasi enzim. Selain itu diduga karena produksi asam lemak bebas sudah mencapai batas maksimal. Jika hidrolisis terus berlanjut maka asam lemak bebas akan diurai lebih lanjut dalam siklus katabolisme lemak menghasilkan suatu heksosa sehingga jumlah asam lemak bebas berkurang. Reaksi hidrolisis dapat dihambat dengan beberapa metode antara lain mencegah kontak antara bahan pangan dengan air, menambah antioksidan, menyimpan pada suhu rendah, inaktivasi enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi serta penggunaan kemasan (Pokorný *et al.*, 2001; Choe dan Min 2009).

5.1.2 Komponen Bioaktif

Komponen bioaktif yang terdapat di dalam DALMS, FTT, FKT, serta FK diantaranya adalah tokoferol, tokotrienol, fitosterol, dan skualen. Beberapa penelitian sebelumnya pun telah menyebutkan bahwa DALMS mengandung total vitamin E (tokoferol dan tokotrienol) sebesar 248,26 ppm, fitosterol 14038,95 ppm, serta skualen 21249,69 ppm (Wulansari, 2017). Tidak hanya DALMS yang mengandung senyawa-senyawa bioaktif tersebut melainkan juga pada sampel FTT, FKT, serta FK yang merupakan hasil dari proses separasi untuk mendapatkan senyawa bioaktif dengan kemurnian yang lebih tinggi. Kandungan senyawa bioaktif dari beberapa sampel yaitu DALMS, FTT, FKT, dan FK dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan Tabel 5.3.

Kadar komponen bioaktif DALMS yang paling tinggi dalam penelitian ini adalah fitosterol dengan jumlah total fitosterol sebesar 31.522,34 ppm, dimana terkandung di dalamnya β -sitosterol (17.243,53 ppm), stigmasterol (5.038,00 ppm), serta kampesterol (9.240,81 ppm). Sedangkan komponen bioaktif terendah adalah skualen yaitu sebanyak 49,45 ppm. Sementara kadar total vitamin E dalam DALMS sebesar 9.077,69 ppm dengan komposisi di dalamnya adalah α -tokoferol (*not detected*), α -tokotrienol (2.484,50 ppm), γ -tokotrienol (1.453,70 ppm), serta δ -tokotrienol (5.139,49 ppm). Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya dimana komponen terbesarnya adalah skualen sedangkan yang terendah adalah vitamin E. Meskipun demikian, hampir semua kadar komponen bioaktif tersebut mengalami peningkatan setelah dilakukan saponifikasi yang

menghasilkan FTT DALMS. Adapun komponen α -tokoferol tidak terdeteksi dalam penelitian ini diduga karena kadar komponen tersebut rendah. Musalamah *et al.*, (2005) menyebutkan bahwa sebagian besar komponen vitamin E dalam DALMS berupa tokotrienol (70%) dan sisanya adalah tokoferol (30%). Sedangkan Estiasih *et al.*, (2013), menyebutkan bahwa komposisi vitamin E dalam DALMS didominasi oleh tokotrienol sebesar 80% sedangkan tokoferol sebesar 20%.

Tabel 5.2 Kadar Komponen Bioaktif pada Distilat Asam Lemak Minyak Sawit dan Fraksi Tidak Tersabunkan

Komponen Bioaktif	DALMS (ppm)	DALMS* (ppm)	FTT (ppm)	FTT* (ppm)
Total Vitamin E	9.077,69	248,26	60.935,08	7.584,25
α -tokoferol	ND	ND	162,98	ND
α -tokotrienol	2.484,50	14,97	11.926,01	457,59
γ -tokotrienol	1.453,70	190,64	26.801,09	5.823,70
δ -tokotrienol	5.139,49	42,65	12.045,00	1.302,96
Total Tokotrienol	9.077,69	248,26	50.772,11	7.584,25
β -sitosterol	1.7243,53	6.643,72	5.640,61	202.956,63
Stigmasterol	5.038,00	3.780,03	19.052,90	115.780,19
Kampesterol	9.240,81	3.605,20	5.759,91	110.133,86
Total Fitosterol	31.522,34	1.4038,95	30.453,42	428.870,68
Skualen	49,45	2.1249,69	128,85	649.149,01

Sumber: *= Wulansari, 2017

Keterangan: DALMS = Distilat Asam Lemak Minyak Sawit; FTT = Fraksi Tidak Tersabunkan

Pada sampel FTT DALMS, kadar komponen bioaktif yang paling tinggi adalah vitamin E sebesar 60.935,08 ppm, dengan komposisi senyawa α -tokoferol (10.162,98 ppm), α -tokotrienol (11.926,01 ppm), γ -tokotrienol (26.801,09 ppm), serta δ -tokotrienol (1.2045,00ppm). Sedangkan komponen bioaktif yang terendah adalah skualen sebesar 128,85 ppm. Kadar kedua komponen tersebut mengalami peningkatan setelah disaponifikasi, berbeda dengan fitosterol yang justru mengalami penurunan menjadi 30.453,42 ppm namun tidak signifikan. Komposisi senyawa fitosterol diantaranya adalah β -sitosterol (5.640,61 ppm), stigmasterol (19.052,90 ppm), serta kampesterol (5.759,91 ppm). Peningkatan kadar bioaktif setelah saponifikasi diduga karena senyawa-senyawa yang mempunyai polaritas sama dengan pelarut heksana seperti sterol, tokotrienol,

tokoferol, hidrokarbon serta zat pigmen lainnya akan terlarut sehingga berada pada lapisan atas permukaan saat pemisahan terjadi atau disebut dengan fraksi tak tersabunkan. Sedangkan asam lemak bebas, gliserida dan fosfatida lainnya akan membentuk sabun dengan penambahan KOH serta akan terlarut pada pelarut etanol dan akuades sehingga berada pada lapisan bawah yang disebut dengan fraksi tersabunkan. Dalam penelitian Wulansari (2017) fitosterol juga mengalami peningkatan setelah saponifikasi serta kadarnya lebih besar dibandingkan dalam penelitian ini. Hal ini diduga karena dipengaruhi oleh proses penyimpanan (suhu dan lama penyimpanan) baik sebelum saponifikasi maupun setelah saponifikasi. Menurut Hammond, *et al.*, (2005) perbedaan komposisi penyusun fitosterol dapat dipengaruhi oleh jenis bahan baku dan kondisi proses pemurnian minyak sawit.

Tabel 5.3 Kadar Komponen Bioaktif pada Fraksi Kaya Tokotrienol dan Fraksi Kristal dari Kristalisasi I

Komponen Bioaktif	FKT (ppm)	FKT* (ppm)	FK (ppm)	FK** (ppm)
Total Vitamin E	232.136,85	21.8130,00	267.347,87	-
α-tokoferol	30.783,68	ND	61.177,02	-
α-tokotrienol	44.929,96	49.330,09	47.998,64	-
γ-tokotrienol	106.678,92	68.820,01	108.980,16	-
δ-tokotrienol	49.744,29	99.979,88	49.192,06	-
Total Tokotrienol	201.353,17	218.130,00	206.170,86	-
β-sitosterol	1.5261,46	-	22.113,00	25.000,00
Stigmasterol	34.178,11	-	93.252,79	33.000,00
Kampesterol	8.304,65	-	24.517,90	9.000,00
Total Fitosterol	57.744,22	-	139.883,69	67.000,00
Skualen	91,93	-	-	-

Sumber: * = Ahmadi dan Estiasih, 2011; ** = Wardhana, 2012

Keterangan: FKT = Fraksi Cair, Fraksi Kaya Tokotrienol; FK = Fraksi Kristal

Dari Tabel 5.3 terlihat bahwa kadar komponen bioaktif yang tertinggi pada sampel FKT DALMS adalah vitamin E, yaitu sebesar 232.136,85 ppm dengan komposisi senyawa α-tokoferol (30.783,68 ppm), α-tokotrienol (44.929,96 ppm), γ-tokotrienol (106.678,92 ppm), serta δ-tokotrienol (49.744,29 ppm). Hasil penelitian ini tidak berbeda dengan penelitian sebelumnya dimana total vitamin E sebesar 218.130,00 ppm, meskipun pada penelitian tersebut α-tokoferol belum

terdeteksi. Hal ini diduga karena pengaruh penyimpanan bahan baku, serta proses pemanasan menggunakan suhu tinggi saat deodorisasi dan saponifikasi.

Pada saat proses pemanasan tokoferol lebih intensif mengalami kerusakan dibandingkan tokotrienol karena memiliki tingkat kejenuhan yang lebih tinggi akibat jenis ikatan tunggal pada rantai sampingnya. Ng, *et al.*, (2004) menyebutkan bahwa tokotrienol merupakan antioksidan yang lebih efektif dibandingkan tokoferol karena memiliki distribusi yang lebih baik pada lapisan berlemak membran sel. Rantai samping tokotrienol yang tidak jenuh menyebabkan penetrasi pada lapisan lemak jenuh pada otak dan hati lebih baik.

Kadar komponen fitosterol FKT DALMS dalam penelitian ini adalah sebesar 57.744,22 ppm dengan komposisi senyawa penyusunnya adalah β -sitosterol (15.261,46 ppm), stigmasterol (34.178,11 ppm), serta kampesterol (8.304,65 ppm). Kadar total fitosterol dalam FKT tersebut mengalami peningkatan dibandingkan saat dalam bentuk DALMS maupun FTT. Hal ini diduga karena setelah kristalisasi I, senyawa-senyawa sterol (fitosterol) belum mengkristal secara maksimal sehingga masih terikut dalam pelarut heksana bersama vitamin E (tokoferol dan tokotrienol). Proses kristalisasi I yang belum maksimal tersebut diduga akibat pemberian suhu kristalisasi yang tidak stabil karena masih menggunakan alat freezer manual tanpa pengatur suhu digital. Menurut Ahmadi dan Estiasih (2011), suhu kristalisasi sangat menentukan keberhasilan pembentukan kristal. Jika suhu terlalu tinggi maka akan menyebabkan proses transfer panas dan transfer massa tidak maksimum sehingga pembentukan kristal terbatas. Sebaliknya jika suhu terlalu rendah maka senyawa-senyawa dengan kelarutan rendah akibat berada di bawah titik lelehnya akan bermigrasi pada inti kristal dan ikut mengkristal.

Pada sampel FK, kadar total vitamin E maupun fitosterol lebih tinggi dibandingkan sampel FKT. Kadar total komponen vitamin E dalam FK DALMS yaitu sebesar 267.347,87 ppm dengan komposisi senyawa α -tokoferol (61.177,02 ppm), α -tokotrienol (47.998,64 ppm), γ -tokotrienol (108.980,16 ppm), serta δ -tokotrienol (49.192,06 ppm). Dari hasil tersebut terlihat bahwa komposisi senyawa γ -tokotrienol adalah yang tertinggi. Hal ini sama dengan hasil penelitian Estiasih, *et al.*, (2013) yang menyebutkan bahwa komposisi vitamin E dalam minyak sawit adalah α -tokoferol (20%), α -tokotrienol (22%), γ -tokotrienol (46%) dan δ -tokotrienol (12%). Sementara kadar total fitosterol FK DALMS dalam penelitian ini adalah sebesar 139.883,69 ppm dengan komposisi senyawa β -

sitosterol (22.113,00 ppm), stigmasterol (93.252,79 ppm), serta kampesterol (24.517,90 ppm). FK merupakan fraksi kristal yang terbentuk dari proses kristalisasi tahap I pada suhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$ dengan tujuan memisahkan senyawa tokotrienol dari senyawa lainnya. Karena sifat tokotrienol yang lebih tidak jenuh maka titik bekunya diduga lebih rendah dari senyawa lainnya sehingga dapat dipisahkan dari tokoferol maupun fitosterol. Menurut Ahmadi dan Estiasih (2011), tokotrienol dan tokoferol memiliki sedikit perbedaan polaritas akibat perbedaan kejenuhan pada rantai samping struktur molekulnya. Perbedaan kejenuhan tersebut pun berpengaruh pada perbedaan titik bekunya. Namun dalam penelitian ini, kandungan vitamin E baik tokoferol maupun tokotrienol justru lebih tinggi pada sampel FK, artinya lebih banyak senyawa tokotrienol yang mengkristal. Hal ini diduga karena ketidakstabilan suhu kristalisasi sehingga sebagian senyawa tokotrienol justru ikut mengkristal bersama tokoferol dan fitosterol sedangkan sebagian lainnya tetap berada pada fraksi cairnya yang disebut sebagai fraksi kaya tokotrienol (FKT).

5.2 Optimasi Kristalisasi II untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol

Optimasi proses kristalisasi ke-II untuk separasi fraksi kaya fitosterol ini dilakukan menggunakan Response Surface Methodology (RSM) dengan rancangan Central Composite Design (CCD). Faktor yang digunakan adalah rasio pelarut terhadap kristal (v/b) serta lama kristalisasi ke-II (jam). Sedangkan respon yang dioptimalkan pada penelitian ini adalah kadar fitosterol (%).

Optimasi kristalisasi ke-II ini bertujuan untuk mendapatkan perlakuan yang paling optimum dengan kadar fitosterol tertinggi. Titik tengah dari perlakuan rasio pelarut:kristal serta lama kristalisasi ke-II berdasarkan perlakuan terbaik penelitian sebelumnya yaitu menggunakan rasio 8:1 selama 72 jam pada suhu $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Oleh karena itu dirancang titik batas atas dan bawah dari rasio pelarut:kristal yang digunakan adalah 6:1 dan 10:1. Sedangkan titik batas atas dan bawah perlakuan lama kristalisasi ke-II yaitu selama 48 jam dan 96 jam.

Hasil optimasi proses kristalisasi II pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil Optimasi Kristalisasi II pada Suhu Rendah untuk Separasi Fraksi Kaya Fitosterol

	Faktor	Satuan	Level		Alfa (α)	
			-1	+1	-1,414	+1,414
X ₁	Rasio Pelarut : Kristal	v/b	6:1	10:1	5,17	10,83
X ₂	Lama Kristalisasi II	Jam	48	96	38,06	105,94

Run	Variabel Kode		Variabel Nyata		Respon
	X ₁	X ₂	Pelarut:Kristal (v/b)	Lama Kristalisasi (jam)	Kadar Fitosterol (%)
1	-1	-1	6:1	48	39,49
2	+1	-1	10:1	48	65,03
3	-1	+1	6:1	96	45,34
4	+1	+1	10:1	96	39,67
5	-1,414	0	5,17:1	72	51,41
6	+1,414	0	10,83:1	72	28,49
7	0	-1,414	8:1	38,06	38,37
8	0	+1,414	8:1	105,94	44,97
9	0	0	8:1	72	47,95
10	0	0	8:1	72	57,08
11	0	0	8:1	72	65,38
12	0	0	8:1	72	62,03
13	0	0	8:1	72	43,18

Keterangan : variabel kode X₁ = rasio pelarut:kristal (v/b), X₂ = lama kristalisasi II (jam)

5.3. Analisa Permukaan Respon Kadar Fitosterol

5.3.1 Evaluasi Pemilihan Model Respon

Berdasarkan data hasil analisa permukaan terhadap respon kadar fitosterol, diketahui bahwa kadar fitosterol dari proses kristalisasi II berkisar antara 28,49% hingga 65,38%. Penentuan respon yang optimum dilakukan dengan cara memilih model respon yang paling tepat sesuai saran dari program Design Expert 7.0. Pemilihan model tersebut didasarkan pada evaluasi jumlah kuadrat dari urutan model (*sequential model sum of squares*), pengujian ketidaktepatan model (*lack of fit test*), ringkasan model statistik (*model summary statistics*).

a. Pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model (*sequential model sum of squares*)

Berikut ini adalah tabel yang menunjukkan data hasil pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat urutan model terhadap respon kadar fitosterol.

Tabel 5.5 Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Urutan Jumlah Kuadrat (*sequential model sum of squares*) terhadap Respon Kadar Fitosterol

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-value Prob > F	
Mean vs Total	30.376,46	1	30.376,46			Disarankan Tidak
Linier vs Mean	32,62	2	16,31	0,11	0.8982	Disarankan Tidak
2FI vs Linier	243,42	1	243,42	1,74	0.2198	Disarankan
Kuadratik vs 2FI	376,96	2	188,48	1,49	0.2881	Disarankan
Kubik vs Kuadratik	445,61	2	222,80	2,55	0.1726	Disarankan
Residual	437,23	5	87,45			
Total	31.912,29	13	2.454,79			

Berdasarkan data evaluasi jumlah kuadrat dari urutan model terlihat bahwa terdapat beberapa model yang dievaluasi diantaranya adalah model linear, 2F! (interaksi), kuadratik, serta model kubik. Dari Tabel 5.4 diketahui bahwa model yang disarankan oleh program adalah model kuadratik dengan nilai p-value sebesar 0,2881. Model yang disarankan oleh program tersebut menunjukkan bahwa model tersebut dapat berpengaruh terhadap respon kadar fitosterol.

b. Pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model (*lack of fit test*)

Berikut ini adalah tabel yang menunjukkan data hasil pemilihan model berdasarkan uji ketidaktepatan model terhadap respon kadar fitosterol.

Tabel 5.6 Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Uji Ketidaktepatan Model (*lack of fit test*) terhadap Respon Kadar Fitosterol

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-value Prob > F	
Linier	1.152,42	6	192,07	2,19	0.2340	Tidak Disarankan
2FI	909,00	5	181,80	2,07	0.2499	Tidak Disarankan
Kuadratik	532,05	3	177,35	2,02	0.2533	Disarankan
Kubik	86,44	1	86,44	0,99	0.3770	Tidak Disarankan
Pure Error	350,79	4	87,70			

Dari Tabel 5.6 diketahui bahwa uji ketidaktepatan model terhadap respon kadar fitosterol menunjukkan model yang disarankan adalah model kuadratik dengan p-value 0,2533. Sedangkan model yang tidak disarankan adalah model kubik dengan p-value 0,3770.

c. Pemilihan model berdasarkan ringkasan model statistik (*model summary statistics*)

Berikut ini adalah tabel yang menunjukkan data hasil pemilihan model berdasarkan ringkasan model statistik terhadap respon kadar fitosterol.

Tabel 5.7 Hasil Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Statistik (*model summary statistics*) terhadap Respon Kadar Fitosterol

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linier	12,26	0,0212	-0,1745	-0,7695	2.717,5815	Tidak Disarankan
2FI	11,83	0,1797	-0,0937	-0,9179	2.945,5078	Tidak Disarankan
Kuadratik	11,23	0,4252	0,0146	-1,8203	4.331,5584	Disarankan
Kubik	9,35	0,7153	0,3168	-2,9588	6.080,0793	Tidak Disarankan

Dari data hasil pemilihan model berdasarkan ringkasan model statistik diatas diketahui bahwa model yang disarankan oleh program adalah model kuadratik, dengan nilai Adjusted R-Squared, Predicted R-Squared, serta nilai PRESS masing-masingnya adalah sebesar 0,0146; -1,8203; dan 4.331,5584. sedangkan model yang tidak disarankan adalah model kubik.

5.3.2 Analisa Ragam dari Permukaan Respon

Berdasarkan hasil analisa pemilihan model, diketahui bahwa model kuadrat merupakan model terbaik untuk mengetahui hubungan antar variabel bebas, yaitu X_1 (rasio pelarut:kristal) dan X_2 (lama kristalisasi II) dengan respon Y (kadar fitosterol). Selain itu model kuadrat ini pun merupakan model yang paling tepat untuk mengetahui adanya pengaruh antara interaksi masing-masing variabel bebas maupun variabel bebas kuadrat, yaitu AB (rasio pelarut:kristal serta lama kristalisasi II), A^2 (rasio pelarut:kristal kuadrat) dan B^2 (lama kristalisasi II kuadrat) terhadap respon Y (kadar fitosterol) pada analisis ragam ANOVA.

Tabel 5.8 Hasil Analisis Ragam (ANOVA) pada Respon Kadar Fitosterol Model Kuadrat

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-Value Prob > F	
Model	652,99	5	130,60	1,04	0,4652	Tidak Signifikan*
A-Rasio Pelarut : Kristal	19,66	1	19,66	0,16	0,7048	Tidak Signifikan*
B-Lama Kristalisasi II	12,96	1	12,96	0,10	0,7579	Tidak Signifikan*
AB	243,42	1	243,42	1,93	0,2073	Tidak Signifikan*
A^2	245,71	1	245,71	1,95	0,2055	Tidak Signifikan*
B^2	179,64	1	179,64	1,42	0,2716	Tidak Signifikan*
Residual	882,84	7	126,12			
Lack of Fit	532,05	3	177,35	2,02	0,2533	Tidak Signifikan*
Pure Error	350,79	4	87,70			
Cor Total	1.535,83	12				

*Tidak Signifikan = $P\text{-value} > 0,05$

Berdasarkan Tabel 5.8, data analisis ragam (ANOVA) pada respon kadar fitosterol model kuadrat, diketahui bahwa variabel A (rasio pelarut:kristal), B (lama kristalisasi II), AB (interaksi rasio pelarut:kristal dengan lama kristalisasi), A^2 (rasio pelarut:kristal kuadrat) serta B^2 (lama kristalisasi II kuadrat) masing-masing memiliki P-Value yang lebih dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa faktor-faktor yang digunakan dalam penelitian ini tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon kadar fitosterol. Begitu pula jika menggunakan model lainnya seperti model 2F1, linear, maupun model kubik juga tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon kadar fitosterol. Menurut Chen *et al.*, (2005) model dengan nilai P ($P > F$) kurang dari 0,05 atau nilai P ($Prob > F$) kurang

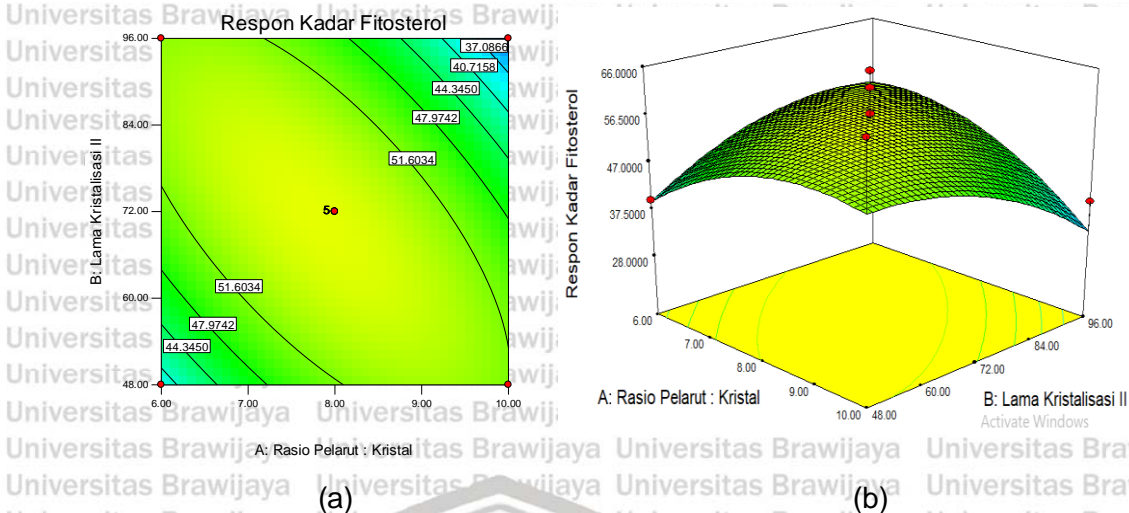
dari 5% ($P < 5\%$) dinyatakan signifikan. Sebaliknya jika nilai P ($P > F$) lebih dari 0,05 atau nilai P ($\text{Prob} > F$) lebih dari 5% ($P > 5\%$) maka dinyatakan tidak signifikan.

Meskipun demikian, model kuadratik merupakan model yang paling disarankan oleh program Design Expert untuk memperoleh nilai optimasi sehingga dapat diketahui prediksi nilai respon dari berbagai faktor. Sedangkan *lack of fit* pada tabel ANOVA diatas menunjukkan angka yang tidak signifikan, artinya diperoleh hasil ketidakcocokan atau nilai error yang rendah. Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) pada repon kadar fitosterol model kuadratik, diperoleh persamaan aktual sebagai berikut :

$$Y = -169,225 + 34,69X_1 + 2,52X_2 - 0,16X_1X_2 - 1,48X_1^2 - 8,82X_2^2$$

Keterangan : Y= respon kadar fitosterol; X₁ = rasio pelarut:kristal; X₂ = lama kristalisasi II

Bersadarkan persamaan diatas diketahui bahwa koefisien variabel X₁ (rasio pelarut:kristal) dan X₂ (lama kristalisasi II) bernilai positif, yang menunjukkan bahwa variabel-variabel tersebut memiliki hubungan positif dengan Y (respon kadar fitosterol) sehingga apabila semakin tinggi nilai variabel X₁ dan X₂ maka nilai Y pun cenderung semakin tinggi. Hal ini berkebalikan dengan koefisien variabel X₁X₂ (rasio pelarut:kristal dengan lama kristalisasi II), X₁² (rasio pelarut:kristal kuadrat) dan X₂² (lama kristalisasi II kuadrat) yang bernilai nilai negatif, artinya variabel-variabel tersebut memiliki hubungan negatif dengan Y (respon kadar fitosterol) sehingga semakin tinggi nilai variabel X₁X₂, X₁² dan X₂² maka nilai Y cenderung semakin rendah. Kontur plot dan kurva respon permukaan (3D) terhadap respon kadar fitosterol modek kuadratik dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 (a) Kontur plot; dan (b) Kurva respon permukaan (3D) respon kadar fitosterol model kuadratik

Peningkatan rasio pelarut:kristal menyebabkan nilai kadar fitosterol cenderung meningkat. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi rasio pelarut yang ditambahkan maka besarnya kontak pelarut dengan bahan (kristal) juga akan semakin tinggi. Selain itu, jumlah pelarut merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses ekstraksi atau separasi. Banyaknya pelarut yang digunakan akan mengurangi tingkat kejenuhan pelarut sehingga bahan akan terekstrak lebih optimal. Menurut Rifa'i *et al.*, (2018), semakin tinggi jumlah pelarut yang digunakan, maka pengeluaran senyawa target ke dalam pelarut pun dapat berjalan lebih optimal dan pelarut mengalami kejenuhan juga dapat dihindari. Ahmadi *et al.*, (2012) juga memaparkan bahwa rasio pelarut berkaitan dengan viskositas larutan yang dapat mempengaruhi proses transfer panas dan transfer massa. Jika viskositas rendah, maka larutan menjadi encer sehingga akan lebih mudah mentransfer massa dan panas yang diambil dari bahan. Namun jika viskositas larutan terlalu rendah yaitu 7:1 (larutan terlalu encer) maka akan menyulitkan recovery fraksi yang tidak mengkristal. Sebaliknya jika viskositas terlalu tinggi yaitu 5:1 maka larutan menjadi makin kental sehingga ruang gerak molekul terbatas dan mengakibatkan proses transfer massa dan transfer panas terhambat. Perbedaan tingkat kejenuhan dari senyawa yang ingin dipisahkan berkaitan dengan perbedaan titik leleh senyawa tersebut.

Selain rasio pelarut, lama kristalisasi II juga dapat mempengaruhi nilai kadar fitosterol, dimana semakin panjang lama kristalisasi II maka nilai kadar fitosterol pun akan cenderung tinggi. Hal ini diduga karena setiap proses

ekstraksi maupun separasi membutuhkan waktu hingga tercapainya suatu keadaan setimbang. Menurut Bustan, *et al.*, (2008) waktu kontak antara pelarut dengan partikel-partikel solid merupakan salah satu faktor penting dalam proses ekstraksi. Dalam hal ini terjadi perpindahan massa secara difusi pada bidang antar muka bahan ekstraksi dengan pelarut. Metode separasi dalam penelitian ini adalah kristalisasi lewat dingin (*supercooling crystallization*), dimana pembentukan kristal akan terjadi ketika cairan atau lelehan (lemak) telah melewati kondisi kesetimbangan yaitu lewat dingin.

Menurut Dewi (2012), pembentukan kristal dapat terjadi melalui pendinginan di bawah titik leleh suatu komponen atau penambahan komponen hingga dicapai kondisi lewat jenuh. Ketika suatu cairan atau larutan telah jenuh, terdapat termodinamika yang mendorong terjadinya proses kristalisasi. Dalam penelitian ini, senyawa yang ingin dipisahkan adalah fitosterol, dimana senyawa tersebut akan membentuk kristal (fase padat) karena memiliki titik beku yang lebih tinggi dibanding senyawa lainnya dalam larutan sampel. Sedangkan senyawa-senyawa yang memiliki titik beku yang lebih rendah cenderung akan terlarut dan tetap berada pada fraksi cairnya bersama pelarut heksana. Tokoferol memiliki titik beku sekitar 2,5-3,5°C sedangkan tokotrienol diduga memiliki titik beku lebih rendah dibandingkan tokoferol karena sifatnya yang lebih tidak jenuh.

Rasio pelarut serta lama kristalisasi kuadrat mempengaruhi nilai kadar fitosterol secara signifikan dimana semakin tinggi rasio pelarut dan lama kristalisasi kuadrat maka nilai kadar fitosterol akan meningkat hingga titik tertentu, yang disebut titik optimum. Kemudian setelah tercapainya titik optimum, maka nilai kadar fitosterol akan menurun seiring dengan meningkatnya rasio pelarut dan lama kristalisasi sehingga grafik yang diperoleh berbentuk parabola terbalik atau parabola yang terbuka ke bawah. Penurunan nilai kadar fitosterol akibat peningkatan rasio pelarut dan lama kristalisasi ini diduga karena telah tercapainya keadaan setimbang (*equilibrium state*) dalam proses separasi tersebut. Ketika pelarut terus dinaikkan dalam jumlah tertentu melewati titik optimumnya maka peningkatan nilai kadar fitosterol relatif kecil dan cenderung konstan. Hal ini ditegaskan oleh Teresa *et al.*, (2016) bahwa semakin banyak jumlah pelarut yang digunakan dapat menyebabkan nilai rendemen menurun karena kesetimbangan antara padat dan cair telah tercapai. Nilai rendemen tersebut tentu berpengaruh pada nilai kadar fitosterol yang terdapat di dalamnya.

Begitu pula pada lama kristalisasi yang semakin panjang hingga melewati titik optimumnya, maka akan cenderung menyebabkan nilai kadar fitosterol tidak semakin meningkat atau konstan. Molekul-molekul cenderung membentuk inti kristal pada waktu tertentu, kemudian akan mengatur diri kembali untuk membentuk klaster yang stabil serta mengorganisasikan diri membentuk matriks kristal di sekeliling inti kristal (Dewi, 2012). Pembentukan kristal ini akan terus berlangsung sampai tercapai kesetimbangan. Kristal akan terus tumbuh selama sistem masih berada dalam kondisi lewat jenuh atau lewat dingin serta molekul-molekulnya masih memiliki mobilitas yang tinggi untuk bergerak menuju matriks kristal (Ahmadi *et al.*, 2012). Secara garis besar, tahapan kristalisasi ini terbagi menjadi tiga, yaitu kondisi larutan lewat jenuh (*supersaturated state*); pembentukan inti kristal (*nucleation*); serta pertumbuhan molekul kristal hingga mencapai kesetimbangan (*crystal growth*).

Dewi (2012) memaparkan bahwa terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses kristalisasi diantaranya adalah kondisi lewat dingin larutan, suhu, sumber inti kristal, viskositas, kecepatan pendinginan, kecepatan agitasi, bahan tambahan dan pengotor, serta densitas massa kristal. Kondisi larutan yang semakin dingin bahkan lewat dingin (*supercooling*) akan menyebabkan waktu induksi semakin pendek. Waktu induksi merupakan waktu yang dibutuhkan hingga terbentuknya inti kristal. Dalam penelitian ini, waktu yang digunakan dalam proses kristalisasi ke-II bervariasi mulai dari 38,06 jam; 48 jam; 72 jam; 96 jam; hingga 105,94 jam. Penggunaan waktu yang bervariasi juga menghasilkan kadar fitosterol yang bervariasi pula. Kemudian saat terjadi penurunan suhu akan menginduksi pembentukan kristal secara cepat. Oleh karena itu, semakin rendah suhu maka kristal yang terbentuk pun akan semakin cepat dan banyak. Namun dalam penelitian ini, penggunaan suhu juga harus memperhatikan titik beku masing-masing komponen yang ingin dipisahkan karena perbedaan titik beku inilah yang menjadi dasar pemisahan senyawa tersebut. Suhu yang digunakan pada proses kristalisasi ke-I adalah $\pm -10^{\circ}\text{C}$ sedangkan suhu pada proses kristalisasi ke-II adalah $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Sumber inti kristal memiliki pengaruh terhadap pembentukan kristal. Inti kristal yg terbentuk secara heterogen memiliki kecenderungan proses kristalisasi terjadi lebih cepat. Namun dalam penelitian ini diharapkan kristal yang terbentuk bersifat homogen sehingga bisa diperoleh senyawa dengan kemurnian tinggi seperti pada sampel fraksi kaya tokotrienol (FKT) serta fraksi kaya fitosterol

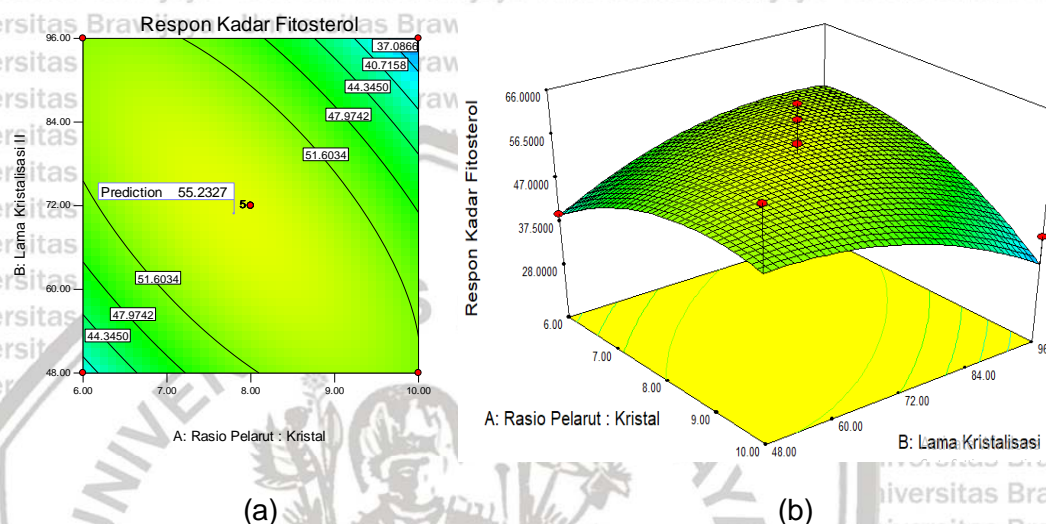
(FKF). Tetapi tidak menutup kemungkinan bahwa terdapat senyawa lain yang masih terikut di dalam fraksi tersebut. Selain itu, viskositas larutan juga menjadi faktor terjadinya proses kristalisasi. Ketika viskositas meningkat akibat menurunnya suhu dan konsentrasi larutan, proses pembentukan inti kristal akan terbatas. Hal ini disebabkan berkurangnya pergerakan molekul pembentuk inti kristal dan terhambatnya pindah panas sebagai energi pembentukan inti kristal. Viskositas ini terkait pada penggunaan jumlah rasio pelarut:kristal pada proses kristalisasi. Rasio pelarut:kristal yang digunakan pada proses kristalisasi ke-II dalam penelitian ini adalah 5,17:1; 6:1; 8:1; 10:1; serta 10,83:1 v/b.

Sistem pendinginan dalam proses kristalisasi merupakan salah satu faktor penting dalam keberhasilan proses tersebut. Sistem pendinginan yang cepat akan menghasilkan inti kristal yg lebih banyak dibandingkan pendinginan lambat. Proses kristalisasi dalam penelitian ini menggunakan freezer kulkas sehingga sistem pendinginannya tergolong pendinginan lambat dengan jumlah kristal yang dihasilkan sedikit. Selain itu, proses agitasi yang cepat mampu meningkatkan laju pembentukan inti kristal karena pindah massa dan pindah panas berjalan lebih efisien. Sebaliknya jika proses agitasi berjalan lambat maka proses pindah massa dan pindah panas menjadi tidak efisien sehingga inti kristal sulit terbentuk. Sedangkan densitas massa kristal berhubungan dengan jumlah kristal yg terdapat dalam satu unit volume yg terdapat dalam larutan. Hal ini akan berpengaruh pada tingkat pertumbuhan setiap kristal. Faktor lainnya adalah ada tidaknya bahan tambahan maupun pengotor yang dapat berperan untuk membantu atau menghambat pembentukan inti kristal.

5.4 Penentuan Titik Optimum Respon dan Verifikasi

Penentuan titik optimum menggunakan program Design Expert 7.0 dilakukan dengan cara menentukan kriteria masing-masing variabel bebas dengan respon yang diinginkan. Kriteria variabel bebas yang diinginkan adalah *in range* atau pada rentang tertentu, yaitu rasio pelarut:kristal antara 6:1 hingga 10:1 v/b sedangkan lama kristalisasi II antara 48 hingga 72 jam. Kriteria nilai respon kadar fitosterol yang diinginkan adalah *maximize* atau maksimal pada batas antara 28,49 – 65,38%. Berdasarkan hasil optimasi menggunakan Design Expert 7.0 diperoleh 1 solusi terbaik yang disarankan untuk menghasilkan respon yang paling optimum dengan *desirability* adalah 0,72. Nilai *desirability* dapat berkisar antara 0-1,0, yang mana nilai tersebut merupakan nilai yang

mengindikasikan kemampuan program dalam memberikan respon yang optimum sesuai dengan kriteria yang ditentukan (Raissi and Farzani, 2009). Oleh karena itu solusi formula yang disarankan ditunjukkan dengan nilai desirability yang tertinggi, yaitu mendekati nilai 1.0. Berdasarkan hasil optimasi menggunakan Design Expert 7.0 maka diperoleh juga grafik kontur dan kurva respon permukaan (3D) seperti pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 (a) Kontur plot; dan (b) Kurva respon permukaan (3D) titik optimum hasil prediksi menggunakan program Design Expert 7.0

Hasil optimasi prediksi program Design Expert 7.0 kemudian diverifikasi dengan melakukan penelitian kembali secara aktual berdasarkan solusi yang disarankan oleh program tersebut. Data solusi titik optimum serta hasil verifikasi aktual disajikan dalam Tabel 5.9.

Tabel 5.9 Data Solusi Titik Optimum dan Hasil Verifikasi

	Variabel Bebas		Respon	
	Rasio Pelarut:Kristal (g/ml)	Lama Kristalisasi II (jam)	Kadar Fitosterol (%)	Desirability
Prediksi	7,80:1	70,82	55,23	0,72
Verifikasi	7,80:1	70,82	48,74	
<i>P-Value</i>			0,00	

Berdasarkan Tabel 5.9 diketahui bahwa solusi titik optimum yang disarankan oleh Design Expert 7.0 untuk memperoleh respon yang optimal adalah nilai rasio pelarut:kristal sebanyak 7,80:1 dengan lama kristalisasi ke-II

yaitu 70,82 jam. Solusi titik optimum tersebut menghasilkan prediksi nilai respon kadar fitosterol sebesar 55,23% dengan hasil verifikasi secara aktual sebesar 48,74%. Selanjutnya dilakukan pengujian secara statistik dengan *paired t-test* menggunakan software Minitab 16 untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara nilai prediksi dibandingkan dengan hasil verifikasi. Hasil pengujian memberikan nilai p-value sebesar 0,00 (p-value kurang dari 0,05). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara nilai prediksi dibandingkan dengan hasil verifikasi, artinya hasil verifikasi melalui penelitian secara aktual masih kurang tepat. Selain itu diketahui bahwa nilai *desirability* adalah sebesar 0,72. Nilai tersebut masih kurang dari 0.8 yang menunjukkan bahwa pengambilan data tidak stabil. Hal ini dapat disebabkan karena suhu kristalisasi yang sulit dikondisikan dengan sistem pendinginan lambat serta tanpa pengatur suhu otomatis yang dapat menjaga kestabilan suhu dalam sampel. Ketidakstabilan suhu berpengaruh terhadap analisis data sehingga menjadi tidak konsisten.

5.5 Karakteristik Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum

5.5.1 Komponen Kimia Fraksi Kaya Fitosterol

Komponen kimia yang penting untuk diketahui diantaranya adalah kadar asam lemak bebas (%), bilangan peroksida (meq/kg), bilangan p-anisidin, serta total oksidasi karena beberapa parameter tersebut yang akan menentukan kualitas hasil separasi senyawa bioaktif. Sampel yang dianalisa meliputi sampel fraksi kaya fitosterol kondisi optimum (FKF optimum) serta fraksi cair dari fraksi kaya fitosterol kondisi optimum tersebut (FFKF). Nilai dari beberapa parameter yang dianalisa dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Berdasarkan Tabel 5.10 terlihat bahwa kadar ALB pada sampel FKF Optimum dan FFKF adalah masing-masing sebesar $2,51 \pm 0,03$ % dan $2,43 \pm 0,08$ %. Dalam penelitian sebelumnya, sampel DALMS, FKT, dan FKF memiliki kadar ALB berturut-turut sebesar $80,74 \pm 0,49$ % ; $0,09$ %; dan $76,16$ % sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar ALB dari hasil penelitian ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan sampel DALMS dan FKF namun masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan sampel FKT. Kadar ALB yang rendah secara signifikan ini disebabkan karena adanya proses saponifikasi yang telah dilakukan pada awal proses separasi. Albike *et al.*, (2016) menjelaskan bahwa proses saponifikasi merupakan reaksi yang terjadi ketika lemak atau minyak dicampur dengan larutan alkali (KOH), atau bisa disebut juga dengan proses pembuatan sabun

yang menghasilkan sintesa, air dan garam karbonil (sejenis sabun). Ada dua produk yang dihasilkan dalam proses ini yaitu sabun dan gliserin. Secara teknik, sabun merupakan hasil reaksi kimia antara asam lemak dan alkali. Proses saponifikasi ini dapat menurunkan kandungan asam lemak bebas sebesar 94–98%.

Tabel 5.10 Komponen Kimia Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum

Komponen Kimia	FKF Optimum	FFKF	DALMS*	FKT**	FKF**
Asam Lemak Bebas (%)	2,51 ± 0,03	2,43 ± 0,08	80,74 ± 0,49	0,09	76,16
Bilangan Peroksida (meq/kg)	2,49 ± 0,29	3,361 ± 0,38	4,74 ± 0,78	0,86	1,14
Bilangan p-Anisidin	2,34 ± 0,20	2,471 ± 0,29	2,79 ± 0,67	-	12,36
Total Oksidasi	8,43	9,192	12,27	-	14,64
Rendemen (%)	0,03	-	-	-	45,83

Sumber : * = Estiasih *et al.*, 2012; ** = Ahmadi dan Estiasih, 2011; *** = Wardhana, 2012

Keterangan: FKF = Fraksi Kaya Fitosterol; FFKF = Fraksi Cair dari Fraksi Kaya Fitosterol; FKT = Fraksi Kaya Tokotrienol; DALMS = Distilat Asam Lemak Minyak Sawit;

Menurut Rohman (2013), kadar ALB dapat dihitung dengan mengukur berapa banyak natrium hidroksida (NaOH) 0,1 N yang diperlukan untuk menetralkan kandungan asam lemak bebas pada larutan sampel. Asam lemak bebas pada penelitian ini dinyatakan dalam bentuk asam palmitat. Perbedaan kandungan ALB antara penelitian satu dengan lainnya dapat dipengaruhi oleh terjadinya reaksi hidrolisis maupun oksidasi akibat kontak dengan komponen pemicu reaksi selama proses separasi. Tinggi rendahnya kadar ALB juga dapat dipengaruhi oleh tingkat kandungan senyawa pengotor lain yang terdapat pada fraksi tidak tersabunkan seperti senyawa aldehid dan peroksida. Hal ini juga ditegaskan oleh Gunawan *et al.*, (2003), bahwa komponen lemak atau minyak mudah bereaksi oleh pemanasan, adanya air, terpapar udara, penyimpanan yang kurang baik dan enzim tertentu. Kandungan air dalam bahan pangan menyebabkan terhidrolisisnya komponen lemak atau minyak. Paparan udara dan suhu tinggi selama proses pengolahan produk pangan juga menyebabkan meningkatnya kadar asam lemak bebas akibat terjadinya reaksi oksidasi.

Bentuk dari oksidasi ditunjukkan dengan adanya kandungan senyawa aldehid, keton, alkohol, asam lemak dengan berat molekul ringan, hidrokarbon,

hasil dekomposisi peroksida dan pigmen pada minyak (Hammod *et al.*, 2005). Oksidasi pada komponen lemak atau minyak juga bisa diketahui dengan menganalisa bilangan peroksida dan p-anisidin sebagai indikator terjadinya oksidasi primer dan sekunder. Kandungan bilangan peroksida pada sampel FKF optimum adalah sebesar $2,498 \pm 0,29$ meq/kg, sedangkan pada sampel FFKF yaitu sebesar $3,361 \pm 0,38$ meq/kg. Pada penelitian sebelumnya, sampel DALMS, FKT serta FKF memiliki kandungan bilangan peroksida masing-masingnya sebesar $4,74 \pm 0,78$ meq/kg; $0,86$ meq/kg; dan $1,14$ meq/kg. Nilai bilangan peroksida terendah terdapat pada sampel FKT, meskipun demikian semua nilai tersebut tidak berbeda secara signifikan. Adapun adanya perbedaan nilai diduga karena terjadi kontak dengan oksigen, paparan cahaya serta kondisi penyimpanan selama proses separasi.

Menurut Ketaren (2005), bilangan peroksida merupakan indikator awal untuk mengetahui adanya kerusakan pada minyak atau lemak. Minyak atau lemak yang teroksidasi akan menghasilkan peroksida yang merupakan produk dari oksidasi primer. Tranggono dan Setiaji (1986) juga menjelaskan bahwa adanya kontak dengan oksigen akan menyebabkan terbentuknya hidroksiperoksida. Hidroksiperoksida ini mudah terdekomposisi menjadi asam-asam hidroksi, asam-asam keton dan aldehid. Penyebab dekomposisi hidroksiperoksida diantaranya adalah peningkatan suhu, adanya logam, adanya enzim-enzim tertentu, serta radiasi. Sedangkan menurut Raharjo (2006), meskipun tingginya bilangan peroksida mengindikasikan terjadinya kerusakan lemak atau minyak, namun pada angka yang lebih rendah tidak selalu berarti menunjukkan kondisi oksidasi yang masih dini. Bilangan peroksida yang rendah bisa disebabkan oleh laju pembentukan peroksida baru lebih kecil dibandingkan dengan laju degradasinya menjadi senyawa lain, mengingat bilangan peroksida cepat mengalami degradasi dan bereaksi menjadi senyawa lain.

Selain bilangan peroksida, dianalisa juga bilangan p-anisidin, dimana senyawa tersebut merupakan produk dari oksidasi sekunder. Bilangan p-anisidin pada sampel FKF Optimum adalah sebesar $2,34 \pm 0,20$ sedangkan pada sampel FFKF adalah sebesar $2,471 \pm 0,29$. Sementara DALMS dan FKF pada penelitian sebelumnya memiliki kandungan bilangan p-anisidin masing-masing sebesar $2,79 \pm 0,67$ dan $12,36$. Bilangan p-anisidin pada penelitian ini, baik FKF optimum maupun FFKF menunjukkan perbedaan nilai yang tidak signifikan jika dibandingkan dengan sampel DALMS namun jauh lebih rendah jika

dibandingkan dengan sampel FKF dari literatur. Hal ini diduga karena jumlah asam lemak yang terkandung dalam sampel dapat berperan sebagai prooksidan, dimana senyawa tersebut dapat memicu terjadinya reaksi oksidasi. Semakin tinggi kandungan asam lemaknya maka bilangan p-anisidin cenderung semakin tinggi pula. Menurut Shahidi dan Zhong (2005), bilangan p-anisidin merupakan parameter untuk mengetahui seberapa banyak senyawa aldehid yang terkandung dalam suatu bahan sebagai hasil oksidasi sekunder. Dengan kata lain analisa bilangan p-anisidin dilakukan untuk menghitung jumlah senyawa aldehid primer dan sekunder hasil dari dekomposisi peroksida dan untuk mengetahui derajat kerusakan lemak atau minyak karena oksidasi. Jumlah senyawa aldehid tersebut tergantung dari jumlah senyawa peroksida yang terkandung di dalamnya, keberadaan antioksidan, adanya prooksidan, serta kondisi penyimpanan.

Selain bilangan peroksida dan bilangan p-anisidin, nilai total oksidasi juga merupakan salah satu faktor penentu kualitas hasil ekstraksi atau separasi pada bahan yang mengandung komponen lemak atau minyak. Total oksidasi dapat diketahui dengan menggandakan nilai bilangan peroksida ditambah dengan nilai bilangan p-anisidin. Total oksidasi pada sampel FKF optimum dan FFKF adalah sebesar 8,43 dan 9,192. Sedangkan nilai total oksidasi pada sampel DALMS dan FKF yaitu sebesar 12,27 dan 14,64. Dari data tersebut dapat terlihat bahwa nilai total oksidasi pada penelitian ini lebih rendah dibanding dengan literatur. Hal ini diduga karena tinggi rendahnya kandungan lemak pada bahan yang dapat mempengaruhi nilai total oksidasi. Menurut Wulansari (2017), faktor-faktor yang dapat mempengaruhi nilai total oksidasi antara lain adalah tinggi rendahnya kandungan lemak pada bahan, proses pengolahan pada suhu tinggi yang dapat merusak ikatan rangkap pada komponen lemak, paparan oksigen maupun sinar yang dapat menyebabkan terjadinya oksidasi, serta kondisi penyimpanan yang kurang baik.

Salah satu faktor terpenting dalam proses separasi adalah nilai rendemen. Rendemen merupakan perbandingan antara produk hasil ekstraksi atau separasi yang diperoleh dengan bahan baku awal, yang dinyatakan dalam bentuk persen (%). Rendemen fitosterol pada penelitian ini adalah sebesar 0,03 % sedangkan pada penelitian Wardhana (2012) adalah sebesar 45,83 %. Perbandingan nilai kedua rendemen tersebut berbeda secara signifikan, dimana rendemen pada penelitian sebelumnya jauh lebih tinggi. Hal ini diduga karena masih terdapat

pengotor atau senyawa non fitosterol akibat proses separasi yang belum optimal. Selain itu, terjadinya fluktuasi suhu pada proses kristalisasi diduga mengakibatkan nilai rendemen rendah. Fluktuasi suhu merupakan perubahan suhu yang terjadi dalam suatu waktu. Hal ini dapat terjadi ketika pintu refrigerator dibuka dan ditutup kembali berkali-kali sehingga menyebabkan kenaikan suhu dan suhu kristalisasi menjadi tidak stabil. Ketidakstabilan suhu berpengaruh pada pembentukan inti kristal dan pertumbuhan kristal itu sendiri. Menurut Dewi (2012), penurunan suhu akan menginduksi pembentukan kristal secara cepat. Oleh karena itu, semakin rendah suhu maka kristal yang terbentuk pun akan semakin cepat dan banyak. Disamping itu, pada penelitian ini selalu dilakukan penyemprotan gas nitrogen hingga berat sampel konstan yang bertujuan untuk menguapkan sisa heksana sehingga sampel menjadi bebas pelarut. Akibatnya berat sampel mengalami penurunan, demikian pula pada nilai rendemennya. Persentase nilai rendemen dari bahan baku DALMS hingga dihasilkan FKF dapat dilihat pada Tabel 5.11.

Tabel 5.11 Persentase Nilai Rendemen pada Beberapa Sampel

Sampel	Berat (g)	Rendemen (%)
DALMS	34010	100
FTT	857,74	2,52
FK	348,20	1,02
FKF	8,60	0,03

Keterangan: DALMS = Distilat Asam Lemak Minyak Sawit; FTT = Fraksi Tidak Tersabunkan; FK = Fraksi Kristal; FKF = Fraksi Kaya Fitosterol

Dari Tabel 5.11 terlihat bahwa terjadi penurunan nilai rendemen seiring dengan bertambahnya perlakuan yang diberikan mulai bahan baku DALMS hingga produk akhir FKF. Penurunan yang terjadi sangat signifikan hingga 97,48% setelah DALMS disaponifikasi menghasilkan FTT. Hal ini dikarenakan sebagian besar kandungan DALMS adalah asam lemak bebas, yang mana ketika direaksikan dengan larutan basa (KOH 50%) dalam proses saponifikasi akan menghasilkan sabun dan disebut fraksi tersabunkan. Fraksi tersabunkan tersebut kemudian dipisahkan sehingga menyisakan fraksi tidak tersabunkan dengan jumlah yang sedikit. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ahmadi dan Estiasih (2011), disebutkan bahwa nilai rendemen FTT DALMS adalah sebesar 3,75%, lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian ini dengan nilai rendemen sebesar 2,52%. Meskipun demikian nilai rendemen tersebut masih cukup tinggi. Hui (1996) menyebutkan bahwa kandungan FTT dari DALMS

berkisar antara 1,6 – 3,7%. Hal ini menunjukkan bahwa nilai rendemen pada penelitian ini telah sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Selanjutnya setelah proses kristalisasi I terjadi penurunan nilai rendemen kembali sebesar 1,50% dari FTT menjadi FK. Dan yang terakhir penurunan nilai rendemen dari FK menjadi FKF adalah sebesar 0,99% setelah melalui proses kristalisasi II. Hal ini menunjukkan proses kristalisasi berjalan cukup baik karena nilai rendemen pada kristalisasi II mendekati nilai rendemen pada kristalisasi I. Menurut Pinalla (2011), parameter keberhasilan kristalisasi bertingkat dapat dilihat dari jumlah kristal yang terbentuk mendekati jumlah kristal sebelum rekristalisasi (tidak banyak kristal yang hilang), yang artinya rekristalisasi berjalan efisien.

5.5.2 Komponen Bioaktif Fraksi Kaya Fitosterol

Komponen bioaktif yang terkandung dalam FKF DALMS kondisi optimum diantaranya adalah α -tokoferol, α -tokotrienol, γ -tokotrienol, δ -tokotrienol, β -sitosterol, Stigmasterol, Kampesterol, serta skualen. Sampel yang dianalisa meliputi fraksi kaya fitosterol kondisi optimum (FKF Optimum) serta fraksi cair dari fraksi kaya fitosterol tersebut (FFKF). Kadar dari senyawa-senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.11.

Tabel 5.12 Komponen Bioaktif Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum

Komponen Bioaktif	FKF Optimum (ppm)	FFKF (ppm)	FKF* (ppm)
Total Vitamin E	60.161,41	31.196,57	-
α -tokoferol	4.708,07	7.719,98	-
α -tokotrienol	33.855,16	4.661,38	-
γ -tokotrienol	7.712,78	12.052,32	-
δ -tokotrienol	13.885,39	6.762,88	-
Total Tokotrienol	55.453,34	23.476,58	-
β -sitosterol	183.455,78	5.302,55	11.400,00
Stigmasterol	333.105,92	11.652,94	109.100,00
Kampesterol	129.879,45	991,69	58.500,00
Total Fitosterol	487.457,32	17.947,18	179.000,00
Skualen	117,70	-	-

Sumber : * = Wardhana, 2012

Keterangan: FKF = Fraksi Kaya Fitosterol; FFKF = Fraksi Cair dari Fraksi Kaya Fitosterol

Dari Tabel 5.11 terlihat bahwa sampel FKF pada kondisi optimum mengandung total vitamin E sebesar 60.161,41 ppm dengan komposisi kadar α -tokoferol sebanyak 4.708,07 ppm; α -tokotrienol 33.855,16 ppm; γ -tokotrienol 7.712,78 ppm; serta δ -tokotrienol sebanyak 13.885,39 ppm. Kadar total vitamin E tersebut lebih tinggi dibandingkan total vitamin E dari sampel FFKF yaitu sebesar 31.196,57 ppm, dengan komposisi kadar α -tokoferol sebanyak 7.719,98 ppm; α -tokotrienol 4.661,38 ppm; γ -tokotrienol 12.052,32 ppm; serta δ -tokotrienol sebanyak 6.762,88 ppm. Sementara jika dibandingkan dengan total vitamin E pada sampel FKT DALMS yaitu sebesar 232.136,85 ppm, terlihat bahwa kadar total vitamin E sampel FKF DALMS kondisi optimum ini lebih rendah secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa proses kristalisasi I untuk mendapatkan FKT DALMS sudah cukup efektif utamanya dalam separasi senyawa tokotrienol. Selama proses kristalisasi I terjadi pemisahan komponen senyawa berdasarkan titik bekunya akibat kondisi lewat dingin, dimana senyawa tokotrienol akan tetap terlarut dalam heksana karena diduga memiliki titik beku lebih rendah akibat sifatnya yang lebih tidak jenuh. Disamping itu, jika dibandingkan dengan sumber nabati lainnya, FKF DALMS kondisi optimum ini memiliki kadar total vitamin E yang lebih tinggi dibanding bekatul (300 ppm), biji-bijian (84-318 ppm), berry (56-140 ppm), dan minyak zaitun (100-270 ppm) (Xu *et al.*, 2001; Kallio *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2006).

Selain vitamin E, terdapat komponen fitosterol dalam sampel FKF DALMS dengan kadar tertinggi dibanding komponen bioaktif lainnya. Fitosterol ini termasuk dalam kelompok steroid alkohol, yang terdapat secara alami di dalam tumbuhan namun tidak dapat ditemukan pada mamalia. Kadar total fitosterol pada sampel FKF DALMS kondisi optimum adalah sebesar 487.457,32 ppm dengan kadar β -sitosterol sebanyak 183.455,78 ppm; stigmasterol 333.105,92 ppm; serta kampesterol 129.879,45 ppm. Kadar fitosterol tersebut jauh lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kadar fitosterol dari sampel FFKF yang hanya sebesar 17.947,18 ppm dengan komposisi β -sitosterol sebanyak 5.302,55 ppm; stigmasterol 11.652,94 ppm; serta kampesterol 991,69 ppm. Kadar total fitosterol FKF DALMS kondisi optimum juga lebih tinggi jika dibandingkan dengan literatur diatas maupun dari sumber lain seperti *mustard oil* 64 mg/g (64.000 ppm), *corn oil* 23 mg/g (23.000 ppm), *soybean oil* 9 mg/g (9.000 ppm), *rapeseed oil* 5 mg/g (5.000 ppm), serta *coconut oil* 0,8 mg/g (800 ppm) (Sabir *et al.*, (2003);

Estiasih dan Ahmadi, 2018). Tingginya kadar fitosterol tersebut menunjukkan bahwa kondisi kristalisasi II pada penelitian ini cukup optimum untuk menghasilkan kadar fitosterol yang maksimum.

Senyawa bioaktif lainnya yang terkandung dalam sampel FKF DALMS kondisi optimum adalah skualen. Skualen merupakan natural lipid yang termasuk dalam golongan triterpen hidrokarbon, yang mana senyawa tersebut mengandung 6 buah isoprene (Vazquez *et al.*, 2007). Kadar skualen pada sampel FKF DALMS kondisi optimum ini cukup rendah yaitu sebesar 117,70 ppm. Berbeda dengan kadar skualen dari penelitian sebelumnya yaitu sebesar 418,31 ppm (Norhidayah *et al.*, 2011), 1.092,38 ppm (Zulkifli 2014), 2.373,27 ppm pada sampel DALMS serta 323.000 ppm pada sampel FTT DALMS (Estiasih *et al.*, 2014). Rendahnya kadar skualen pada penelitian ini diduga karena sampel mengalami oksidasi akibat penyimpanan yang terlalu lama sebelum dianalisa. Meskipun demikian kadar skualen dari FKF DALMS ini masih lebih tinggi dari sumber lain. Bahttachrjee dan Shingal (2003) menyatakan bahwa kandungan skualen pada minyak nabati lain seperti minyak zaitun dan minyak biji gandum sekitar 0,1% hingga 0,7%.

Proses kristalisasi bertingkat dalam penelitian ini cukup memberi pengaruh terhadap peningkatan kadar bioaktif pada produk akhir utamanya pada peningkatan kadar fraksi kaya fitosterol. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.13.

Tabel 5.13 Perbandingan Kadar Fitosterol pada Kristalisasi I dan II

Sampel	Total Fitosterol (ppm)	(%)
FK*	139.883,69	13,98
FKF**	487.457,32	48,74

Keterangan: FK = Fraksi Kristal, hasil dari kristalisasi I; FKF = Fraksi Kaya Fitosterol, hasil dari kristalisasi II

Dari Tabel 5.13 terlihat bahwa terjadi kenaikan kadar total fitosterol dari 139.883,69 ppm menjadi 487.457,32 ppm. Ini menunjukkan terjadi peningkatan sebesar 28,68%. Peningkatan kadar fitosterol tersebut diduga karena senyawa

non fitosterol yang mengkristal pada kristalisasi I tidak ikut mengkristal pada kristalisasi II akibat perbedaan titik beku antara senyawa-senyawa tersebut.

Secara teori, pada saat proses kristalisasi I senyawa fitosterol membentuk kristal bersama dengan senyawa tokoferol pada suhu $\pm -10^{\circ}\text{C}$. Sedangkan senyawa tokotrienol tetap berada pada fraksi cairnya yang disebut fraksi kaya tokotrienol (FKT). Kemudian pada proses kristalisasi II senyawa fitosterol kembali mengkristal menjadi fraksi kaya fitosterol (FKF) pada suhu $\pm 5^{\circ}\text{C}$ sedangkan

senyawa tokoferol tetap berada pada fraksi cairnya. Oleh karena itu kadar total fitosterol semakin meningkat setelah kristalisasi II.

5.6 Jenis Asam Lemak

Salah satu produk oleokimia yang dapat diperoleh dari minyak sawit adalah asam lemak. Asam lemak disusun oleh rangkaian karbon dan merupakan unit pembangun yang sifatnya khas untuk setiap lemak. Ikatan antara karbon yang satu dengan yang lainnya pada asam lemak dapat berupa ikatan jenuh dan dapat pula berupa ikatan tidak jenuh/ rangkap. Asam lemak disebut juga asam alkanoat atau asam karboksilat. Secara umum rumus molekulnya adalah $C_nH_{2n}O_2$ dan rumus umumnya adalah R-COOH dan rumus bangunnya adalah mempunyai gugus fungsi R-C-OH (Maulinda *et al.*, 2017).

Asam lemak merupakan komponen penyusun lipid yang memiliki bentuk berupa kepala dan ekor. Kepala asam lemak berupa gugus karboksil yang diberi nomor karbon 1 dan ekor berupa senyawa hidrokarbon jenuh atau tak jenuh. Karbon setelah gugus karboksil diberi nomor 2, 3, 4 dan seterusnya. Asam lemak memiliki karbon sekitar 4 sampai 36. Adanya ikatan rangkap pada rantai karbon penyusun asam lemak sering dilambangkan dengan Δ (delta) yang diikuti dengan nomor karbon yang memiliki ikatan rangkap. Asam lemak diklasifikasikan dalam dua kelompok besar yaitu asam lemak jenuh (*saturated fatty acid*) dan asam lemak tidak jenuh (*unsaturated fatty acid*) (Anonim, 2018).

Menurut Jacob, *et al.*, (2015), asam lemak jenuh (Saturated Fatty Acid/ SFA) merupakan asam lemak yang mengandung ikatan tunggal pada rantai hidrokarbonnya seperti asam kaproat, laurat, miristat dan palmitat. Sedangkan asam lemak tak jenuh digolongkan menjadi 3 berdasarkan jumlah ikatan rangkapnya, yaitu asam lemak tak jenuh tunggal (Monounsaturated Fatty Acid/ MUFA) dan asam lemak tak jenuh majemuk (Polyunsaturated Fatty Acid/ PUFA). MUFA merupakan asam lemak yang mengandung ikatan rangkap sebanyak satu pada rantai hidrokarbonnya seperti asam oleat (omega-9). Sedangkan PUFA merupakan asam lemak yang mengandung ikatan rangkap lebih dari satu pada rantai hidrokarbonnya seperti omega 6 (asam lenoleat, Conjugated Linoleic Acid (CLA), Glucopyranocyl Lipid Adjuvant (GLA), dan asam arachidonat); omega 3 (asam linolenat, Eicosapentaenoic Acid (EPA) dan Docosahexaenoic Acid (DHA)); serta golongan Eicosanoid yang terdiri dari 20 karbon misalnya prostanoat, leukotrien (LTs) dan lipoksin (LXs). Prostanoat meliputi prostaglandin (PGs), prostasiklin (PGIs) dan tromboksan (TXs). Sartika (2008), juga

menyebutkan bahwa asam lemak tak jenuh dapat digolongkan menjadi 3 berdasarkan jumlah atom karbonnya, yaitu asam lemak rantai pendek (Short Chain fatty Acid/ SCFA) yang mempunyai 2-4 atom karbon; asam lemak rantai sedang (Medium Chain Fatty Acid/ MCFA) yang mempunyai 6-12 atom karbon, serta asam lemak rantai panjang (Long Chain Fatty Acid/ LCFA) dengan jumlah atom karbon lebih dari 12. Titik cair asam lemak meningkat dengan bertambah panjangnya rantai karbon.

Asam lemak jenuh tidak peka terhadap oksidasi dan pembentukan radikal bebas karena tidak memiliki ikatan rangkap. Efek dominan dari asam lemak jenuh adalah peningkatan kadar kolesterol total dan K-LDL (Kolesterol LDL).

Secara umum makanan yang berasal dari hewani (daging berlemak, keju, mentega dan krim susu) selain mengandung asam lemak jenuh juga mengandung kolesterol. Setiap 4 (empat) ons daging sapi atau daging ayam mengandung 100 mg kolesterol dan asam lemak jenuh dapat meningkatkan kadar K-LDL. Asam lemak jenuh selain banyak ditemukan pada lemak hewani juga terdapat pada minyak kelapa, kelapa sawit serta minyak nabati lainnya yang bisa dipakai untuk menggoreng (meskipun pada mulanya berasal dari asam lemak jenuh). Sebaliknya dengan asam lemak jenuh, asam lemak tidak jenuh dapat berpengaruh untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah, baik itu MUFA maupun PUFA. Namun beberapa penelitian menyatakan bahwa MUFA memiliki sifat lebih stabil dan efek yang lebih baik dibandingkan PUFA sehingga lebih populer untuk dimanfaatkan dalam formulasi makanan olahan. MUFA banyak ditemukan pada minyak zaitun, minyak kedelai, minyak kacang tanah, minyak biji kapas dan kanola. Sedangkan PUFA banyak ditemukan pada minyak ikan dan minyak nabati seperti biji bunga matahari, jagung, biji-bijian serta kacang-kacangan lainnya (Sartika, 2008).

5.6.1 Fraksi Kaya Tokotrienol

Analisa jenis asam lemak pada penelitian ini dilakukan menggunakan alat GC-MS di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Gadjah Mada pada sampel fraksi kaya tokotrienol (FKT) dan fraksi kaya fitosterol kondisi optimum (FKF). Jenis asam lemak yang terdeteksi ditunjukkan oleh beberapa peak yang muncul pada kromatogram GCMS. Terdapat 10 peak yang muncul pada sampel FKT dengan persentasi yang bervariasi. Dari kesepuluh peak tersebut tujuh diantaranya merupakan asam lemak sedangkan tiga lainnya merupakan golongan monoterpen (*Calarene/ Beta-Gurjune*), sesquiterpen (*Caryophyllene*

oxide) serta asam karboksilat (*1,2-benzenedicarboxylic acid*). Beberapa jenis asam lemak yang terdeteksi terkandung dalam sampel FKT diantaranya adalah *dodecanoic acid/ lauric acid/ asam laurat, decanoic acid/ capric acid/ asam kaprat, 9-hexadecenoic acid/ palmitelaidic acid/ asam palmitoleat, hexadecanoic acid/ palmitic acid/ asam palmitat, 9-octadecenoic acid/ oleic/ asam oleat, octadecanoic acid/ stearic acid/ asam stearat, serta 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid/ arachidonic acid/ asam arakidonat*. Profil asam lemak pada sampel FKT dapat dilihat pada Tabel 5.14.

Tabel 5.14 Profil Asam Lemak Fraksi Kaya Tokotrienol

Nama Senyawa	Golongan	Rumus Molekul	BM (g/mol)	SI	%
<i>Dodecanoic acid/ Lauric acid/ Asam Laurat</i>	SFA	$C_{12}H_{24}O_2$	200,32	89	0,28
<i>Decanoic acid/ Capric acid/ Asam Kaprat</i>	SFA	$C_{10}H_{20}O_2$	172,26	93	1,08
<i>9-Hexadecenoic acid/ Palmitelaidic acid/ Asam Palmitoleat</i>	MUFA	$C_{16}H_{30}O_2$	254,41	91	1,11
<i>Hexadecanoic acid/ Palmitic acid/ Asam Palmitat</i>	SFA	$C_{16}H_{32}O_2$	256,42	93	28,34
<i>9-Octadecenoic acid/ Oleic acid/ Asam Oleat</i>	MUFA	$C_{18}H_{34}O_2$	282,5	93	61,27
<i>Octadecanoic acid/ Stearic acid/ Asam Stearat</i>	SFA	$C_{18}H_{36}O_2$	284,5	95	5,63
<i>5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid/ Arachidonic acid/ Asam Arakidonat</i>	PUFA	$C_{20}H_{32}O_2$	304,5	84	0,51

Keterangan: SFA = *Saturated Fatty Acid/ Asam Lemak Jenuh*; MUFA = *Monounsaturated Fatty Acid/ Asam Lemak Tidak Jenuh Tunggal*; PUFA = *Polyunsaturated Fatty Acid/ Asam Lemak Tak Jenuh Majemuk*

Dari Tabel 5.14 terlihat bahwa kadar asam lemak tertinggi ditunjukkan oleh asam oleat yaitu sebanyak 61,27%, kemudian disusul oleh asam stearat

sebanyak 5.63%, asam palmitat sebanyak 28,34%, asam palmitoleat sebanyak 1,11%, asam kaprat sebanyak 1,08%, asam arakidonat sebanyak 0,51%, serta asam lemak terendah ditunjukkan oleh asam laurat sebanyak 0,28%. Sementara Ketaren (2008) menyebutkan bahwa beberapa jenis asam lemak yang terkandung dalam minyak kelapa sawit diantaranya adalah asam miristat (1,1-2,5%), asam palmitat (40-46%), asam stearat (3,6-4,7%), asam oleat (39-45%), serta asam linoleat (7-11%). Hal ini menunjukkan bahwa kandungan asam lemak utamanya asam oleat dalam sampel FKT cukup tinggi hingga lebih dari 60%. Perbedaan kandungan jenis asam lemak serta persentasinya dalam bahan diduga karena perbedaan jenis bahan baku atau sampel yang dianalisa, metode analisa, proses pengolahan atau pemanasan serta proses penyimpanan.

5.6.2 Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum

Fraksi Kaya Fitosterol (FKF) pada kondisi optimum dianalisa menggunakan GC-MS untuk mengetahui komposisi jenis asam lemak yang terkandung di dalamnya. Hasil analisa berupa kromatogram menunjukkan bahwa terdapat empat peak yang muncul, dimana masing-masing peak mewakili keberadaan asam lemak tertentu. Beberapa asam lemak yang berhasil dideteksi antara lain adalah *pentadecanoic acid*/ asam pentadekanoat, *octadecanoic acid*/ *stearic acid*/ asam stearat, *11-octadecenoic acid*/ *oleic acid*/ asam oleat, serta *tetradecanoic acid*/ *myristic acid*/ asam miristat. Profil asam lemak dalam sampel FKF kondisi optimum dapat dilihat pada Tabel 5.15.

Dari Tabel 5.15 terlihat bahwa kadar asam lemak tertinggi dalam sampel FKF kondisi optimum adalah asam oleat sebanyak 59,51%, kemudian diikuti oleh asam stearat sebanyak 38,20%, asam miristat sebanyak 1,66%, serta kadar terendah ditunjukkan oleh asam pentadekanoat sebanyak 0,62%. Ketaren (2008) menyebutkan bahwa keberadaan asam oleat dalam minyak kelapa sawit kira-kira sebanyak 39-45%, asam stearat sebanyak 3,6-4,7%, serta asam miristat sebanyak 1,1-2,5%. Selain itu jika dibandingkan dengan kadar asam oleat dari sumber nabati lainnya seperti PKO (13-19%), minyak kelapa (5-8%), minyak kedelai (11-60%), minyak biji bunga matahari (asam oleat 2-35%) serta minyak biji kapas (22,9%), menunjukkan bahwa kandungan asam oleat dalam sampel FKF kondisi optimum cukup tinggi sehingga berpotensi sebagai sumber asam lemak utamanya adalah sumber asam oleat.

Tabel 5.15 Profil Asam Lemak Fraksi Kaya Fitosterol Kondisi Optimum

Nama Senyawa	Golongan	Rumus Molekul	BM (g/mol)	SI	%
<i>Pentadecanoic acid/ Asam Pentadekanat</i>	SFA	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242,4	90	0,62
<i>Octadecanoic acid/ Stearic acid/ Asam Stearat</i>	SFA	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,5	95	38,20
<i>11-Octadecenoic acid/ Oleic acid/ Asam Oleat</i>	MUFA	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,5	94	59,51
<i>Tetradecanoic acid/ Myristic acid/ Asam Miristat</i>	SFA	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,37	89	1,66

Keterangan: SFA = *Saturated Fatty Acid/ Asam Lemak Jenuh*; MUFA = *Monounsaturated Fatty Acid/ Asam Lemak Tidak Jenuh Tunggal*

Asam oleat sendiri merupakan asam lemak dengan satu ikatan rangkap [C18:1 (ω-9)] yang banyak memiliki sifat fungsional dalam tubuh seperti berperan sebagai imunomodulator, pencegahan dan terapi beberapa penyakit kardiovaskuler dan gangguan metabolisme, mengurangi inflamasi, memodulasi aktivitas leukosit, menghambat aktivitas bakteri dan jamur, menghambat proliferasi sel kanker dan ekspresi oncogenes, mengurangi tekanan darah, mengontrol efek penyakit autoimun serta membantu menutup luka pada kulit. Dalam proses membantu penyembuhan luka, asam oleat (ω-9) dapat berperan lebih aktif dibandingkan ω-6 maupun ω-3 pada tikus yang diinduksi oleh nitric oxide (NO) dalam jumlah yang tinggi saat 3 jam dan 48 jam setelah pembedahan. Selanjutnya pada hari ke-5 dan 10 setelah pembedahan tersebut, luka pada kelompok tikus yang diterapi dengan asam oleat menunjukkan luas area luka yang lebih kecil dibandingkan kelompok tikus yang diterapi dengan ω-3 maupun ω-6 meskipun ω-6 memiliki edema yang lebih kecil dibanding ω-3 (Campos, *et al.*, 2013).

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini diantaranya adalah:

1. Teknik kristalisasi bertingkat pada suhu rendah dapat digunakan untuk mengisolasi fraksi kaya fitosterol (FKF) dari DALMS dengan rancangan metode optimasi pada proses kristalisasi II. Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi rasio pelarut yang digunakan maka kadar fitosterol pun akan semakin meningkat. Namun pada titik tertentu kadar fitosterol akan semakin menurun ketika rasio pelarut terus ditingkatkan. Begitu pula dengan faktor lama kristalisasi yang digunakan. Semakin lama proses kristalisasi berlangsung maka kadar fitosterol pun akan semakin meningkat. Namun pada titik tertentu kadar fitosterol akan semakin menurun ketika lama waktu kristalisasi terus dilanjutkan. Kondisi yang disarankan oleh Design Expert dalam proses kristalisasi II ini adalah menggunakan rasio pelarut:kristal sebanyak 7,81:1 dengan lama kristalisasi 70,82 jam sehingga menghasilkan kadar fitosterol sebesar 48,74%. Meskipun demikian proses kristalisasi pada penelitian ini belum mencapai titik optimum karena nilai *desirability* masih kurang dari 0,8.
2. Hasil analisa komponen kimia dari fraksi kaya fitosterol (FKF) kondisi optimum yaitu kadar asam lemak bebas $2,51 \pm 0,03$ %; kadar bilangan peroksida $2,498 \pm 0,29$ meq/kg; bilangan p-anisidin $2,34 \pm 0,20$; total oksidasi 8,43; serta rendemen sebanyak 0,03%.
3. Hasil analisa komponen bioaktif menggunakan HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) dari fraksi kaya fitosterol (FKF) kondisi optimum yaitu total vitamin E sebanyak 60.161,41 ppm dengan komposisi senyawa α -tokoferol (4.708,07 ppm); α -tokotrienol (33.855,16 ppm); λ -tokotrienol (7.712,78 ppm); dan δ -tokotrienol (13.885,39 ppm). Total fitosterol sebanyak 487.457,32 ppm dengan komposisi senyawa β -sitosterol (183.455,78 ppm); stigmasterol (333.105,92 ppm); dan kampesterol (129.879,45 ppm). Sedangkan kadar skualen sebanyak 117,70 ppm.
4. Hasil analisa jenis asam lemak menggunakan GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry*) dari fraksi kaya tokotrienol (FKT) antara lain asam oleat 61,27%; asam stearat 5,63%; asam palmitat 28,34%; asam palmitoleat 1,11%; asam kaprat 1,08%; asam arakidonat 0,51%; serta asam laurat 0,28%. Sedangkan asam lemak yang terdeteksi dalam fraksi kaya fitosterol

(FKF) kondisi optimum yaitu asam oleat 59,51%; asam stearat 38,20%; asam miristat 1,66%; serta asam pentadekanoat 0,62%. Kandungan asam lemak tertinggi baik pada sampel FKT maupun FKF kondisi optimum adalah asam oleat.

6.2 Saran

Saran dari penelitian ini diantaranya adalah:

1. Perlu dilakukan pengkajian optimasi suhu kristalisasi II serta faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi proses kristalisasi agar diperoleh kadar fraksi kaya fitosterol yang lebih maksimum.
2. Perlu dipertimbangkan penggunaan alat khusus untuk kristalisasi dengan sistem pendinginan cepat agar pembentukan kristal lebih maksimal dan rendemen menjadi lebih banyak.
3. Perlu dipertimbangkan juga pemberian pengatur suhu digital untuk menjaga kestabilan suhu kristalisasi dalam sampel.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, K. 1997. **Aktivasi Zeolit Alam dan Penggunaannya untuk Pemurnian Tokoferol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit**. Tesis. Program Pascasarjana UGM. Yogyakarta
- Ahmadi, K. dan Estiasih, T. 2011. **Optimasi Kondisi Kristalisasi Pada Pembuatan Fraksi Kaya Tokotrienol Dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit**. AGRITECH, 31 (3): 171-179
- Ahmadi, K., Kumalaningsih, S., Wijana, S., dan Santoso, I. 2012. **Optimizing Vitamin E Purification from Unsaponifiable Matter of Palm Fatty Acids Distillate by Low Temperature Solvent Crystallization**. Journal of Food Science and Engineering 2 : 557-563
- Ahmadi, K., Wulansari, S., Subroto, Y., dan Estiasih, T. 2017. **Protective Effect of Food Products Enriched with Unsaponifiable Matter from Palm Fatty Acid Distillate on the Aorta of Hypercholesterolemic Rats**. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 7 (12) : 090-096
- Akoh, C.C., dan David, B. 1998. **Food Lipids: Chemistry, Nutritional and Biotechnology**. Marcell Dekkers, Inc. New York
- Albike, R.D., Estiasih, T., Maligan, J.M. 2016. **Fraksi Tidak Tersabunkan (FTT) dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) sebagai Sumber Antioksidan : Kajian Pustaka**. Jurnal Pangan dan Agroindustri, 4 (2) : 494-498
- Almatsier, S. 2006. **Prinsip Dasar Ilmu Gizi**. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Andayani, Y. 2003. **Mekanisme Aktivitas Antihiperlikemik Ekstrak Buncis (*Phaseolus vulgaris* Linn.) pada Tikus Diabetes dan Identifikasi Komponen Aktif**. Disertasi. Program Pascasarjana Institt Pertanian Bogor. Bogor
- Anonim. 2018. **Lipid**. Modul Lipid Jilid 1: 45-55 Universitas Islam Indonesia. <https://diploma.chemistry.uii.ac.id/wpcontent/uploads/2018/01/4.Lipid.pdf>. Diakses tanggal 03 November 2020
- AOCS. 1989. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemistry Society 4th Ed**. Broadmaker Drive, Champaign, Illinois.
- Awaishah, S.S., Khalifeh, M.S., Al-Ruwaili, M.A., Khalil, O.M., Al-Ameri, O.H. dan Al-Groom, R. 2013. **Effect of Supplementation of Pribiotics and Phytosterols Alone or in Combination on Serum and Hepatic Lipid Profiles and Thyroid Hormones of Hypercholesterolemic Rats**. Journal of Dairy Science. 96: 9-15.

Badan Pusat Statistik. 2019. **Statistik Kelapa Sawit Indonesia 2019**. Badan Pusat Statistik Indonesia.

Ball, G.F.M. 1989. **Fat-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis**. Elsevier Applied Science, London, 234-257

Berk, Z. 2009. **Food Process Engineering and Technology**. Elsevier Inc. USA

Bhattacharjee, P., dan Singhal, R.S. 2003. **Extraction of Squalene from Yeast by Supercritical Carbon Dioxide**. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 605-608

Boyer, R. 2005. **Concepts in Biochemistry**. Wiley: USA

Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. fleet, dan M. Wotton. 1987. **Food Science**. Australian Development Assistance. Bureau

Budiastuti, H., Widarti, S., dan Riniati. 2015. **Increase of Oxidation Stability of Biodiesel from Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) by Antioxidant Additions**. Journal of Clean Energy Technologies, 3 (5): 336-339

Bustan, M.D., Febriyani, R., dan Pakpahan, H. 2008. **Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Ukuran Partikel terhadap Berat Oleoresin Jahe yang Diperoleh dalam Berbagai Jumlah Pelarut Organik (Methanol)**. Jurnal Teknik Kimia, 4 (15): 16-26

Campos, H.S., Souza, P.R., Peghini, P.R., Silva, J.S., dan Cardoso, C.R. 2013. **An Overview of An Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease**. Mini-Review in Medicinal Chemistry, Vol 13 (2): 1-10

Cantrill, R. 2008. **Phytosterols, Phytostanols And Their Esters**. This document is based primarily on a draft CTAs and other information provided by the following sponsors: Raisio Nutrition Ltd, Raisio, Finland; Bioresco Ltd., Basel, Switzerland, on behalf of Forbes Medi-Tech Inc., Vancouver, BC, Canada; Unilever UK, London, United Kingdom

Chawla, R., dan Goel, N. 2014. **Phytosterols and Its Effect on Human Health**. Dairy Year Book India. 15 : 139-145

Chen, Q., Gruber, H., Pakenham, C., Ratnayake, W.M., Scoggan, K.A. 2009. **Dietary Phytosterols and Phytostanols Alter the Expression of Sterol-Regulatory Genes in SHRSP and WKY inbred Rats**. Annals of Nutrition & Metabolism Journal, 55 (4) : 341-350

Choe, E., dan Min, D.B. 2009. **Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 8 (4): 345–58. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00085

Chris, M. 2005. **Skualen**. <http://www.cholesterol-and-health.com/squalene/html>. Diakses tanggal 07 Mei 2017

Christie, W.W. 2014. **Tocopherols and Tocotrienols : Structure, Composition, Biology and Analysis**. <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/>. Akses tanggal 07 Mei 2017

Christina, D. 2000. **Karakterisasi dan Aplikasi Emulsifier Campuran Mono dan Diasilgliserol dari Diatilat Asam Lemak Minyak Sawit**. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi FTP IPB. <http://repository.ipb.ac.id/> Akses tanggal 07 Mei 2017

Cunha, S.C., Amaral, J.S., Fernandes, J.O., dan Oliveira, M.B.P. 2006. **Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese Olive Oils Using HPLC with Three Different Detection System**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 3351-3356

Dewi, S.R. 2012. **Kristalisasi**. Bahan Ajar Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. http://shintarosalia.lecture.ub.ac.id/files/2012/05/srd_kristalisasi.pdf. Diakses tanggal 13 Oktober 2020

Diack, M., dan Saska, M. 1994. **Separation of Vitamin E and G-Oryzanols from Rice Bran by Normal-Phase Chromatography**. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 71: 1211

Ekonomi dan Bisnis. 2007. **Kenaikan Pungutan Ekspor CPO Tak Efektif**. Akses tanggal 02 Mei 2017

Eitenmiller, R.R. dan Lee, J. 2004. **Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis**. Marcel Dekker Inc, New York

Estiasih, T. 1996. **Roenkapsulasi Konsentrat Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Cair Penaglangan Ikan Lemuru (Sardinella longiceps)**. Program Pascasarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta

Estiasih, T., Ahmadi, K., dan Layly, A.R. 2012. **Mikroemulsi Fraksi Tidak Tersabunkan Distilat Asam Lemak Minyak Sawit**. *J.Tekmol dan Industri Pangan*, 26 (2): 189-200

Estiasih, T., Ahmadi, K., Widyaningsih, T.D., Maligan, J.M., Mubarok, A.Z., Zubaidah, E., Mukhlisiyyah, J., and Puspitasari, R. 2013. **Bioactive Compounds of Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) from Several Palm Oil Refineries**. *Advance Journal of Food Science and Technology*. Vol. 5, No. 9, p. 1153 – 1159

Estiasih, T., Ahmadi, K., Widyaningsih, T.D., Rhitmayanti, E., Fidyasari, A., Purnomo, K., and Wahyuni, Y. 2014. **The Effect of Unsaponifiable Fraction from Palm Fatty Acid Distillate on Lipid profile of Hypercholesterolaemia Rats**. *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol. 2, No. 12, p.1029 – 1036

Estiasih, T., dan Ahmadi, K. 2018. **Bioactive Compound from Palm Fatty Acid Distillate and Crude Palm Oil**. International Conference Series: Earth and Environmental Science. 131: 1-5, DOI: 10.1088/1755-1315/131/1/012016

Eustachio, P. 2006. **Cholesterol, Steroids, And Related Molecules**. <http://education.med.nyu.edu/>. Akses tanggal 07 Mei 2017

Evans, J.C., Kodali, D.R., dan Addis, P.B. 2002. **Optimal Tocopherol Concentration to Inhibit Soybean Oil Oxidation**. JAOCS 79: 45-51

Fauzi, Y., Widyastuti Y.E., Satyawibawa I., dan Hartono R. 2007. **Kelapa Sawit, Budi Daya Pemanfaatan Hasil & Limbah, Analisis Usaha & Pemasaran**. Penebar Swadaya, Jakarta

Gapor, A.B., Sulong, M., dan Soom, R.M. 2002. **Production of Phytosterols from Palms Fatty Acid Distillates**. MPOB TT No.173. ISSN-1511-7871

Garcia, T.R., Martinez, J.C., dan Ortiz, D.J., 2017. **Squalene Extraction: Biological Sources and Extraction Methods**. International Journal of Environmet Agriculture and Biotechnology 2 (4): 1662-2670

Gosh, M. dan Bandyopadhyay, S. 2005. **Studies on Crystal Growth of Rice Bran Wax in A Hexane Medium**. Journal of American Oil Chemical Society 82: 229-231

Gunawan, G., Triatmo, M., dan Rahayu, A. 2003. **Analisis Pangan: Penentuan Angka Peroksida dan Asam Lemak Bebas Pada Minyak Kedelai dengan Variasi Menggoreng**. JSKA. 3: 1-6

Ham, B., Butler, B., dan Thionville, P. 2000. **Evaluating the Isolation and Quantification of Sterols in Seed Oil by Solid-Phase Extraction and Capillary Gas-Liquid Chromatography**. LCGC, 18 (11): 1174-1181

Hammond, E.G., Johnson, L.A., and Su, C. 2005. **Soybean Oil. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6th Edition, Six Volume Set**. John Wiley & Sons Inc. New York

Han, J.Y., Seo, S.H., dan Song, J.M. 2018. **High-level recombinant production of squalene using selected *Saccharomyces cerevisiae* strains**. J Ind Microbiol Biotechnol 45, 239–251

Harborne, J.B. 1998. **Phytochemical Methods 3rd ed**. Chapman & Hall, London

Hartel, R.W. 2001. **Crystallization in Foods**. A wolters Kluwer Co. USA

Huang, Z.R., Lin, Y.K., dan Fang, J.Y. 2009. **Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology**. Molecules, 14: 540-554, doi:10.3390/molecules14010540

Hui, Y.H. 1996. **Bailey's Industrial Oil and Fat Product, 5th Edn, Volume 2.** John Wiley & Sons Inc. New York

IUPAC. 1993. **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivates, International Union of Pure and Applied Chemistry, Consorsium on Oils, Fats, and Derivates.** Blackwell Scientificts Publication, Oxford

Jacob, A.M., Suptijah, P., Kristantina, W.A. 2015. **Komposisi Asam Lemak, Kolesterol, dan Deskripsi Jaringan Fillet Ikan Kakap Merah Segar dan Goreng.** JPHPI 18 (1): 98-107. DOI: 10.17844/jphpi.2015.18.1.98

Jones, P.J.H dan Suhad, S.H. 2009. **Phytosterols as Functional Food Ingredients: Linkages to Cardiovascular Disease and Cancer.** Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 12: 147-151, doi:10.1097/MCO.0b013e328326770f

Kallio, H., Yang, B., dan Peippo, P. 2002. **Effects of Different Origin and Harvesting Time on Vitamin C, Tocopherols. And Tocotrienols in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Berries.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50: 6136-6142

Ketaren, S. 2005. **Teknologi Minyak dan Lemak Pangan.** UI Press. Jakarta

Ketaren, S. 2008. **Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan.** UI Press. Jakarta

Kim, O.S. 2005. **Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of the E Vitamer Fraction in Rice Bran.** J. Food Sci. 70 (3) : 208 – 213

Khaton, S., Raja, R., dan Gopala, K., 2010. **Physicochemical Characteristics and Composition of Indian Soybean Oil Deodorizer Distillate and the Recovery of Phytosterols.** J Am Oil Chem Soc. (87) 321-326. DOI 10.1007/s11746-009-1499-8

Krishnamurthy, R., dan Kellens, M. 1995. **Fractionation and Winterization** in Y. H. Hui (ed). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Product: Processing Technology, 5th ed, Vol.4.** A John Wiley and Sons, Inc. New York

Loganathan, R., Selvaduray, K.R., Radhakrishnan, A., dan Nesaretnam, K. 2009. **Palm Oil Rich in Health Promoting Phytonutrients.** Palm Oil Development 50: 16-25

Marinangeli, C.P.F., Varady, K.A., dan Jones, P.J.H. 2006. **Plant Sterols Combined with Exercise for the Treatment of Hypercholesterolemia: Overview of Independent and Synergistic Mechanisms of Action.** Journal of Nutritional Biochemistry 17 : 217 – 224

Marliyati, S.A., Syarif, H., Muchtadi, D., Darusman, L.K., dan Rimbawa, R. 2005. **Ekstraksi dan Analisis Fitosterol Lembaga Gandum (*Triticum sp.*)**. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan XVI (1): 1-12

Maulana, I.T. 2013. **Pemisahan Asam Elaidat (*Trans-9-Octadecenoic Acid*) dan Asam Lemak Jenuh serta Peningkatan Kandungan EPA dan DHA dari Minyak Limbah Perusahaan Pengolahan Ikan**. Tesis. Program Studi Farmasi. Institut Teknologi Bandung

Maulinda, L., Nasrul, Z.A., dan Nurbaiti. **Hidrolisis Asam Lemak Dari Buah Sawit Sisa Sortiran**. Jurnal Teknologi Kimia Unimal 6 (2): 1-15

Mendez, E., Blanco, M., Laguna, A., Garcia, E. 2003. **Isolation and Characterization of a Mixture of Higher Primary Aliphatic Alcohols of High Molecular Weight from Henequen (*Agave furcroydes L.*) Wax**. Revista CENIC Ciencias Quimicas 34: 35-38

Mène-Saffrané, L., dan DellaPenna, D. 2010. **Biosynthesis, Regulation and Functions of Tocochromanols in Plants**. Plant Physiol. Biochem 48: 301-309

Mirsyad, Hazni. 2019. **Hidrolisis Lemak**. sainspangan.com. diakses tanggal 21 April 2021

Mitei, J., Ngila C., Yeboah, S.O. Wessjohann, L., dan Schmidt, J. 2009. **Profiling of Phytosterol, Tocopherol, and Tocotrienol in Selected Seed Oils from Bostwana by GC-MS and HPLC**. Journal of the American Oil Chemical Society 86: 617-625

Mubarok, A.Z. 2014. **Kimia Fisik Pangan**. Modul Perkuliahan Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan Universitas Brawijaya. Malang

Muchtadi, T.R. 1992. **Karakterisasi Komponen Intrinsik Utama Buah dalam Rangka Optimalisasi Proses Ekstraksi Minyak dan Pemanfaatan Provitamin A**. Disertasi. Pascasarjana IPB. Bogor

Muharram dan Jannah, N. 2009. **Isolation and Identification Sterol from the N-Hexane Extract of *Phyllanthus niruri L.* Leaves (Euphorbiaceae)**. Bionature, 10 (2): 50 – 55

Musalamah, M., Nizam, M.Y., Noor Aini, A.H., Azian, A.I., Gapor, M.T., dan Wah Ngah, W.Z. 2005. **Comparative Effect of Palm Vitamin E and Alfa Tocopherol on Heading and Wound Tissue Antioxidant Enzyme Level in Diabetic Rats**. Lipids 40: 575 – 580

Naibaho, P.M. 1998. **Pemisahan Karoten (Provitamin A) Palm Oil dengan Metode Adsorpsi**. Disertasi. Pascasarjana IPB. Bogor

Ncube, N.S., Afolayan, A.J., dan Okoh, A.I. 2008. **Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin : Current Methods and Future Trends**. African Journal of Biotechnology, 7 (12): 1797-1806

Ng, M.H., Chao, Y.M., Ma, A.H., Choah, C.H., dan Hashim, M.A. 2004. **Separation Vitamin E (Tocopherol, Tocotrienol, and Tocomonoenal) in Palm Oil**. Lipid 30:1031-1035

Nielsen, M.M., dan Hansen, A. 2008. **Rapid High-Performance Liquid Chromatography Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals**. Cereal Chemistry 85 (2) : 248 – 251

Norhidayah, S., Baharin, B.S., Hamed, M., and Zaidul, I.S.M. 2012. **Squalene Recovery from Palm Fatty Acid Distillate Using Supercritical Fluid Extraction**. International Food Research Journal. 19 (4): 1661 – 1667

Normen, L., Frohlinch, J. dan Trautwein, E. 2004. **Role of Plant Sterol in Cholesterol Lowering in Phytosterol as Functional Food Components and Nutraceuticals** (eds. Paresh C. Dutta). Marcel Dekker: USA

Novrianto, M.A., Wibowo, M.A., dan Ardiningsih, P. 2016. **Karakterisasi Senyawa Fitosterol dari Ekstrak Daun Soma (*Ploiarium alternifolium Melch*) dengan Metode ¹H-NMR**. JKK, 6 (4): 69-74

Nurhasnawati, H., Supriningrum, R., dan Caesariana, N. 2015. **Penetapan Kadar Asam Lemak Bebas dan Bilangan Peroksida pada Minyak Goreng yang Digunakan Pedagang Gorengan Di Jl. A. W Sjahrnie Samarinda**. Jurnal Ilmiah Manuntung, 1 (1): 25-30

Oktafa, H. 2015. **Efek Perbaikan Profil Lipid Fraksi Kaya Fitosterol (FKF) dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS) pada Tikus Hiperkolesterolemia**. Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Malang

Oktavia, S., Eriadi, A., dan Valdis, S. 2018. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kejibeling (*Strobilanthes crispus Blume*) terhadap Kadar Kolesterol Total dan LDL Mencit Putih Jantan Hiperkolesterolemia**. Jurnal Farmasi Higea, 10 (2): 110-116

Pahoja, V.M., Dahot, M.U., dan Sethar, M.A. 2001. **Characteristic Properties of Lipase Crude Extract of *Caesalpinia boundocella L.* Seeds**. Journal of Biological Sciences 1 : 775-778

Pan, L.J, Shao, P., dan Jiang, S.T. 2005. **Separation of Phytosterol and Synthesized Vitamin E Succinate from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate**. Agricultural Engineering International, the CIGR Ejournal 7. Manuscript FP 04, 10 March 2005

- Papas, A.M. 2008. **Vitamin E: A New Perspective**. Nutri News 9 (1): 1-8
- Park, Y. dan Carr, T.P. 2013. **Unsaturated Fatty Acids and Phytosterols Regulate Cholesterol Transporter Genes in Caco-2 and HepG2 Cell Lines**. Nutrition Research. 33: 154-161.
- Parker, R.A., Garcia, R., Ryan, C.S., Liu, X., Shipkova, P., Livanov, V., Patel, P. dan Ho, S.P. 2013. **Bile Acid and Sterol Metabolism with Combined HMG-CoA and PCSK9 Suppression**. Journal of Lipid Research. 54: 2400-2409
- Pasaribu, N. 2004. **Minyak Buah Kelapa Sawit**. Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA USU. Sumatra Utara
- Pinalla, A. 2011. **Penentuan Metode Rekrystalisasi yang Tepat untuk Meningkatkan Kemurnian Kristal Amonium Perklorat (AP)**. Majalah Sains dan Teknologi Dirgantara 6 (2): 64-71
- Ping, B.T.Y., dan Yusof, M. 2009. **Characteristics and Properties of Fatty Acid Distillates from Palm Oil**. Malaysian Palm Oil Board, Kuala Lumpur, Oil Palm Bulletin, 59: 5-11
- Podda, M., Weber, C., Traber, M.G., dan Packer, L. 1996. **Simultaneous Granules**. IN : J. Bemiller and R. Whistler. **Strach Chemistry and Technology** (3rd ed, P : 149-192), Elsevier Inc. Academic Press. New York
- Pokorný, J., Yanishlieva, N., dan Gordon, M. 2001. **Antioxidants in Food: Practical Applications**. Woodhead Publishing. London
- Pontes, A.G.O., Silva, K.L., Fonseca, S.G.D.C., Soares, A.A., Feitosa, J.P.D.A., Braz-Filho, R., Romero, N.R., Bandeira, M.A.M. 2016. **Identification and Determination of the Inulin Content in the Roots of the Northeast Brazilian Species *Pombalia calceolaria* L.** Carbohydrate Polymers.149: 391-398
- Puah, B.C.W., Choo, Y.M., Ma, A.N., dan Chuah, C.H. 2009. **The Effect of Physical Refining on Palm Vitamin E (Tocopherol, Tocotrienol and Tocomonoenol)**. American J of App Sci, 4(6): 374-377
- Pusat Penelitian Kelapa Sawit. 2017. **Bahan Tanaman Unggul PPKS**. Artikel Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI). http://www.iopri.org/wp-content/uploads/2017/10/WPLACE-17-K1.2.-BAHAN-TANAMAN-UNGGUL-PPKS_HYR.pdf diakses tanggal 15 Juli 2019
- Raharjo, S. 2006. **Kerusakan Oksidatif pada Makanan**. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

- Rainforest Foundation Norway. 2016. **Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) in Biofuels**. Paper, 1-5
- Ratnawati, S.E., Ekantari, N., Pradipta, R.W., dan Paramita, B.L. 2018. **Aplikasi Response Surface Methodology (RSM) pada Optimasi Ekstraksi Kalsium Tulang Lele**. Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada (1): 41-48
- Rifa'i, G., Widarta, I.R., dan Nocianitri, K.A. 2018. **Pengaruh Jenis Pelarut dan Rasio Bahan dengan Pelarut terhadap Kandungan Senyawa Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americans Mill.*)**. Jurnal ITEPA (7): 22-32
- Rudzinska, M., Przybylski, R. dan Wasowicz, E. 2014. **Degradation of Phytosterols During Storage of Enriched Margarines**. Food Chemistry. 142: 294-298.
- Sabir, S.M., Hayat, I., Gardezi, S.D.A. 2003. **Estimation of Sterols in Edible Fats and Oils**. Pakistan Journal of Nutrition. Vol. 2 (3): 178-181.
- Sahriawati, 2016. **Optimasi Proses Ekstraksi Minyak Ikan Metode Soxhletasi dengan Variasi Jenis Pelarut dan Suhu Berbeda**. Jurnal Galung Tropika 5 (3): 164-170
- Santoso, D. 2015. **Kristalisasi Gula dan Garam**. http://www.academia.edu/7753251/Kristalisasi_Gula_dan_Garam. Diakses tanggal 16 April 2021
- Sartika, R.A.D 2008. **Pengaruh Asam Lemak Jenuh, Tidak Jenuh dan Asam Lemak Trans terhadap Kesehatan**. Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional Vol 2 (4): 154-160
- Shabdin, M.K., Shariff, A.R.M., Johari, M.N.A., Saat, N.K., dan abbas, Z. 2016. **A Study on the Oil Palm Fresh Fruit Bunch (FFB) Ripeness Detection by Using Hue, Saturation and Intensity (HSI) Approach**. Earth and Environmental Science, 37: 1-10, doi:10.1088/1755-1315/37/1/012039
- Shahidi, F., dan Zhong, Y. 2005. **Lipid Oxidation: Measurement Methods**. **Bailey's Industrial Oil Fat Products**, 6th Edition. Wiley & Sons Inc., New York
- Sopianti, D.S., Herlina, Saputra, H.T. 2017. **Penetapan Kadar Asam Lemak Bebas pada Minyak Goreng**. Jurnal Katalisator, 2 (2): 100-105
- Soupas, L. 2006. **Oxidative Stability of Phytosterols in Food Models and Foods**. EKT-series 1370. Academic Dissertation of University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. 110 + 58 pp.
- Stock, J. 2014. **Focus on Lifestyle: EAS Consensus Panel Position Statement on Phytosterol-added Foods**. Atherosclerosis. 234:142-145.

Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 2007. **Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty, Yogyakarta

Su'i, Mohammad, Harijono, Yuniarta, Aulani'am. 2010. **Aktivitas Hidrolisis Enzim Lipase dari Kentos Kelapa terhadap Minyak Kelapa**. AGRITECH, Vol 30 (3) 164-167

Suttiarpom, P., Watcharapong, C., Sugunya, M., Suwapom, L., Somsuda, T., dan Vijittra, L. 2015. **Structures of Phytosterols and Triterpenoids with Potential Anti-Cancer Activity in Bran of Black Non-Glutinous Rice**. Nutrients, 7: 1672-1687, doi:10.3390/nu7031672

Svehla. 1979. **Buku Ajar Vogel: Analisis Anorganik Kuantitatif Makro dan Semi Mikro**. PT. Kalman Medai Pusaka. Jakarta

Teresa, Y., Hidayati, N., dan Nugrahani, R.A. 2016. **Pengaruh Rasio Pelarut Kloroform (v/v) pada Ekstraksi Trimiristin Biji Pala (*Myristica fragrans* HOUTT)**. Teknik Kimia, 2: 3-6

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., dan Kaur, H. 2011. **Phytochemical Screening and Extraction: A Review**. International Pharmaceutical Science, 1: 99-106

Traber, M.G., dan Brigelius, F.R. 1999. **Vitamin E: Function and Metabolism**. The FASEB Journal. Vol.13, p. 1145 – 1155

Tranggono. Dan Setiaji, B. 1986. **Kimia Pangan. PAU Pangan dan Gizi**. UGM: Yogyakarta

Utami, R.R. 2018. **Antioksidan Biji Kakao: Pengaruh Fermentasi dan Penyangraian terhadap Perubahannya (Ulasan)**. Artikel Balai Besar Industri Hasil Perkebunan. <http://ejournal.kemenerin.go.id>. Diakses tanggal 08 Januari 2021

Vazquez, L., Torres, C.F., Fomari, T., Se'nor'ans, F.J., and Reglero, G. 2007. **Recovery of Squalene from Vegetable Oils Sources Using Countercurrent Supercritical Carbon Dioxide Extraction**. Journal of Supercritical Fluids, 40: 59 – 66

Velasco, L., dan Ruiz-Méndez, M.V. 2015. **Sunflower Oil Minor Constituents**. CSIC Spain, 11: 297-329

Vogel. 1978. **Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik**. Penerjemah: Pudjaatmaka dan Setiono. EGC. Jakarta

Wardhana, M.T. 2012. **Rekristalisasi Pelarut Suhu Rendah pada Pembuatan Fraksi Kaya Fitosterol dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit (DALMS)**. Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Malang

Watkins, T.R., Bierebaum, M.L., dan Giampaolo, A. 2004. **Tocotrienol: Biological and Health Effects**. CRC Press. Boca Raton.

Winarno, F.G. 2002. **Kimia Pangan dan Gizi**. PT.Gramedia Pustaka Utama

Winarsi, H. 2005. **Antioksidan Alami dan Radikal**. Kanisius. Jakarta

Wulansari, A. 2017. **Efek Hipokolesterolemik Mi Instan, Roti Tawar, dan Biskuit Fortifikasi Fraksi Tidak Tersabunkan dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit pada Tikus Hiperkolesterolemia**. Tesis. Program Studi Magister Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya

Xu, Z., Hua, N., dan Godber, J.S. 2001. **Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienols, γ -Oryzanol Components from Rice Bran Against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2'-Azobis (2-Methylpropionimidine) Dihydrochloride**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 49: 2077-2081

Youngson, R. 2005. **Antioksidan, Manfaat Vitamin C dan E bagi Kesehatan**. Cetakan I. Arcan. Jakarta

Zhu, T., Heo, H.J., dan Row, K.H. 2010. **Optimization of Crude Polysaccharides Extraction from Hizikia Fusiformis Using Response Surface Methodology**. Carbohydrat Polymer. 82:106-110

Zulkifli, M., dan Estiasih, T. 2014. **Sabun dari Distilat Asam Lemak Minyak Sawit : Kajian Pustaka**. Jurnal Pangan dan Agroindustri 2 (4): 170-177

Lampiran 1. Prosedur Analisa

1. Analisis Kadar Asam Lemak Bebas (Mehlenbacher, 1960 dalam Sudarmadji et al., 2007)

- Pengadukan bahan hingga merata dalam kondisi cair.
- Penimbangan sampel sebanyak $28,2 \pm 0,2$ gram dalam erlenmeyer.
- Penambahan alkohol panas sebanyak 50 ml dan 2 ml indikator phenolphthalein (pp) ke dalam erlenmeyer.
- Titrasi dengan larutan NaOH 0,1 N yang telah distandarisasi hingga berwarna merah jambu tercapai dan tidak hilang selama 30 detik.
- Perhitungan kadar asam lemak bebas dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Asam Lemak Bebas} = \frac{\text{ml NaOH} \times N.\text{NaOH} \times \text{BM Asam Lemak} \times 100\%}{\text{Berat Sampel (g)} \times 1000}$$

2. Analisis Bilangan Peroksida (Kim, 2005)

- Persiapan bahan
 - Pembuatan larutan amonium tiosianat dengan cara melarutkan 30 mg amonium tiosianat dalam akuades hingga 100 ml.
 - Pembuatan larutan ferro klorida (0,5 gr BaCl_2 dilarutkan dalam air deionisasi hingga volume 50 ml. Kemudian ditambah ferro sulfat sebanyak 0,4 gr dan diaduk. Lalu ditambah HCl 37% sebanyak 2 ml. Penyaringan barium sulfat yang jernih menggunakan kertas saring whatman nomor 1. Penyimpanan filtrat dalam botol gelap maksimal dalam jangka waktu 1 minggu).
- Pembuatan kurva standar Fe
 - Pelarutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,25 gr dalam 25 ml HCl 10 N dan dioksidasi H_2O_2 sebanyak 2 ml. Penghilangan sisa H_2O_2 dengan mendidihkan larutan.
 - Pengenceran larutan menjadi 250 ml dalam HCl 10 N dan digunakan sebagai stok larutan standar.
 - Penambahan larutan standar sebanyak 0,5; 1; 2; 3; 4; dan 5 ml ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan benzena-metanol 70:30 (v/v) sampai volume 10 ml. Penambahan 1 tetes larutan amonium tiosianat dan 1 tetes ferroklorida pada larutan.
 - Penggojogan larutan dengan vortex selama 5 detik.
 - Pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 510 nm.

- Pembuatan kurva standa dengan sumbu x berupa absorbansi dan sumbu y berupa Fe (μg) serta pembuatan persamaan regresi liniernya.

c. Persiapan sampel

- Penetesan satu tetes sampel pada tabung reaksi.

- Pelarutan dalam benzena:metanol 70:30 v/v sampai volume 10 ml.

- Penambahan 1 tetes ammonium tiosianat dan 1 tetes ferro klorida.

- Penggojogan dengan vortex selama 5 detik.

- Pemanasan 50°C selama 2 menit.

- Pendinginan pada suhu ruang.

- Pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 510 nm.

- Penghitungan banyaknya Fe dalam 10 ml larutan dengan persamaan regresi linier dari kurva standar.

- Penghitungan bilangan peroksida dalam miliekuivalen/kg minyak dengan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Bilangan Peroksida} = \frac{A \times B}{C \times 55,85}$$

Keterangan :

A = berat Fe per 10 ml (μg)

B = volume larutan awal (ml)

C = berat sampel minyak (g)

3. Analisis Bilangan p-Anisidin (IUPAC, 1993)

a. Penimbangan sampel seberat 0,5 - 4,0 g (0,001 g) ke dalam labu takar 25 ml, dilarutkan dan diencerkan sampai tanda tera dengan iso oktan.

b. Pengukuran absorbansi (A_b) larutan lemak tersebut pada panjang gelombang 350 nm dengan spektrofotometer, digunakan sebagai larutan blanko.

c. Pipet secara tepat 5 ml larutan lemak/minyak dalam tabung reaksi dan 5 ml pelarut pada tabung reaksi kedua. Pipet 1 ml reagen p-anisidin ke masing-masing tabung dan gojog.

d. Setelah 10 menit ukur absorbansi (A_s) dari larutan pada tabung reaksi pertama pada 350 nm, gunakan larutan pada tabung reaksi kedua sebagai blanko.

e. Penghitungan bilangan p-anisidin menggunakan formula sebagai berikut:

$$\text{Bilangan } p\text{-anisidin} = \frac{28 \times (1,2 A_s - A_b)}{m}$$

Keterangan :

A_s = nilai absorbansi larutan lemak setelah bereaksi dengan p- anisidin

A_b = nilai absorbansi larutan lemak

m = berat sampel (g)

4. Analisis Kadar Tokoferol dan Tokotrienol (HPLC) (Nielsen dan Hansen, 2008)

- a. Penimbangan sampel sejumlah 5 mg.
- b. Penambahan 1 ml etanol lalu disaring.
- c. Pemasangan kolom sesuai dengan komponen yang akan dianalisis
- d. Persiapan *eluent* (*mobile phase*) yang akan digunakan dalam botol (*eluent* telah disaring dengan filter 0,45 μm).
- e. Pemasangan selang inlet dari unit HPLC ke dalam botol *eluent*
- f. Pengaturan *flowrate* sesuai yang diinginkan dan hilangkan gelembung yang terikut dalam selang.
- g. *Conditioning* sampai diperoleh garis dasar yang lurus.
- h. Penginjeksian sampel (yang sudah disaring dengan filter 0,45 μm).
- i. Pendiaman beberapa saat sampai semua komponen yang akan diinginkan keluar dalam kromatogram.
- j. Perbandingan hasil yang didapat dengan standar yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel.

5. Analisis Kadar Fitosterol (HPLC) (Nielsen dan Hansen, 2008)

- a. Penimbangan sampel sejumlah 5 mg.
- b. Penambahan 1 ml etanol lalu disaring.
- c. Pemasangan kolom sesuai dengan komponen yang akan dianalisis
- d. Persiapan *eluent* (*mobile phase*) yang akan digunakan dalam botol (*eluent* telah disaring dengan kertas saring 0,45 μm).
- e. Pemasangan selang inlet dari unit HPLC ke dalam botol *eluent*
- f. Pengaturan *flowrate* sesuai yang diinginkan dan hilangkan gelembung yang terikut dalam selang.
- g. *Conditioning* sampai diperoleh garis dasar yang lurus.
- h. Penginjeksian sampel (yang sudah disaring dengan filter 0,45 μm).
- i. Pendiaman beberapa saat sampai semua komponen yang akan diinginkan keluar dalam kromatogram.

j. Perbandingan hasil yang didapat dengan standar yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel.

6. Analisis Kadar Skualen (HPLC) (Grigoriadou, et al., 2007)

- a. Penimbangan sampel sebanyak 5 mg.
- b. Penambahan 5 ml etanol kemudian digojog.
- c. Sampel dipipet sebanyak 1 ml kemudian dilarutkan dalam 1 ml acetonitrile dan disaring menggunakan mikrofilter 0,45 µm.
- d. Kolom dipasang sesuai dengan komponen yang akan dianalisa.
- e. Eluent (mobile phase) yang akan digunakan disiapkan dalam botol eluent.
- f. Selang inlet dimasukkan dari unit HPLC ke dalam botol eluent.
- g. Suhu, waktu analisa dan flowrate diatur sesuai dengan yang diinginkan dan dihilangkan gelembung yang terikut dalam selang.
- h. Waktu conditioning diberikan sampai diperoleh garis dasar yang lurus.
- i. Sampel diinjeksikan ke unit HPLC.
- j. Diamkan beberapa saat sesuai waktu analisa yang telah ditentukan dan keluar kromatogram.
- k. Hasil yang didapat dibandingkan dengan standar yang diinjeksikan dengan volume yang sama dengan volume sampel.

Kondisi HPLC

Merk	: Shimadzu LC-20AT
Kolom	: ODS 250 x 4,6 mm
Detektor	: UV SPD-20A
Degasser	: DGU-20 A5
Fase mobile	: Acetonitrile (100%)
Kecepatan aliran	: 1 ml/ menit
Panjang gelombang	: 208 nm
Temperatur kolom	: 27,5°C
Volume injeksi	: 20 µl
Berat sampel injeksi	: 20 µg

7. Analisa Rendemen (Pontes et al., 2016)

Rendemen dihitung berdasarkan persentase (%) berat kering sampel yang dihasilkan setelah proses pengolahan dibagi berat awal bahan baku yang digunakan dalam basis kering.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Sampel Kering (g)} \times 100 \%}{\text{Berat Bahan Baku (g)}}$$



Lampiran 2. Hasil Analisa Komponen Kimia

1. Data Analisis Kadar Asam Lemak Bebas

Sampel	Ulangan	Berat (g)	Vol. Titrasi (ml)	N. NaOH	BM Palmitat	% ALB	Rerata	SD
DALMS	1	0,1123	3,9	0,1	256	88,90	88,74	0,23
	2	0,1156	4,0	0,1	256	88,58		
FTT	1	0,1142	0,2	0,1	256	4,48	4,75	0,37
	2	0,1022	0,2	0,1	256	5,01		
FKT	1	0,1021	0,1	0,1	256	2,51	2,15	0,50
	2	0,1421	0,1	0,1	256	1,80		
FK	1	0,1002	0,1	0,1	256	2,55	2,32	0,34
	2	0,1233	0,1	0,1	256	2,08		
FKF	1	0,1031	0,1	0,1	256	2,483	2,429	0,08
	2	0,1078	0,1	0,1	256	2,375		

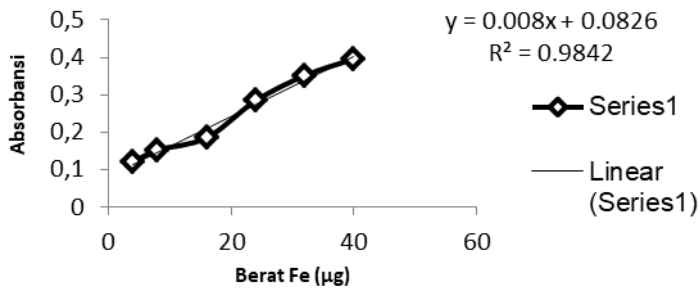
2. Data Analisis Bilangan p-Anisidin

Sampel	Ulangan	Berat (g)	Abs. Ab	Abs. As	Bil. p-Anisidin	Rerata	SD
FKF	1	0,1135	0,056	0,055	2,203	2,344	0,20
	2	0,1328	0,031	0,037	2,485		

3. Data Analisis Bilangan Peroksida

Berat Fe (µg)	Asorbansi
4	0,12
8	0,152
16	0,185
24	0,284
32	0,351
40	0,396

Kurva Standar Peroksida



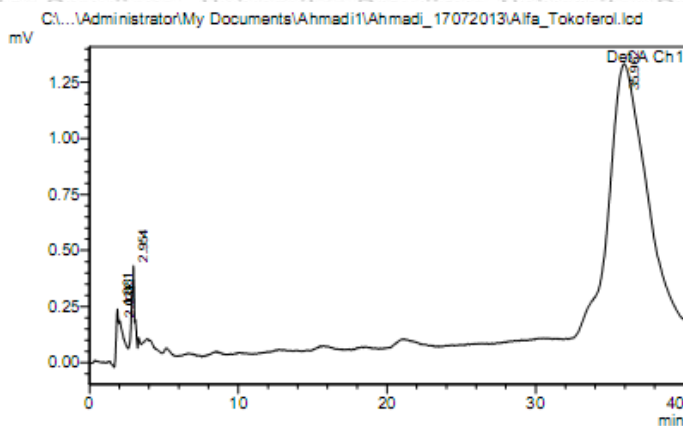
Sampel	Ulangan	Berat (g)	Absorbansi	Berat Fe (ug)	Bil. Peroksida (meq/kg)	Rerata	SD
FKF	1	0,1228	0,312	3,7060	2,702	2,498	0,29
	2	0,1244	0,280	3,1890	2,295		



Lampiran 3. Hasil Analisa Komponen Vitamin E

1. Kromatografi Standar Vitamin E (2013)

a. α -Tokoferol



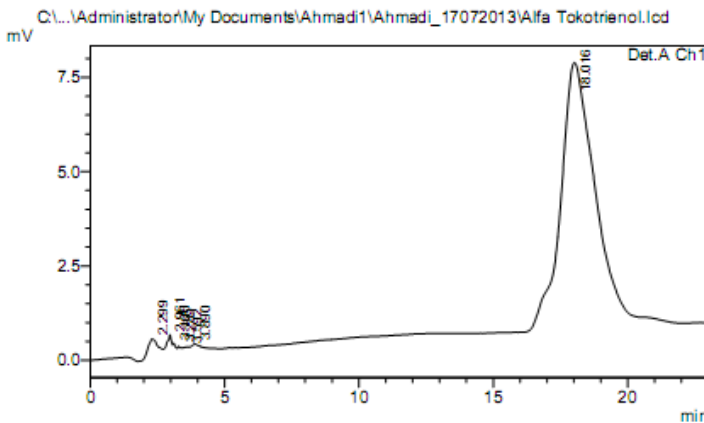
1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.881	2652	248	1.639	13.335
2	2.031	3898	189	2.409	10.140
3	2.954	4644	384	2.870	20.642
4	35.962	150635	1039	93.082	55.883
Total		161830	1860	100.000	100.000

b. α -Tokotrienol



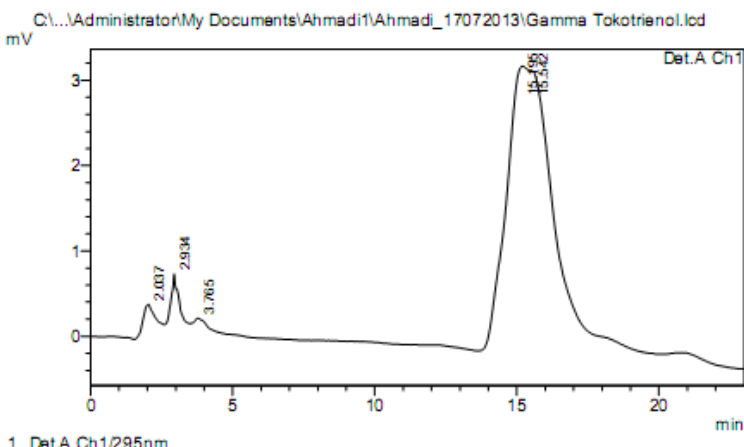
1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.299	14443	533	2.288	5.992
2	2.961	7411	557	1.174	6.269
3	3.100	2420	303	0.383	3.413
4	3.289	1608	204	0.255	2.294
5	3.592	2684	142	0.425	1.595
6	3.890	3796	180	0.601	2.025
7	18.016	598792	6971	94.873	78.412
Total		631153	8890	100.000	100.000

c. γ -Tokotrienol

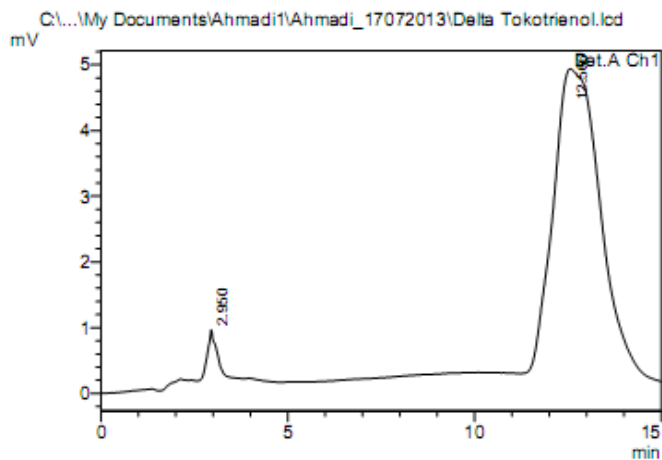


1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.037	13101	396	3.417	5.084
2	2.934	17177	725	4.481	9.312
3	3.765	5992	182	1.563	2.334
4	15.195	172838	3274	45.086	42.068
5	15.542	174245	3206	45.453	41.202
Total		383352	7782	100.000	100.000

d. δ -Tokotrienol



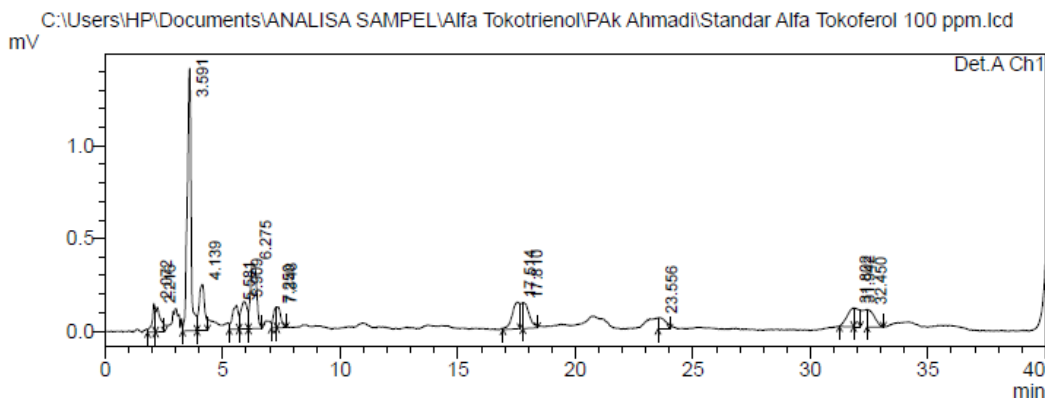
1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.950	13357	757	3.175	13.945
2	12.566	407342	4673	96.825	86.055
Total		420699	5430	100.000	100.000

2. Kromatografi Standar Vitamin E (2017)

a. α -Tokoferol

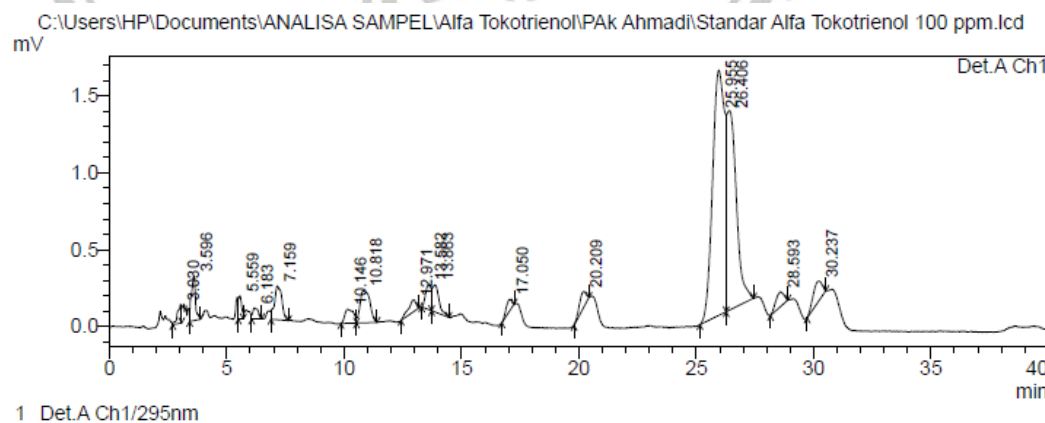


PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.072	1412	155	2.834	4.494
2	2.216	1825	134	3.661	3.900
3	3.591	15988	1417	32.075	41.136
4	4.139	4041	248	8.108	7.193
5	5.581	2180	129	4.373	3.740
6	5.909	2787	148	5.591	4.307
7	6.275	6576	352	13.193	10.218
8	7.250	1083	109	2.174	3.158
9	7.348	1252	112	2.513	3.253
10	17.514	3265	144	6.551	4.183
11	17.810	2575	140	5.165	4.050
12	23.556	1385	63	2.778	1.818
13	31.802	1908	101	3.828	2.924
14	31.942	1616	100	3.242	2.897
15	32.450	1951	94	3.915	2.728
Total		49844	3445	100.000	100.000

b. α -Tokotrienol

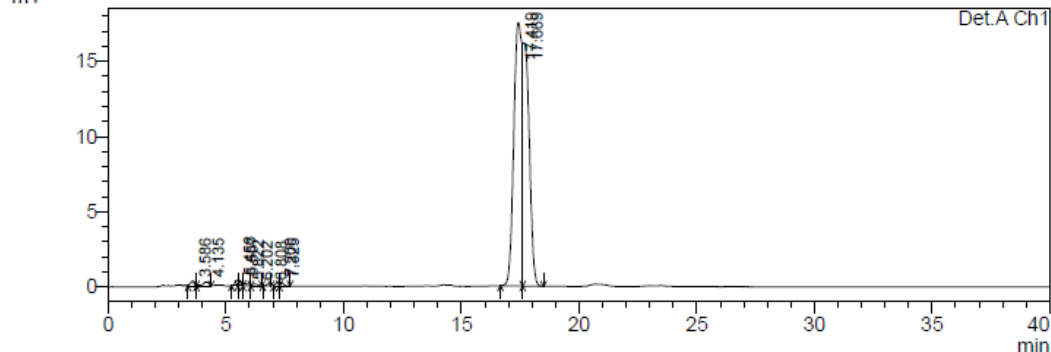


PeakTable
Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.030	1358	122	1.028	2.511
2	3.596	3548	293	2.685	6.034
3	5.559	1381	153	1.045	3.140
4	6.183	1131	72	0.856	1.486
5	7.159	4784	219	3.621	4.496
6	10.146	2402	92	1.818	1.901
7	10.818	6106	210	4.621	4.328
8	12.971	1791	75	1.355	1.534
9	13.582	2607	161	1.973	3.314
10	13.863	3501	176	2.649	3.621
11	17.050	1314	76	0.995	1.562
12	20.209	2153	101	1.630	2.077
13	25.955	56527	1594	42.779	32.793
14	26.406	37575	1297	28.437	26.692
15	28.593	2344	94	1.774	1.940
16	30.237	3615	125	2.736	2.571
Total		132137	4860	100.000	100.000

c. γ -tokotrienol

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\Alfa Tokotrienol\PAK Ahmadi\Standar Gama Tokotrienol 100 ppm.lcd

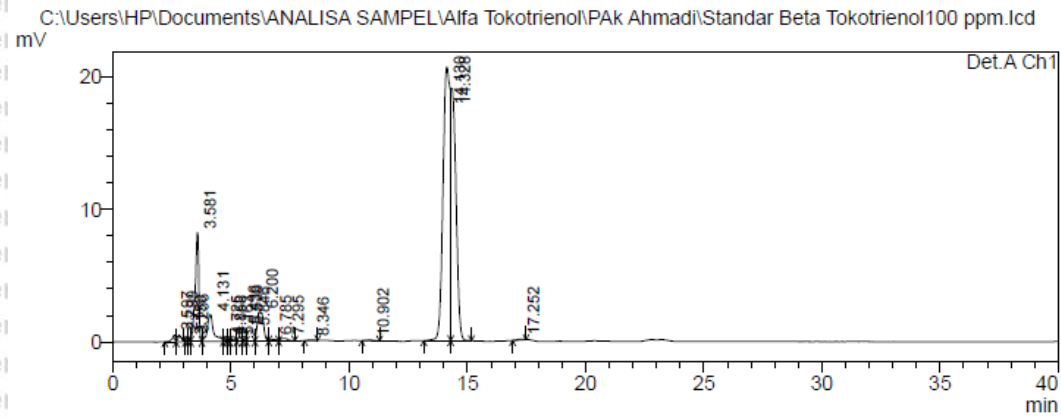


1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable
Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.586	3698	328	0.487	0.911
2	4.135	4622	266	0.609	0.739
3	5.456	2846	377	0.375	1.045
4	5.557	3735	404	0.492	1.120
5	5.822	2373	145	0.313	0.402
6	6.202	1857	112	0.245	0.310
7	6.808	1414	121	0.186	0.336
8	7.200	3036	274	0.400	0.761
9	7.325	2678	283	0.353	0.785
10	17.419	426117	17534	56.132	48.656
11	17.669	306758	16193	40.409	44.935
Total		759134	36036	100.000	100.000

d. δ -tokotrienol



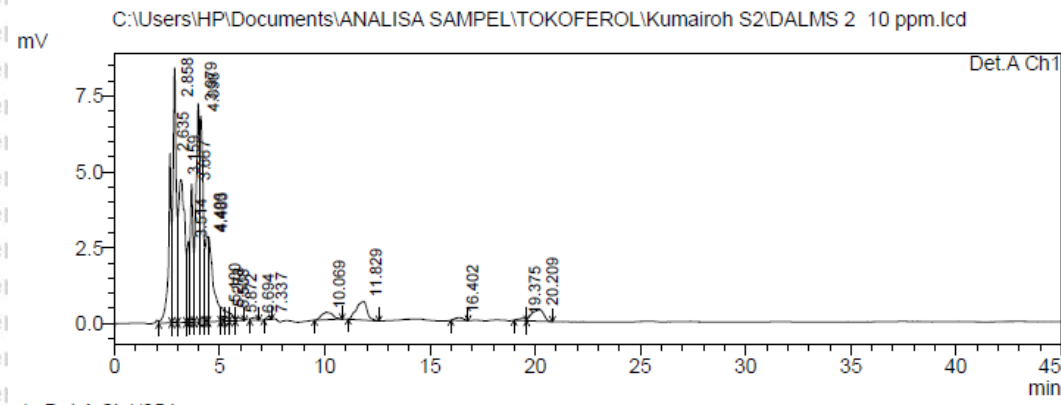
1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.597	5129	498	0.542	0.864
2	2.799	6471	492	0.684	0.854
3	3.150	1596	252	0.169	0.438
4	3.256	1928	323	0.204	0.560
5	3.581	88393	8231	9.341	14.271
6	4.131	38353	2030	4.053	3.521
7	4.725	1709	218	0.181	0.378
8	4.858	1240	178	0.131	0.308
9	5.163	2548	173	0.269	0.300
10	5.436	8492	975	0.897	1.690
11	5.538	7634	957	0.807	1.660
12	5.846	14779	868	1.562	1.506
13	6.200	40211	2209	4.250	3.831
14	6.785	2274	116	0.240	0.201
15	7.295	4168	189	0.441	0.328
16	8.346	1283	67	0.136	0.116
17	10.902	1599	65	0.169	0.113
18	14.130	426268	20688	45.048	35.869
19	14.328	291053	19083	30.759	33.087
20	17.252	1115	61	0.118	0.106
Total		946245	57674	100.000	100.000

3. Kromatografi DALMS



1 Det.A Ch1/254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.635	51243	5583	8.586	11.556
2	2.858	91459	8419	15.325	17.426
3	3.159	96312	4714	16.138	9.756
4	3.514	21244	2656	3.560	5.498
5	3.667	43463	4561	7.283	9.440
6	3.979	77273	7207	12.948	14.919
7	4.098	77696	6790	13.019	14.054
8	4.406	24122	2816	4.042	5.828
9	4.483	47524	2799	7.963	5.794
10	5.100	4017	459	0.673	0.950
11	5.273	4202	334	0.704	0.691
12	5.508	3082	254	0.517	0.525
13	5.872	1830	112	0.307	0.231
14	6.694	1623	97	0.272	0.200
15	7.337	1210	103	0.203	0.214
16	10.069	9286	247	1.556	0.511
17	11.829	21908	618	3.671	1.278
18	16.402	2533	94	0.424	0.195
19	19.375	1890	73	0.317	0.151
20	20.209	14877	378	2.493	0.783
Total		596793	48312	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=α-tokotrienol; jingga=γ-tokotrienol; hijau=δ-tokotrienol;

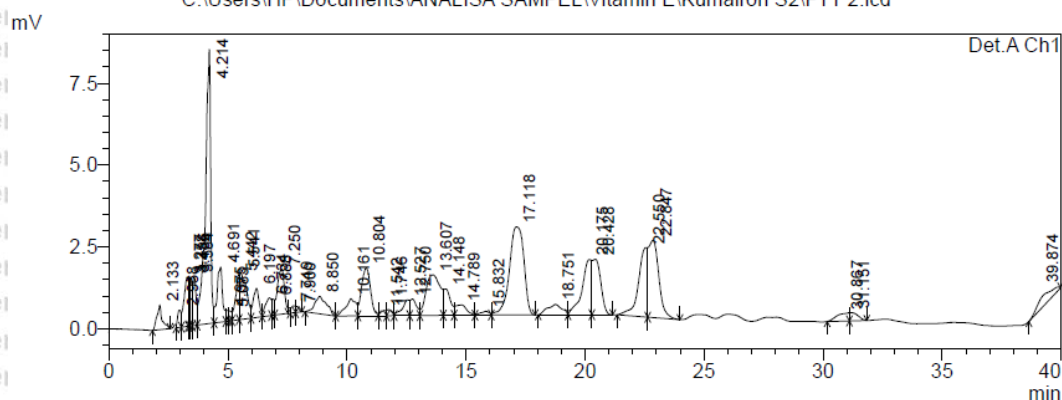
- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
α-tokoferol	20	2	ND	150635	ND	ND
α-tokotrienol	20	2	14877	598792	0,2484	2484,50
γ-tokotrienol	20	2	2533	174245	0,1453	1453,70
δ-tokotrienol	20	2	21908	426268	0,5139	5139,49

4. Kromatografi FTT

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\Vitamin E\Kumairoh S2\FTT 2.lcd



1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.133	11526	756	1.311	1.790
2	2.968	5243	525	0.596	1.242
3	3.277	18160	1498	2.065	3.548
4	3.358	5137	1476	0.584	3.495
5	3.435	9166	1496	1.042	3.542
6	3.584	14652	1508	1.666	3.572
7	4.214	130091	8372	14.794	19.825
8	4.691	27074	1680	3.079	3.977
9	4.975	2599	332	0.296	0.785
10	5.083	2007	306	0.228	0.725
11	5.442	14503	1359	1.649	3.218
12	5.541	28346	1443	3.224	3.416
13	6.197	14979	890	1.703	2.107
14	6.734	9156	549	1.041	1.301
15	6.888	4123	496	0.469	1.174
16	7.250	28118	1375	3.198	3.255
17	7.749	2572	213	0.293	0.504
18	7.900	1532	180	0.174	0.426
19	8.850	18273	531	2.078	1.258
20	10.161	15798	523	1.797	1.239
21	10.804	37980	1465	4.319	3.469
22	11.542	2755	155	0.313	0.366
23	11.746	2678	188	0.305	0.445
24	12.527	9956	480	1.132	1.137
25	12.750	9576	507	1.089	1.200

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
26	13.607	51344	1240	5.839	2.937
27	14.148	16041	808	1.824	1.914
28	14.789	10401	314	1.183	0.744
29	15.832	2964	118	0.337	0.279
30	17.118	114204	2693	12.988	6.376
31	18.751	13573	312	1.544	0.739
32	20.175	46775	1686	5.319	3.992
33	20.428	41779	1698	4.751	4.021
34	22.550	54900	2119	6.243	5.018
35	22.847	71412	2359	8.121	5.587
36	30.867	8578	224	0.975	0.530
37	31.151	6041	252	0.687	0.597
38	39.874	15309	105	1.741	0.248
Total		879321	42228	100.000	100.000

Keterangan:

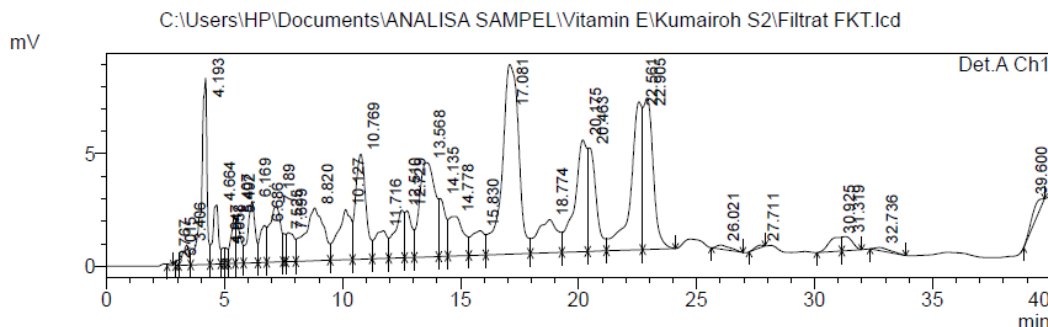
Warna ungu=α-tokoferol; biru=α-tokotrienol; jingga=γ-tokotrienol; hijau=δ-tokotrienol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
α-tokoferol	20	2	15309	150635	1,0163	10162,98
α-tokotrienol	20	2	71412	598792	1,1926	11926,01
γ-tokotrienol	20	2	114204	426117	2,6801	26801,09
δ-tokotrienol	20	2	51344	426268	1,2045	12045,00

5. Kromatografi FKT



1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.767	1547	108	0.059	0.126
2	3.015	1654	236	0.063	0.274
3	3.406	17140	898	0.651	1.041
4	4.193	137835	8301	5.235	9.632
5	4.664	44107	2644	1.675	3.068
6	4.947	6620	721	0.251	0.837
7	5.058	5805	710	0.220	0.824
8	5.407	25978	2071	0.987	2.403
9	5.492	29651	2049	1.126	2.378
10	6.169	58298	2726	2.214	3.163
11	6.686	31756	1646	1.206	1.910
12	7.189	80420	2455	3.054	2.849
13	7.525	8675	1255	0.329	1.457
14	7.699	30255	1294	1.149	1.501
15	8.820	131574	2353	4.997	2.730
16	10.127	85781	2228	3.258	2.585
17	10.769	140089	4669	5.321	5.417
18	11.716	44722	1232	1.699	1.429
19	12.510	59961	2119	2.277	2.459
20	12.729	41798	2086	1.587	2.421
21	13.568	194135	4192	7.373	4.864
22	14.135	50879	2574	1.932	2.987
23	14.778	74552	1756	2.831	2.038
24	15.830	42219	1087	1.603	1.261
25	17.081	411833	8431	15.641	9.782
26	18.774	86717	1470	3.294	1.706
27	20.175	181159	4969	6.880	5.766
28	20.463	110797	4599	4.208	5.336
29	22.561	222897	6572	8.466	7.625
30	22.905	197535	6736	7.502	7.816

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
31	26.021	7816	180	0.297	0.209
32	27.711	2715	107	0.103	0.124
33	30.925	22812	612	0.866	0.710
34	31.319	18137	624	0.689	0.724
35	32.736	6445	130	0.245	0.151
36	39.600	18639	343	0.708	0.398
Total		2632953	86183	100.000	100.000

Keterangan:

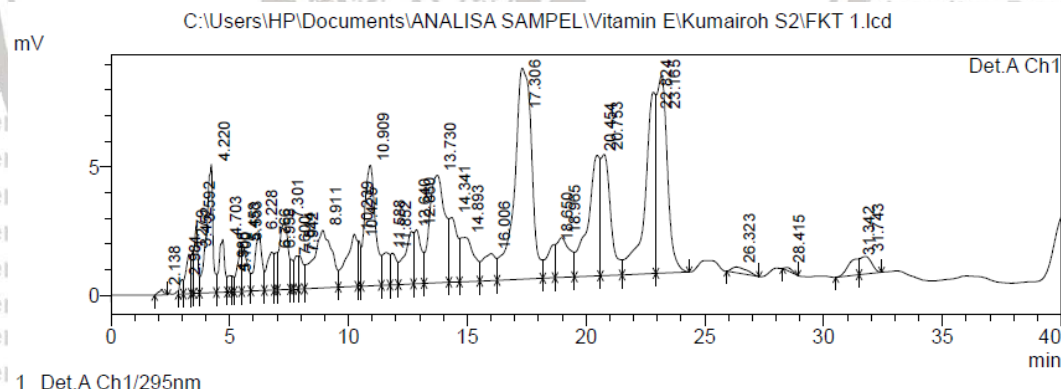
Warna ungu=α-tokoferol; biru=α-tokotrienol; jingga=γ-tokotrienol; hijau=δ-tokotrienol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
α-tokoferol	20	2	46371	150635	3,0784	30783,68
α-tokotrienol	20	2	269037	598792	4,4930	44929,96
γ-tokotrienol	20	2	454577	426117	10,6679	106678,92
δ-tokotrienol	20	2	212044	426268	4,9744	49744,29

6. Kromatografi FK



PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.138	3218	217	0.122	0.231
2	2.984	5554	566	0.210	0.603
3	3.279	22629	1541	0.857	1.641
4	3.452	10379	1684	0.393	1.793
5	3.592	26416	2649	1.000	2.820
6	4.220	95678	5009	3.622	5.333
7	4.703	34960	2057	1.323	2.190
8	4.988	6248	640	0.237	0.681
9	5.100	4491	624	0.170	0.664
10	5.458	21881	1766	0.828	1.880
11	5.553	29055	1819	1.100	1.937
12	6.228	46996	2238	1.779	2.383
13	6.766	29247	1484	1.107	1.580
14	6.958	12242	1458	0.463	1.552
15	7.301	65968	2604	2.497	2.772
16	7.600	8006	1168	0.303	1.243
17	7.814	15384	1293	0.582	1.377
18	7.942	17521	1279	0.663	1.362
19	8.911	121916	2244	4.615	2.389
20	10.239	65006	2038	2.461	2.170
21	10.425	15131	1778	0.573	1.893
22	10.909	145722	4707	5.516	5.011
23	11.588	26942	1269	1.020	1.351
24	11.852	22957	1231	0.869	1.311
25	12.640	53585	2051	2.028	2.184
26	12.860	46060	2106	1.744	2.242
27	13.730	189312	4197	7.166	4.469
28	14.341	58995	2527	2.233	2.691

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
29	14.893	68774	1728	2.603	1.840
30	16.006	40311	1051	1.526	1.119
31	17.306	415653	8228	15.734	8.759
32	18.650	31285	1297	1.184	1.381
33	18.965	62309	1556	2.359	1.657
34	20.454	168600	4702	6.382	5.006
35	20.753	135727	4727	5.138	5.032
36	22.824	224430	7069	8.496	7.526
37	23.165	237217	7699	8.980	8.197
38	26.323	10445	227	0.395	0.241
39	28.415	2608	90	0.099	0.096
40	31.342	19650	621	0.744	0.661
41	31.743	23159	688	0.877	0.733
Total		2641670	93929	100.000	100.000

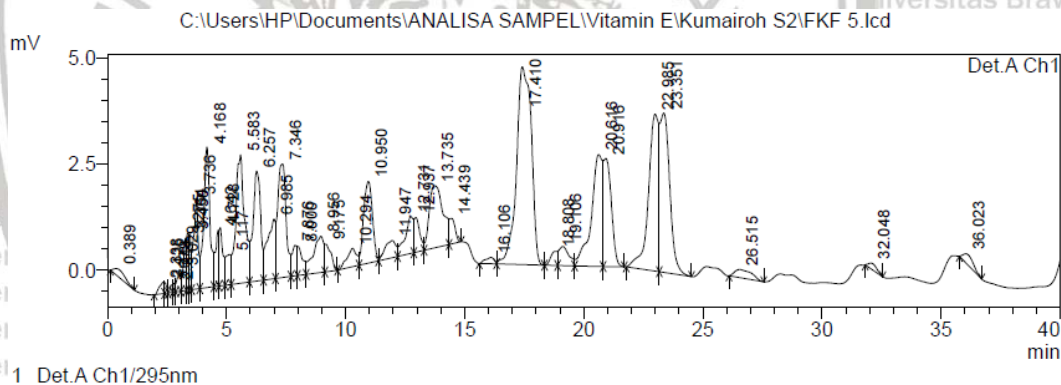
Keterangan:
 Warna ungu=α-tokoferol; biru=α-tokotrienol; jingga=γ-tokotrienol;
 hijau=δ-tokotrienol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
α-tokoferol	20	2	92154	150635	6,1177	61177,02
α-tokotrienol	20	2	287412	598792	4,7999	47998,64
γ-tokotrienol	20	2	464383	426117	10,8980	108980,16
δ-tokotrienol	20	2	209690	426268	4,9192	49192,06

7. Kromatografi FKF Kondisi Optimum



1 Det.A Ch1/295nm

PeakTable

Detector A Ch1 295nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.389	5626	154	0.448	0.296
2	2.338	3836	267	0.305	0.511
3	2.425	1581	252	0.126	0.482
4	2.679	1706	176	0.136	0.338
5	2.811	1346	213	0.107	0.408
6	3.029	5104	512	0.406	0.980
7	3.275	10738	1239	0.854	2.372
8	3.364	9164	1354	0.729	2.592
9	3.450	7243	1322	0.576	2.532
10	3.736	28036	2143	2.231	4.104
11	4.168	61368	3315	4.883	6.348
12	4.642	12906	1316	1.027	2.520
13	4.728	15315	1374	1.219	2.631
14	5.117	11115	710	0.884	1.360
15	5.583	77812	3026	6.192	5.793
16	6.257	58394	2589	4.646	4.958
17	6.985	32877	1405	2.616	2.691
18	7.346	66004	2679	5.252	5.130
19	7.876	10354	721	0.824	1.380
20	8.000	10046	684	0.799	1.309
21	8.956	26894	854	2.140	1.636
22	9.175	11001	649	0.875	1.242
23	10.294	12227	432	0.973	0.827
24	10.950	50133	1926	3.989	3.687
25	11.947	13001	405	1.035	0.776
26	12.731	21146	865	1.683	1.657
27	12.937	13513	813	1.075	1.557
28	13.735	59189	1462	4.710	2.799
29	14.439	9826	604	0.782	1.156

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
30	16.106	3973	152	0.316	0.291
31	17.410	202722	4660	16.131	8.923
32	18.808	6238	332	0.496	0.636
33	19.106	13622	452	1.084	0.866
34	20.616	86386	2637	6.874	5.049
35	20.916	58159	2547	4.628	4.877
36	22.985	110960	3697	8.829	7.080
37	23.351	106935	3756	8.509	7.192
38	26.515	9732	191	0.774	0.365
39	32.048	3421	131	0.272	0.251
40	36.023	7092	209	0.564	0.400
Total		1256741	52225	100.000	100.000

Keterangan:

Warna ungu=α-tokoferol; biru=α-tokotrienol; jingga=γ-tokotrienol;
hijau=δ-tokotrienol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

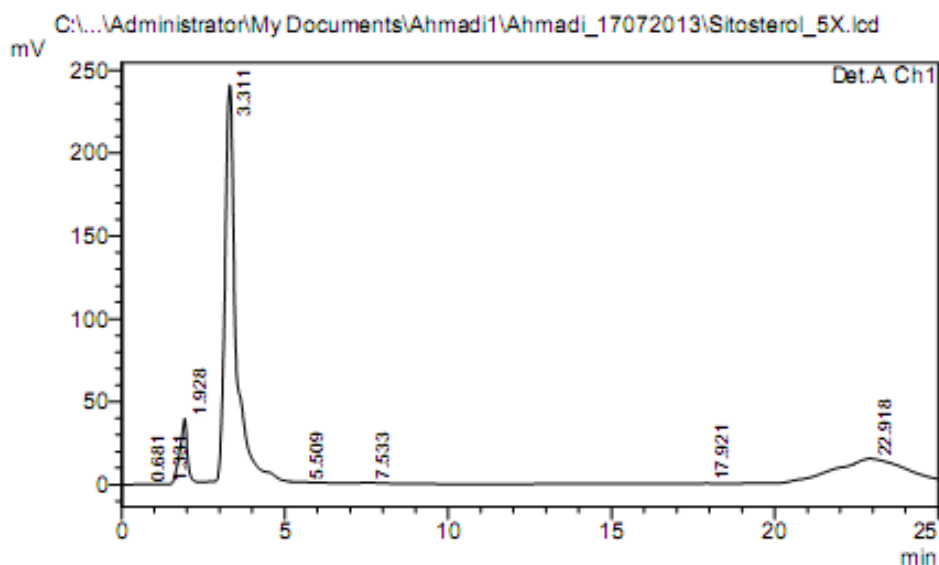
Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
α-tokoferol	20	2	7092	150635	1,8531	18530,64
α-tokotrienol	20	2	110960	598792	4,7999	47998,64
γ-tokotrienol	20	2	202722	426117	4,7574	47574,26
δ-tokotrienol	20	2	59189	426268	1,3885	13885,39



Lampiran 4. Hasil Analisa Komponen Fitosterol

1. Kromatografi Standar Fitosterol (2013)

a. β -Sitosterol

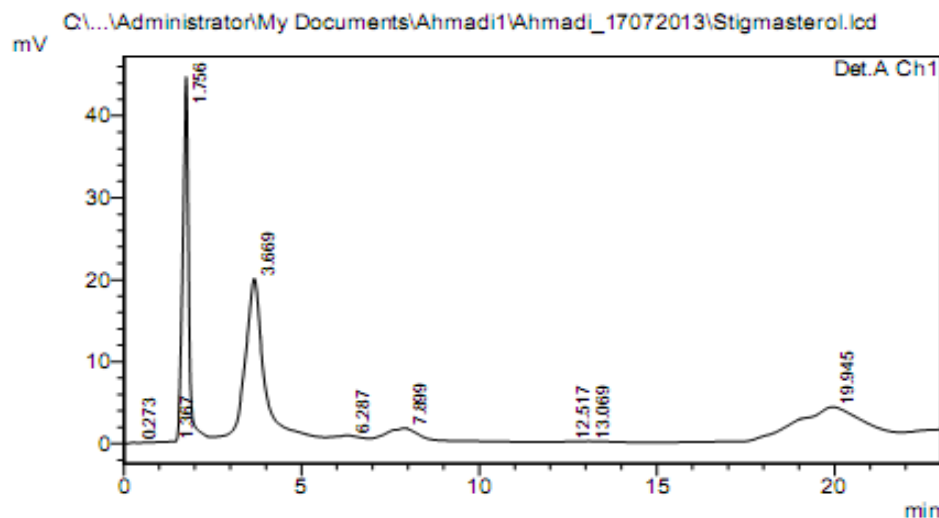


PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.681	533	38	0.006	0.013
2	1.331	2056	115	0.024	0.039
3	1.928	648155	39796	7.533	13.499
4	3.311	6071054	240983	70.557	81.742
5	5.509	1945	89	0.023	0.030
6	7.533	21668	473	0.252	0.160
7	17.921	559	42	0.006	0.014
8	22.918	1858558	13272	21.600	4.502
Total		8604528	294808	100.000	100.000

b. Stigmasterol



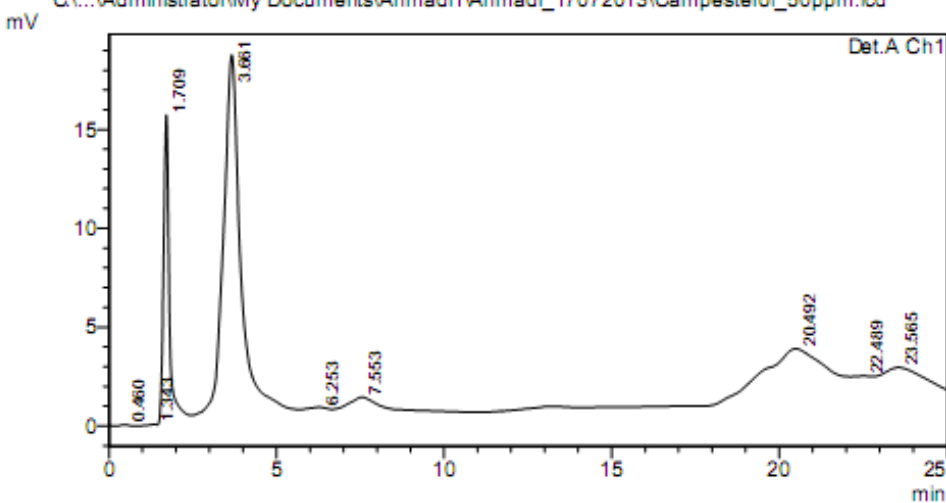
PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.273	1062	74	0.049	0.102
2	1.367	7405	195	0.344	0.269
3	1.756	537013	44675	24.964	61.462
4	3.669	796983	20026	37.050	27.551
5	6.287	43222	751	2.009	1.033
6	7.899	97096	1562	4.514	2.148
7	12.517	1272	62	0.059	0.086
8	13.069	7444	130	0.346	0.179
9	19.945	508773	3934	23.652	5.412
10	23.559	150842	1277	7.012	1.757
Total		2151112	72687	100.000	100.000

c. Kampesterol

C:\...Administrator\My Documents\Ahmadi1\Ahmadi_17072013\Campesterol_50ppm.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

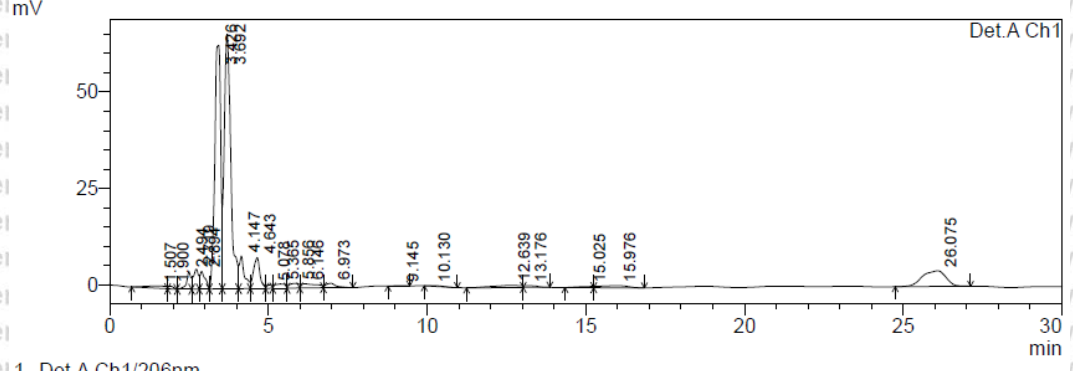
PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.460	550	41	0.043	0.108
2	1.343	394	42	0.031	0.111
3	1.709	193405	15664	15.245	41.345
4	3.661	750126	18517	59.127	48.877
5	6.253	3648	125	0.288	0.330
6	7.553	34418	641	2.713	1.691
7	20.492	224214	1984	17.673	5.236
8	22.489	2539	93	0.200	0.247
9	23.565	59373	779	4.680	2.055
Total		1268667	37885	100.000	100.000

2. Kromatografi Standar Fitosterol (2017)
 a. β -Sitosterol

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\Campesterol (Pak Ahmadi)\Standar B-Sitosterol 100 ppm.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

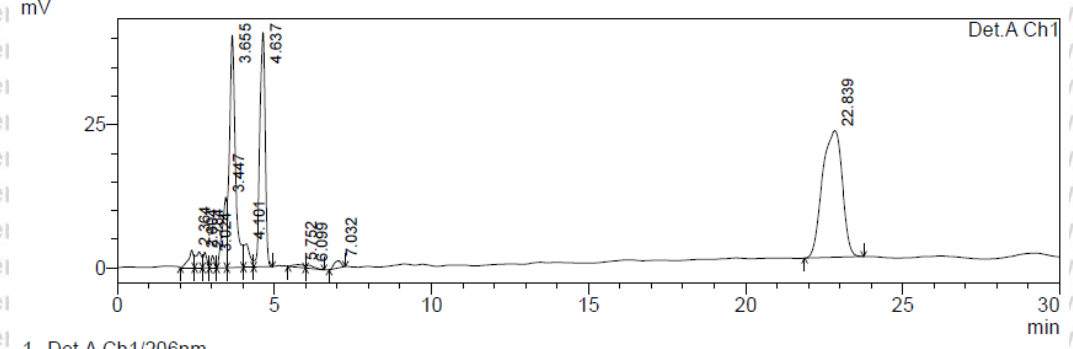
PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.507	26147	566	0.999	0.328
2	1.900	7812	681	0.298	0.395
3	2.494	42221	4586	1.613	2.658
4	2.719	58328	5143	2.229	2.981
5	2.894	52526	4602	2.007	2.667
6	3.426	840573	63137	32.118	36.593
7	3.692	945041	65973	36.109	38.236
8	4.147	96997	8453	3.706	4.899
9	4.643	111744	7989	4.270	4.630
10	5.078	11385	925	0.435	0.536
11	5.365	27707	1102	1.059	0.638
12	5.856	25626	1196	0.979	0.693
13	6.146	39671	1083	1.516	0.627
14	6.973	25853	1104	0.988	0.640
15	9.145	1545	70	0.059	0.041
16	10.130	5895	135	0.225	0.078
17	12.639	34749	539	1.328	0.312
18	13.176	12009	418	0.459	0.242
19	15.025	9810	273	0.375	0.158
20	15.976	32638	542	1.247	0.314
21	26.075	208895	4024	7.982	2.332
Total		2617171	172540	100.000	100.000

b. Stigmasterol

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\Campesterol (Pak Ahmadi)\Standar Sigmasterol 100 ppm.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

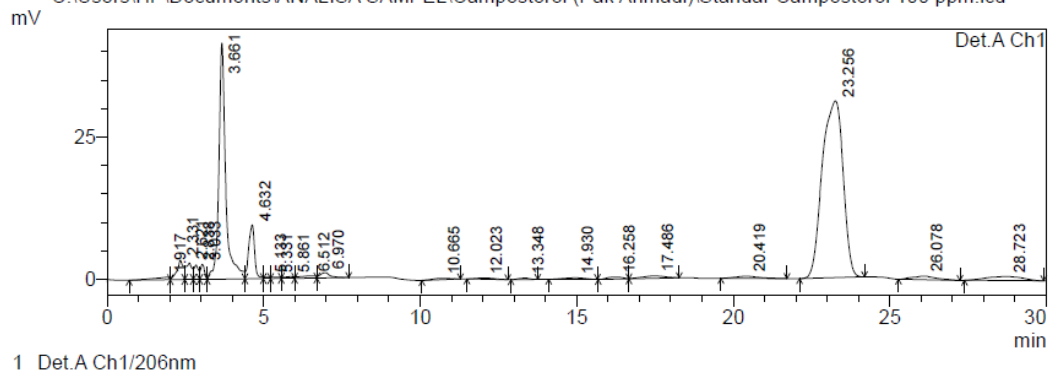
PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.364	37005	3083	1.598	2.316
2	2.604	33120	2802	1.431	2.104
3	2.784	23131	2729	0.999	2.050
4	3.024	15419	2130	0.666	1.600
5	3.447	127938	12338	5.526	9.266
6	3.655	529580	40582	22.875	30.478
7	4.101	53695	4104	2.319	3.082
8	4.637	481057	40964	20.779	30.765
9	5.752	12061	491	0.521	0.369
10	6.099	9094	527	0.393	0.396
11	7.032	19670	1283	0.850	0.963
12	22.839	973313	22119	42.042	16.612
Total		2315084	133152	100.000	100.000

c. Kampesterol

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\Campesterol (Pak Ahmadi)\Standar Campesterol 100 ppm.lcd

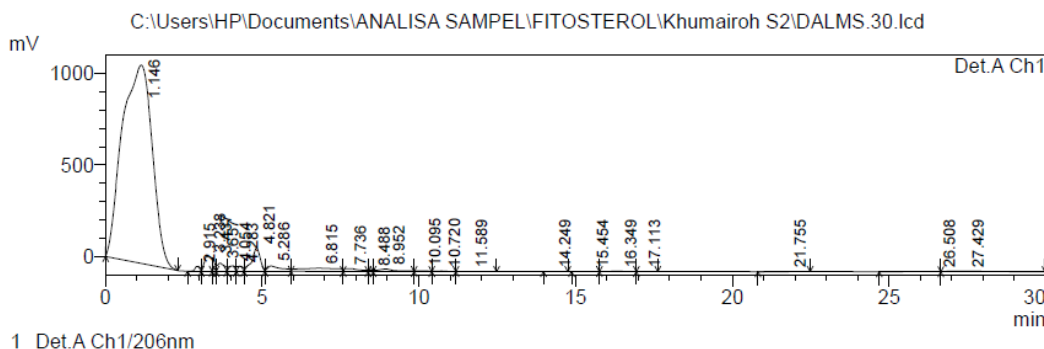


PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.917	15988	435	0.621	0.437
2	2.331	48684	3417	1.890	3.433
3	2.621	37861	2883	1.470	2.896
4	2.838	25093	2523	0.974	2.534
5	3.033	23667	2624	0.919	2.636
6	3.661	629581	41486	24.447	41.669
7	4.632	122564	9473	4.759	9.515
8	5.133	3622	266	0.141	0.267
9	5.331	5088	280	0.198	0.281
10	5.861	6576	315	0.255	0.316
11	6.512	14248	398	0.553	0.400
12	6.970	21471	916	0.834	0.920
13	10.665	9672	256	0.376	0.257
14	12.023	9331	212	0.362	0.213
15	13.348	6578	260	0.255	0.261
16	14.930	12787	253	0.497	0.254
17	16.258	11812	361	0.459	0.363
18	17.486	21547	413	0.837	0.415
19	20.419	19706	378	0.765	0.379
20	23.256	1438651	31050	55.864	31.187
21	26.078	33315	637	1.294	0.640
22	28.723	57419	724	2.230	0.727
Total		2575260	99559	100.000	100.000

3. Kromatografi DALMS



1 Det.A Ch1 206nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.146	71441509	1077969	87.568	67.978
2	2.915	295579	26520	0.362	1.672
3	3.238	1286547	82348	1.577	5.193
4	3.437	430810	74278	0.528	4.684
5	3.657	698693	44596	0.856	2.812
6	4.054	470240	30009	0.576	1.892
7	4.283	354047	27308	0.434	1.722
8	4.821	2376310	127698	2.913	8.053
9	5.286	906976	29321	1.112	1.849
10	6.815	1508598	17800	1.849	1.122
11	7.736	518747	14894	0.636	0.939
12	8.488	62111	6567	0.076	0.414
13	8.952	519394	12682	0.637	0.800
14	10.095	97201	3514	0.119	0.222
15	10.720	53553	2074	0.066	0.131
16	11.589	19906	374	0.024	0.024
17	14.249	3730	139	0.005	0.009
18	15.454	12290	338	0.015	0.021
19	16.349	45375	1232	0.056	0.078
20	17.113	3153	115	0.004	0.007
21	21.755	25632	435	0.031	0.027
22	26.508	132943	2068	0.163	0.130
23	27.429	320481	3477	0.393	0.219
Total		81583827	1585757	100.000	100.000

Keterangan:

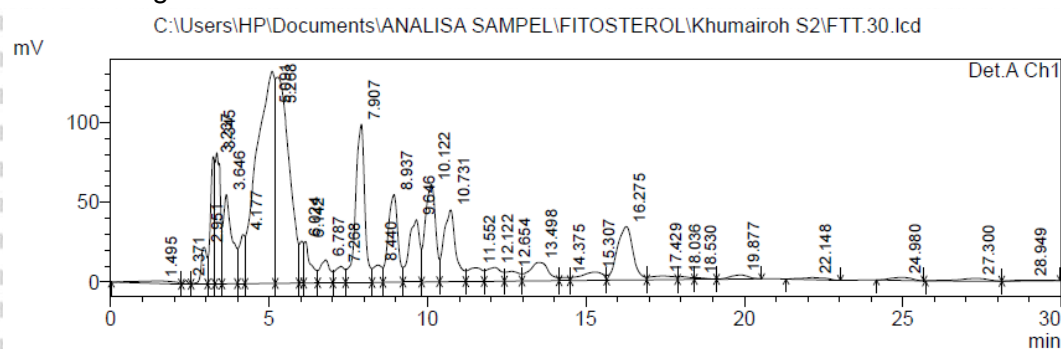
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	320481	1858558	1,7244	17243,53
Stigmasterol	20	2	25632	508773	0,5038	5038,00
Kampesterol	20	2	132943	1438651	0,9241	9240,81

4. Kromatografi FTT



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.495	132426	1563	0.557	0.154
2	2.371	18792	2349	0.079	0.232
3	2.951	278051	22917	1.170	2.263
4	3.237	744498	79830	3.132	7.882
5	3.345	914082	82158	3.845	8.112
6	3.646	1061905	56008	4.467	5.530
7	4.177	394121	30731	1.658	3.034
8	5.091	5203884	132865	21.891	13.119
9	5.268	3786845	129121	15.930	12.750
10	6.024	216955	26380	0.913	2.605
11	6.142	384014	26167	1.615	2.584
12	6.787	306662	14379	1.290	1.420
13	7.268	211652	10223	0.890	1.009
14	7.907	2005129	99106	8.435	9.786
15	8.440	204333	10851	0.860	1.071
16	8.937	1166949	54897	4.909	5.421
17	9.646	920426	38979	3.872	3.849
18	10.122	1381632	60910	5.812	6.014
19	10.731	1176034	44988	4.947	4.442
20	11.552	271288	8473	1.141	0.837
21	12.122	282474	8626	1.188	0.852
22	12.654	182739	6178	0.769	0.610
23	13.498	488947	11496	2.057	1.135
24	14.375	41776	2034	0.176	0.201
25	15.307	253949	5102	1.068	0.504
26	16.275	1159020	33500	4.876	3.308
27	17.429	115941	2284	0.488	0.225
28	18.036	46861	1769	0.197	0.175

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
29	18.530	24170	1049	0.102	0.104
30	19.877	96936	2487	0.408	0.246
31	22.148	76564	1391	0.322	0.137
32	24.980	82865	1815	0.349	0.179
33	27.300	104834	1561	0.441	0.154
34	28.949	34527	566	0.145	0.056
Total		23771283	1012750	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

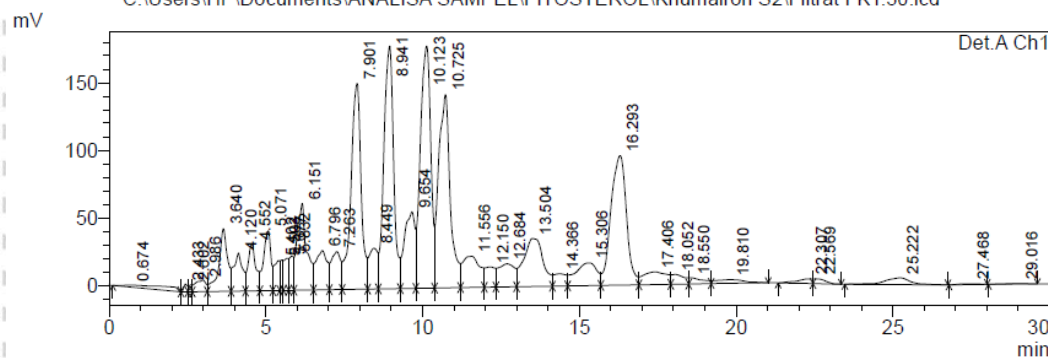
- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	104834	1858558	0,5641	5640,61
Stigmasterol	20	2	96936	508773	1,9053	19052,89
Kampesterol	20	2	82865	1438651	0,5760	5759,91

5. Kromatografi FKT

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\FITOSTEROL\Khumairoh S2\Filtrat FKT.30.lcd



1 Det.A Ch1/206nm



PeakTable
Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.674	249100	1484	0.751	0.108
2	2.433	47936	5698	0.145	0.414
3	2.602	38741	5035	0.117	0.365
4	2.986	199241	8405	0.601	0.610
5	3.640	897309	46317	2.707	3.361
6	4.120	548166	28057	1.654	2.036
7	4.552	607693	34766	1.833	2.523
8	5.071	709244	44211	2.140	3.208
9	5.402	263226	22053	0.794	1.600
10	5.503	155295	22432	0.468	1.628
11	5.677	231213	23709	0.697	1.721
12	5.832	258400	25422	0.779	1.845
13	6.151	1390364	64027	4.194	4.646
14	6.796	725017	28987	2.187	2.104
15	7.263	591717	28088	1.785	2.038
16	7.901	3444803	152167	10.392	11.042
17	8.449	564206	30139	1.702	2.187
18	8.941	3863015	179600	11.653	13.033
19	9.654	1320874	56687	3.985	4.114
20	10.123	4130021	179110	12.459	12.998
21	10.725	3683173	142893	11.111	10.369
22	11.556	879789	23038	2.654	1.672
23	12.150	319099	14963	0.963	1.086
24	12.684	607291	17031	1.832	1.236
25	13.504	1534750	35410	4.630	2.570
26	14.366	253362	8972	0.764	0.651
27	15.306	789394	16811	2.381	1.220
28	16.293	3292955	95783	9.934	6.951

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
29	17.406	486179	9284	1.467	0.674
30	18.052	207732	7198	0.627	0.522
31	18.550	137430	4436	0.415	0.322
32	19.810	173889	2847	0.525	0.207
33	22.307	119475	3419	0.360	0.248
34	22.569	94056	3539	0.284	0.257
35	25.222	283643	4932	0.856	0.358
36	27.468	25461	605	0.077	0.044
37	29.016	26559	462	0.080	0.034
Total		33149814	1378021	100.000	100.000

Keterangan:

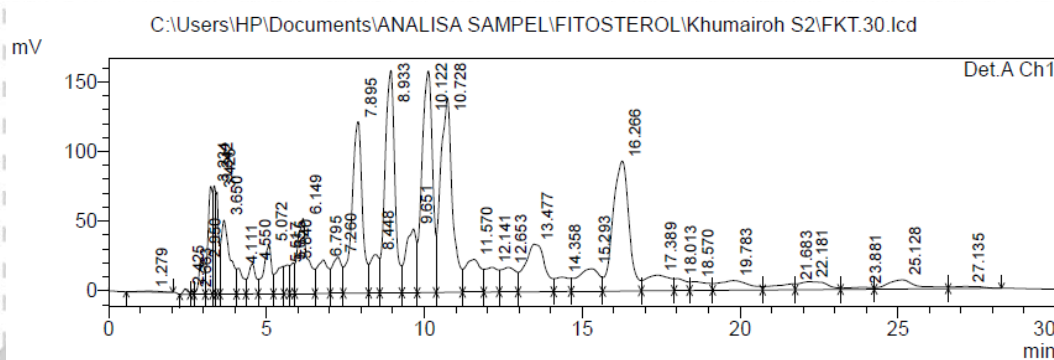
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
- Berat standar = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	283643	1858558	1,5261	15261,46
Stigmasterol	20	2	173889	508773	3,4178	34178,11
Kampesterol	20	2	119475	1438651	0,8305	8304,65

6. Kromatografi FK



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.279	28103	605	0.085	0.041
2	2.425	42556	3990	0.129	0.271
3	2.663	13009	1912	0.039	0.130
4	2.950	290127	23752	0.877	1.612
5	3.234	734651	77455	2.221	5.255
6	3.342	487558	77765	1.474	5.276
7	3.426	417104	73451	1.261	4.983
8	3.650	1055962	53033	3.192	3.598
9	4.111	261370	18509	0.790	1.256
10	4.550	356447	21675	1.078	1.471
11	5.072	606965	34826	1.835	2.363
12	5.517	348071	19683	1.052	1.335
13	5.655	212617	20650	0.643	1.401
14	5.840	213314	22080	0.645	1.498
15	6.149	1214739	53880	3.672	3.656
16	6.795	592867	24084	1.792	1.634
17	7.260	552898	25977	1.671	1.763
18	7.895	2854810	123091	8.630	8.351
19	8.448	527875	27685	1.596	1.878
20	8.933	3427021	159598	10.360	10.828
21	9.651	1065118	45812	3.220	3.108
22	10.122	3655424	159140	11.050	10.797
23	10.728	3629054	139677	10.971	9.477
24	11.570	819221	23556	2.476	1.598
25	12.141	490019	17822	1.481	1.209
26	12.653	586942	17627	1.774	1.196
27	13.477	1504874	34043	4.549	2.310
28	14.358	328952	10349	0.994	0.702

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
29	15.293	774948	16202	2.343	1.099
30	16.266	3287480	93302	9.938	6.330
31	17.389	611129	11288	1.847	0.766
32	18.013	223644	8578	0.676	0.582
33	18.570	251812	6463	0.761	0.439
34	19.783	474445	6866	1.434	0.466
35	21.683	205747	4285	0.622	0.291
36	22.181	352727	5768	1.066	0.391
37	23.881	75373	1332	0.228	0.090
38	25.128	410983	6568	1.242	0.446
39	27.135	94031	1511	0.284	0.103
Total		33079989	1473888	100.000	100.000

Keterangan:

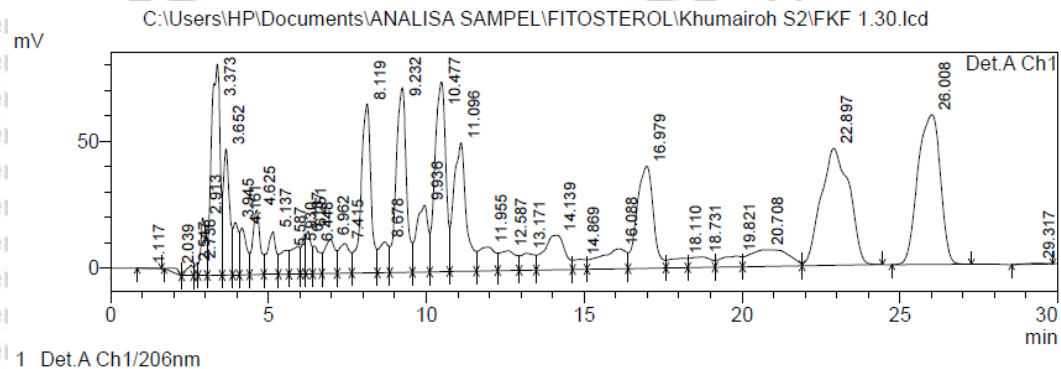
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	410983	1858558	2,2113	22113,00
Stigmasterol	20	2	474445	508773	9,3253	93252,79
Kampesterol	20	2	352727	1438651	2,4518	24517,89

7. Kromatografi FKF 1 (6:1, 48 jam)



PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.117	1820	77	0.008	0.009
2	2.039	34861	1930	0.152	0.226
3	2.547	55495	4169	0.243	0.489
4	2.738	38129	5109	0.167	0.599
5	2.913	257656	22674	1.126	2.657
6	3.373	1584757	83157	6.928	9.745
7	3.652	688800	49662	3.011	5.820
8	3.945	237208	20664	1.037	2.422
9	4.161	276793	18469	1.210	2.164
10	4.625	419299	25399	1.833	2.976
11	5.137	314026	16738	1.373	1.961
12	5.587	177493	9440	0.776	1.106
13	5.930	218139	11053	0.954	1.295
14	6.137	133835	15252	0.585	1.787
15	6.251	191052	16770	0.835	1.965
16	6.448	164068	10963	0.717	1.285
17	6.962	314956	13532	1.377	1.586
18	7.415	281072	11728	1.229	1.374
19	8.119	1443112	66510	6.309	7.794
20	8.678	254718	12072	1.114	1.415
21	9.232	1622285	72688	7.092	8.518
22	9.936	665733	26300	2.910	3.082
23	10.477	1767113	74769	7.725	8.762
24	11.096	1371224	50585	5.995	5.928
25	11.955	342484	9380	1.497	1.099
26	12.587	285779	7795	1.249	0.914
27	13.171	202674	6664	0.886	0.781
28	14.139	623058	13611	2.724	1.595
29	14.869	103741	3952	0.454	0.463

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
30	16.088	458242	7843	2.003	0.919
31	16.979	1443513	40211	6.311	4.712
32	18.110	146967	3817	0.643	0.447
33	18.731	191154	4070	0.836	0.477
34	19.821	196675	4268	0.860	0.500
35	20.708	567091	6597	2.479	0.773
36	22.897	2868187	46117	12.539	5.404
37	26.008	2916409	58969	12.750	6.910
38	29.317	14252	340	0.062	0.040
Total		22873869	853344	100.000	100.000

Keterangan:

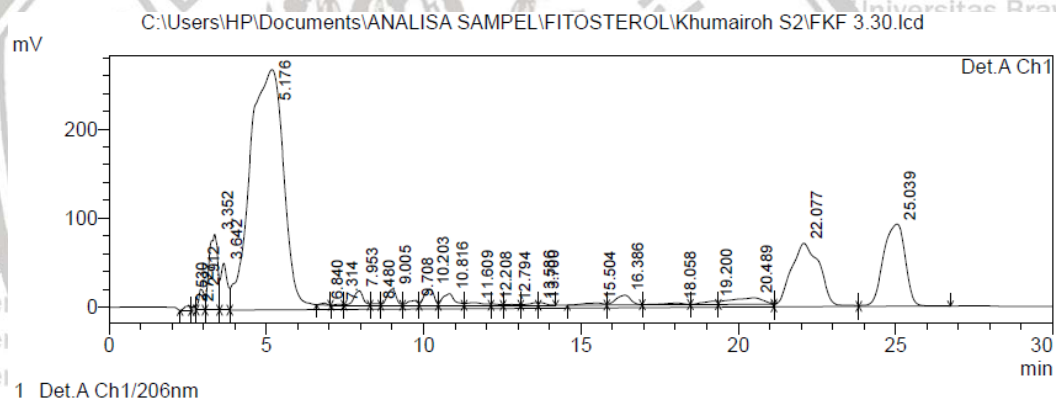
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2916409	1858558	15,6918	156917,84
Stigmasterol	20	2	196675	508773	3,8657	38656,73
Kampesterol	20	2	2868187	1438651	19,9366	199366,42

8. Kromatografi FKF 2 (10:1, 48 jam)



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.530	68648	5263	0.181	0.735
2	2.727	43394	5265	0.115	0.735
3	2.912	271699	23541	0.718	3.288
4	3.352	1626431	85007	4.297	11.873
5	3.642	755329	52573	1.995	7.343
6	5.176	23174158	269622	61.221	37.660
7	6.840	26113	1996	0.069	0.279
8	7.314	18473	1228	0.049	0.172
9	7.953	321786	16114	0.850	2.251
10	8.480	32837	1816	0.087	0.254
11	9.005	355722	18090	0.940	2.527
12	9.708	111638	5162	0.295	0.721
13	10.203	389488	17932	1.029	2.505
14	10.816	330724	12957	0.874	1.810
15	11.609	102459	2572	0.271	0.359
16	12.208	23004	1302	0.061	0.182
17	12.794	27502	956	0.073	0.134
18	13.586	54470	2656	0.144	0.371
19	13.700	41539	2638	0.110	0.368
20	15.504	98740	2162	0.261	0.302
21	16.386	351698	10887	0.929	1.521
22	18.058	83045	1606	0.219	0.224
23	19.200	119102	3625	0.315	0.506
24	20.489	510981	7374	1.350	1.030
25	22.077	4473693	71321	11.819	9.962
26	25.039	4440404	92278	11.731	12.889
Total		37853076	715943	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

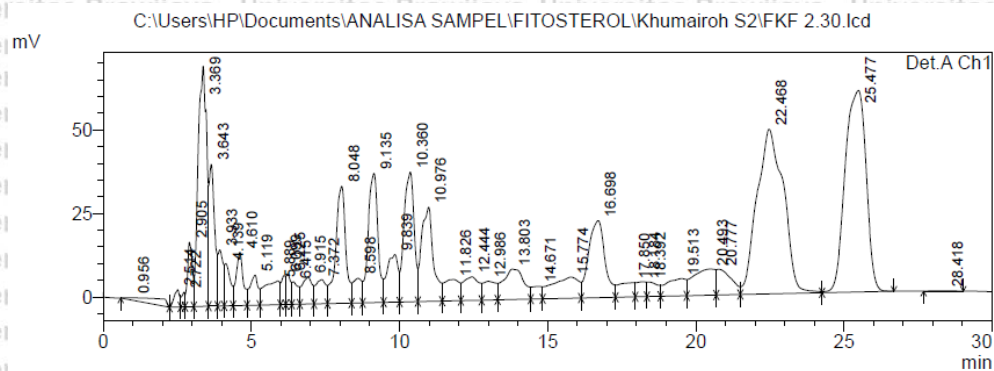
- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	4440404	1858558	23,8917	238916,62
Stigmasterol	20	2	510981	508773	10,0434	100433,98
Kampesterol	20	2	4473693	1438651	31,0964	310964,44



9. Kromatografi FKF 3 (6:1, 96 jam)



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.956	114352	646	0.640	0.106
2	2.514	66060	5123	0.370	0.837
3	2.722	33054	4341	0.185	0.709
4	2.905	213720	19279	1.197	3.149
5	3.369	1439082	71912	8.059	11.745
6	3.643	555777	42455	3.112	6.934
7	3.933	193381	16789	1.083	2.742
8	4.139	172717	12666	0.967	2.069
9	4.610	265594	15818	1.487	2.583
10	5.119	169214	9011	0.948	1.472
11	5.889	259790	7135	1.455	1.165
12	6.099	83369	8656	0.467	1.414
13	6.225	100999	9230	0.566	1.507
14	6.415	97738	6731	0.547	1.099
15	6.915	190501	8122	1.067	1.327
16	7.372	171056	7215	0.958	1.178
17	8.048	815051	35019	4.564	5.719
18	8.598	153369	7389	0.859	1.207
19	9.135	883733	38684	4.949	6.318
20	9.839	364798	14255	2.043	2.328
21	10.360	927414	38826	5.193	6.341
22	10.976	786254	28162	4.403	4.599
23	11.826	223256	6376	1.250	1.041
24	12.444	258898	7041	1.450	1.150
25	12.986	169848	5607	0.951	0.916
26	13.803	441904	9121	2.475	1.490
27	14.671	91274	3774	0.511	0.616

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	15.774	394188	6318	2.207	1.032
29	16.698	884920	23047	4.956	3.764
30	17.850	163052	4276	0.913	0.698
31	18.184	103027	4457	0.577	0.728
32	18.392	106262	4371	0.595	0.714
33	19.513	237485	5191	1.330	0.848
34	20.493	406306	7806	2.275	1.275
35	20.777	267069	7658	1.496	1.251
36	22.468	3073400	49302	17.211	8.052
37	25.477	2972326	60326	16.645	9.853
38	28.418	7011	156	0.039	0.026
Total		17857249	612292	100.000	100.000



Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

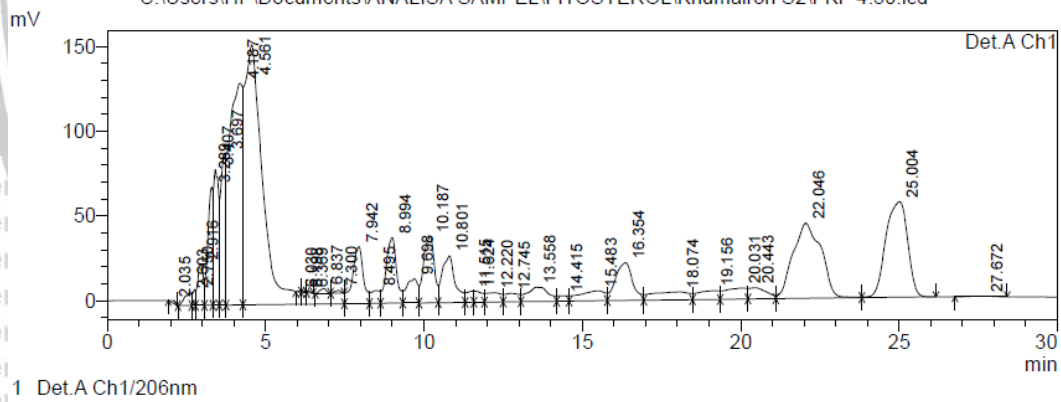
$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar}} \times 100\%$$

Berat Sampel Injeksi

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2972326	1858558	15,9926	159926,46
Stigmasterol	20	2	406306	508773	7,9860	79859,98
Kampesterol	20	2	3073400	1438651	21,3631	213630,69

10. Kromatografi FKF 4 (10:1, 96 jam)

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\FITOSTEROL\Khumairoh S2\FKF 4.30.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.035	13627	1127	0.052	0.123
2	2.603	111350	7682	0.426	0.835
3	2.750	61118	9265	0.234	1.007
4	2.916	295495	24424	1.130	2.655
5	3.289	731338	69689	2.797	7.576
6	3.407	913196	80008	3.492	8.698
7	3.697	1005033	89498	3.843	9.730
8	4.187	3717269	130724	14.214	14.212
9	4.561	6543330	153253	25.021	16.661
10	6.030	4258	706	0.016	0.077
11	6.198	6379	879	0.024	0.096
12	6.369	5940	853	0.023	0.093
13	6.837	38670	2857	0.148	0.311
14	7.300	21092	1615	0.081	0.176
15	7.942	794616	33555	3.039	3.648
16	8.495	148951	7572	0.570	0.823
17	8.994	870310	38708	3.328	4.208
18	9.698	348441	14215	1.332	1.545
19	10.187	914801	38925	3.498	4.232
20	10.801	780228	27460	2.983	2.985
21	11.515	101154	6388	0.387	0.695
22	11.624	115669	6369	0.442	0.692
23	12.220	181950	5525	0.696	0.601
24	12.745	155172	4916	0.593	0.535
25	13.558	394152	8338	1.507	0.906
26	14.415	72811	3134	0.278	0.341
27	15.483	328074	5839	1.255	0.635

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	16.354	831531	22279	3.180	2.422
29	18.074	381999	4647	1.461	0.505
30	19.156	241525	5199	0.924	0.565
31	20.031	310995	6483	1.189	0.705
32	20.443	254918	6598	0.975	0.717
33	22.046	2740452	44430	10.479	4.830
34	25.004	2697494	56306	10.315	6.122
35	27.672	18129	347	0.069	0.038
Total		26151470	919811	100.000	100.000

Keterangan:

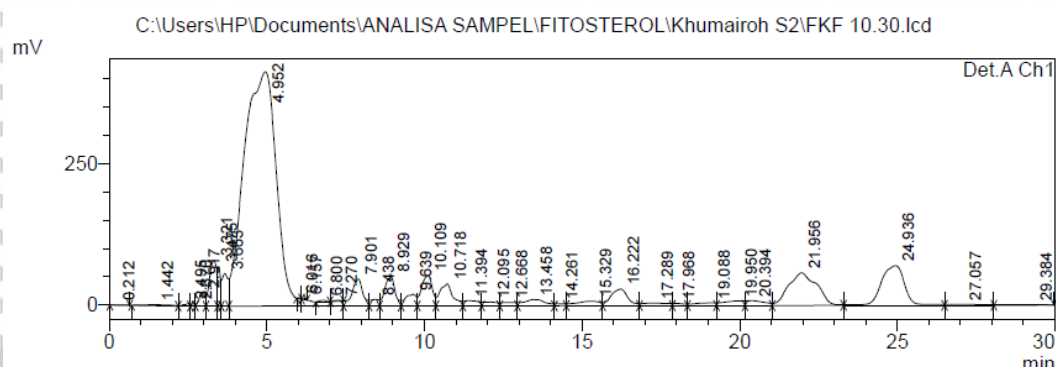
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2697494	1858558	14,5139	145139,08
Stigmasterol	20	2	310995	508773	6,1126	61126,47
Kampesterol	20	2	2740452	1438651	19,0488	190487,62

11. Kromatografi FKF 5 (5,17:1, 72 jam)



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.212	2543	125	0.005	0.011
2	1.442	94850	1520	0.190	0.135
3	2.495	57783	4363	0.116	0.388
4	2.670	36770	4168	0.074	0.370
5	2.917	313122	24333	0.629	2.162
6	3.321	1274595	80894	2.560	7.186
7	3.475	452373	70341	0.909	6.249
8	3.663	727906	57655	1.462	5.122
9	4.952	29916976	414746	60.085	36.844
10	6.016	9975	1439	0.020	0.128
11	6.157	17419	2757	0.035	0.245
12	6.800	39263	2992	0.079	0.266
13	7.270	28152	2150	0.057	0.191
14	7.901	1138961	47596	2.287	4.228
15	8.438	217284	11441	0.436	1.016
16	8.929	1170643	52055	2.351	4.624
17	9.639	500256	20449	1.005	1.817
18	10.109	1262722	54092	2.536	4.805
19	10.718	1108297	38907	2.226	3.456
20	11.394	293838	8981	0.590	0.798
21	12.095	215093	6836	0.432	0.607
22	12.668	193154	6031	0.388	0.536
23	13.458	520332	11067	1.045	0.983
24	14.261	82794	3668	0.166	0.326
25	15.329	408896	7821	0.821	0.695
26	16.222	1073768	29463	2.157	2.617
27	17.289	252049	4284	0.506	0.381

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	17.968	98460	3816	0.198	0.339
29	19.088	218674	4702	0.439	0.418
30	19.950	370603	8123	0.744	0.722
31	20.394	340286	8349	0.683	0.742
32	21.956	3586587	57712	7.203	5.127
33	24.936	3567435	70227	7.165	6.239
34	27.057	132016	1877	0.265	0.167
35	29.384	67009	710	0.135	0.063
Total		49790885	1125690	100.000	100.000

Keterangan:

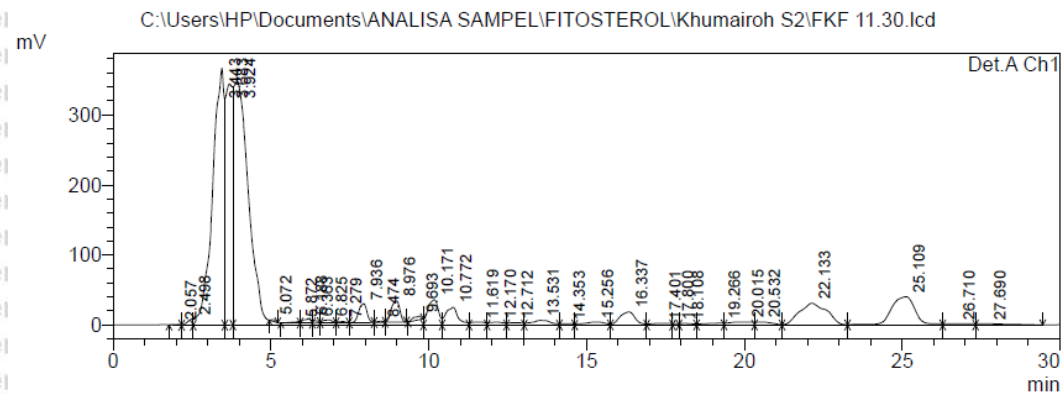
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	3567435	1858558	19,1946	191946,39
Stigmasterol	20	2	370603	508773	7,2843	72842,50
Kampesterol	20	2	3586587	1438651	12,9647	129647,08

12. Kromatografi FKF 6 (10,83:1, 72 jam)



PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.057	7701	759	0.021	0.056
2	2.498	103580	8971	0.283	0.665
3	3.443	9406518	366651	25.741	27.194
4	3.683	5065615	344260	13.862	25.533
5	3.924	12582054	346975	34.430	25.735
6	5.072	21224	2306	0.058	0.171
7	5.872	33618	2034	0.092	0.151
8	6.188	102200	6122	0.280	0.454
9	6.363	43016	3496	0.118	0.259
10	6.825	90077	4488	0.246	0.333
11	7.279	30535	1861	0.084	0.138
12	7.936	488927	26907	1.338	1.996
13	8.474	24079	1582	0.066	0.117
14	8.976	568558	30479	1.556	2.261
15	9.693	94206	5057	0.258	0.375
16	10.171	835309	36190	2.286	2.684
17	10.772	682156	25414	1.867	1.885
18	11.619	128037	4051	0.350	0.300
19	12.170	128377	3928	0.351	0.291
20	12.712	100767	3251	0.276	0.241
21	13.531	282105	6435	0.772	0.477
22	14.353	54520	1973	0.149	0.146
23	15.256	189737	4003	0.519	0.297
24	16.337	629290	18585	1.722	1.378
25	17.401	103525	2344	0.283	0.174
26	17.800	25030	2100	0.068	0.156
27	18.108	65342	2199	0.179	0.163

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	19.266	113687	2669	0.311	0.198
29	20.015	218247	4369	0.597	0.324
30	20.532	151120	4189	0.414	0.311
31	22.133	1865169	30980	5.104	2.298
32	25.109	2088396	40202	5.715	2.982
33	26.710	105777	1748	0.289	0.130
34	27.690	114919	1699	0.314	0.126
Total		36543416	1348278	100.000	100.000

Keterangan:

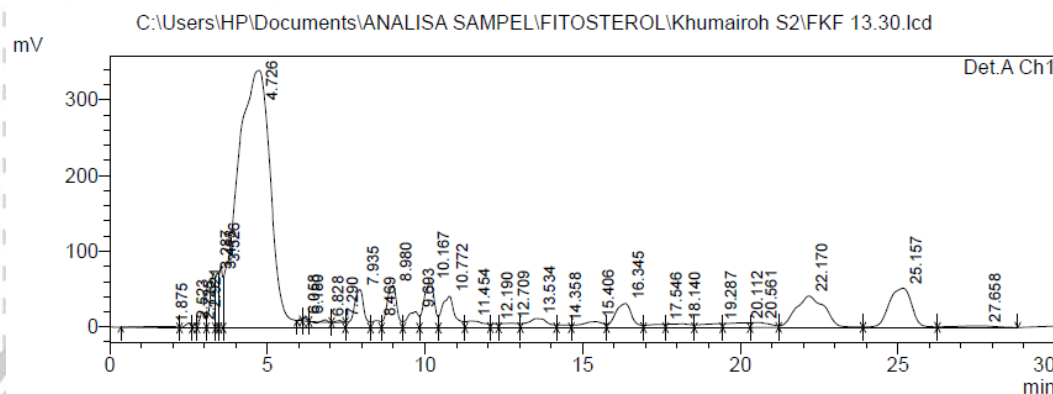
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2088396	1858558	11,2366	112366,47
Stigmasterol	20	2	218247	508773	4,2897	42896,74
Kampesterol	20	2	1865169	1438651	24,9302	249302,09

13. Kromatografi FKF 7 (8:1, 38,06 jam)



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.875	114788	1735	0.269	0.164
2	2.523	86439	6771	0.203	0.642
3	2.725	47029	5525	0.110	0.524
4	2.921	264310	21672	0.620	2.055
5	3.287	779100	72470	1.828	6.873
6	3.413	495204	72712	1.162	6.896
7	3.526	595898	82101	1.399	7.786
8	4.726	25040684	340460	58.768	32.287
9	6.058	23341	3474	0.055	0.329
10	6.180	36826	5022	0.086	0.476
11	6.828	13899	2901	0.033	0.275
12	7.290	32552	2459	0.076	0.233
13	7.935	1136316	50802	2.667	4.818
14	8.469	185519	9549	0.435	0.906
15	8.980	1211498	56047	2.843	5.315
16	9.693	517872	21377	1.215	2.027
17	10.167	1378590	59085	3.235	5.603
18	10.772	1158258	41689	2.718	3.954
19	11.454	359477	9111	0.844	0.864
20	12.190	79982	5226	0.188	0.496
21	12.709	235300	6234	0.552	0.591
22	13.534	548954	12119	1.288	1.149
23	14.358	102115	3787	0.240	0.359
24	15.406	381333	7721	0.895	0.732
25	16.345	1145289	31871	2.688	3.022
26	17.546	166474	4365	0.391	0.414
27	18.140	242889	4909	0.570	0.466

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	19.287	242198	5057	0.568	0.480
29	20.112	308091	6386	0.723	0.606
30	20.561	282982	6775	0.664	0.642
31	22.170	2648086	41524	6.215	3.938
32	25.157	2585886	51812	6.069	4.913
33	27.658	162389	1734	0.381	0.164
Total		42609571	1054479	100.000	100.000

Keterangan:
 Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

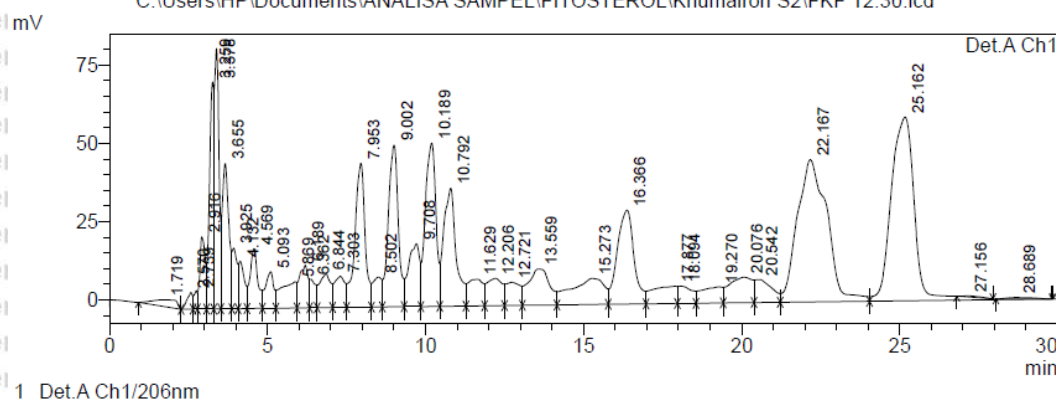
- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2585886	1858558	13,9134	139133,99
Stigmasterol	20	2	308091	508773	6,0556	60555,69
Kampesterol	20	2	2648086	1438651	18,4067	184067,29

14. Kromatografi FKF 8 (8:1, 105,94 jam)

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\FITOSTEROL\Khumairoh S2\FKF 12.30.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.719	117055	2151	0.575	0.274
2	2.570	64917	5370	0.319	0.685
3	2.739	44047	5938	0.216	0.757
4	2.916	271276	23088	1.332	2.944
5	3.259	661238	72544	3.247	9.252
6	3.378	850456	83221	4.176	10.613
7	3.655	690904	46439	3.393	5.922
8	3.925	197462	19344	0.970	2.467
9	4.132	199181	15156	0.978	1.933
10	4.569	328391	19090	1.612	2.434
11	5.093	211313	11654	1.038	1.486
12	5.869	285468	8392	1.402	1.070
13	6.189	266218	13626	1.307	1.738
14	6.362	117713	9130	0.578	1.164
15	6.844	259613	10764	1.275	1.373
16	7.303	231994	9951	1.139	1.269
17	7.953	1036581	46001	5.090	5.866
18	8.502	181271	9548	0.890	1.218
19	9.002	1138700	51673	5.591	6.590
20	9.708	491703	20039	2.414	2.556
21	10.189	1211396	52178	5.948	6.654
22	10.792	1027849	37705	5.047	4.808
23	11.629	281241	8502	1.381	1.084
24	12.206	296928	8721	1.458	1.112
25	12.721	231927	7380	1.139	0.941
26	13.559	542028	11543	2.661	1.472
27	15.273	600474	8329	2.948	1.062

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	16.366	1107198	30029	5.437	3.830
29	17.877	297670	5468	1.462	0.697
30	18.094	168285	5478	0.826	0.699
31	19.270	240459	5152	1.181	0.657
32	20.076	411451	8160	2.020	1.041
33	20.542	273394	7378	1.342	0.941
34	22.167	2973985	45473	14.603	5.799
35	25.162	3012970	58731	14.794	7.490
36	27.156	14492	339	0.071	0.043
37	28.689	28365	452	0.139	0.058
Total		20365612	784137	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

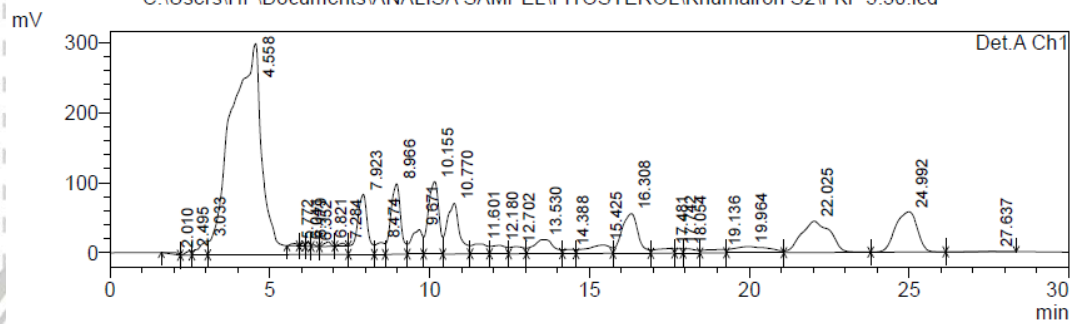
- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

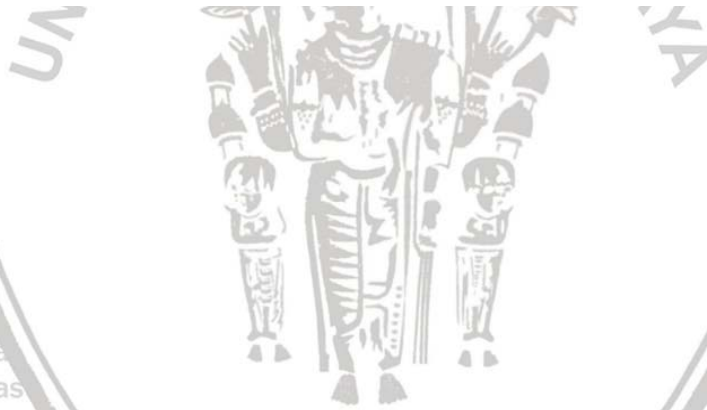
Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	3012970	1858558	16,2113	162113,31
Stigmasterol	20	2	411451	508773	8,0871	80871,23
Kampesterol	20	2	2973985	1438651	20,6720	206720,39

15. Kromatografi FKF 9 (8:1, 72 jam)

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\FITOSTEROL\Khumairoh S2\FKF 5.30.lcd



1 Det.A Ch1/206nm



PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.010	48669	2568	0.112	0.247
2	2.495	75551	6683	0.173	0.644
3	3.033	363452	19535	0.834	1.882
4	4.558	21430716	301534	49.180	29.056
5	5.772	48448	3407	0.111	0.328
6	6.041	37891	4792	0.087	0.462
7	6.179	52040	6058	0.119	0.584
8	6.352	22329	3098	0.051	0.299
9	6.821	89860	6612	0.206	0.637
10	7.284	53003	4051	0.122	0.390
11	7.923	1934549	85934	4.439	8.281
12	8.474	315276	16639	0.724	1.603
13	8.966	2168231	100781	4.976	9.711
14	9.671	832393	34927	1.910	3.366
15	10.155	2369758	103715	5.438	9.994
16	10.770	1955644	72406	4.488	6.977
17	11.601	471879	14138	1.083	1.362
18	12.180	391857	12142	0.899	1.170
19	12.702	305271	10030	0.701	0.966
20	13.530	869317	19866	1.995	1.914
21	14.388	142982	5758	0.328	0.555
22	15.425	604212	11938	1.387	1.150
23	16.308	1979007	56606	4.541	5.455
24	17.481	254014	6253	0.583	0.603
25	17.742	95234	6042	0.219	0.582
26	18.054	159399	5891	0.366	0.568
27	19.136	227586	5045	0.522	0.486
28	19.964	693762	8754	1.592	0.844
29	22.025	2814262	44660	6.458	4.303

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
30	24.992	2741122	57531	6.290	5.544
31	27.637	28539	378	0.065	0.036
Total		43576253	1037771	100.000	100.000

Keterangan:

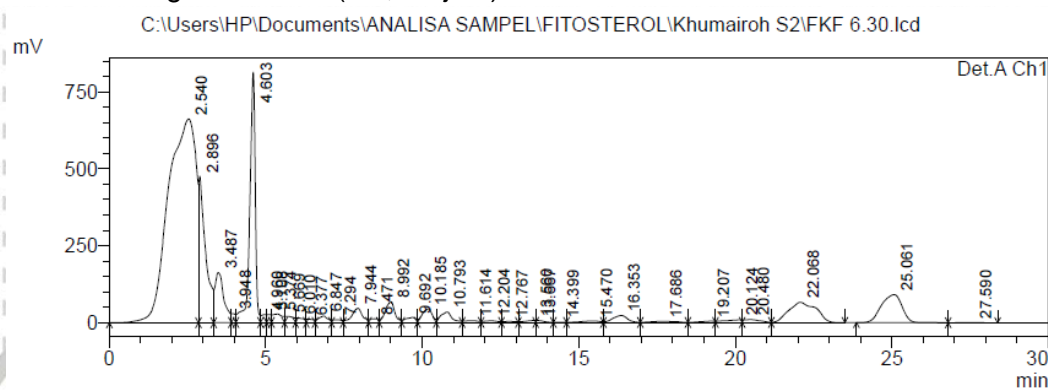
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2741122	1858558	14,7486	147486,49
Stigmasterol	20	2	693762	508773	13,6360	136359,83
Kampesterol	20	2	2814262	1438651	19,5618	195618,12

16. Kromatografi FKF 10 (8:1, 72 jam)



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.540	40344530	661636	50.751	23.931
2	2.896	7186629	475838	9.040	17.211
3	3.487	3251272	162631	4.090	5.882
4	3.948	239918	29494	0.302	1.067
5	4.603	9810295	813529	12.341	29.425
6	4.960	285616	25650	0.359	0.928
7	5.108	242047	25915	0.304	0.937
8	5.374	611841	28045	0.770	1.014
9	5.669	385365	20245	0.485	0.732
10	6.010	274503	15474	0.345	0.560
11	6.377	174138	11051	0.219	0.400
12	6.847	454445	21535	0.572	0.779
13	7.294	191733	9507	0.241	0.344
14	7.944	1106680	46542	1.392	1.683
15	8.471	239515	12124	0.301	0.439
16	8.992	1442499	67987	1.815	2.459
17	9.692	393927	16664	0.496	0.603
18	10.185	986462	44747	1.241	1.618
19	10.793	867300	34699	1.091	1.255
20	11.614	180009	5652	0.226	0.204
21	12.204	168801	5541	0.212	0.200
22	12.767	101027	3501	0.127	0.127
23	13.560	162754	6997	0.205	0.253
24	13.667	125258	6979	0.158	0.252
25	14.399	28852	1229	0.036	0.044
26	15.470	219514	4920	0.276	0.178
27	16.353	754712	23053	0.949	0.834

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	17.686	229903	3678	0.289	0.133
29	19.207	146064	4246	0.184	0.154
30	20.124	340731	8554	0.429	0.309
31	20.480	351538	9606	0.442	0.347
32	22.068	3998258	65646	5.030	2.374
33	25.061	4158758	90997	5.231	3.291
34	27.590	40634	835	0.051	0.030
Total		79495531	2764748	100.000	100.000

Keterangan:

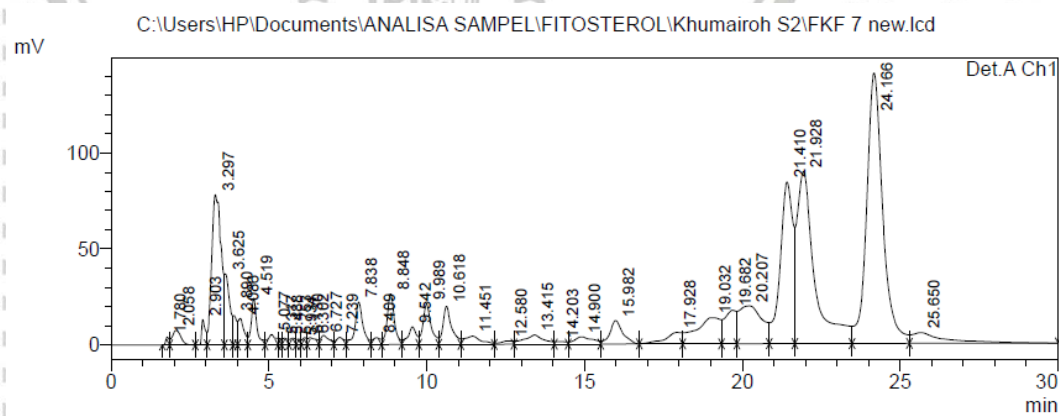
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	4158758	1858558	22,3763	223762,62
Stigmasterol	20	2	351538	508773	6,9095	69095,25
Kampesterol	20	2	3998258	1438651	27,7917	277917,16

17. Kromatografi FKF 11 (8:1, 72 jam)



PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.780	29955	4172	0.151	0.567
2	2.058	144972	7651	0.731	1.040
3	2.903	107947	13278	0.544	1.804
4	3.297	1652888	78311	8.332	10.642
5	3.625	425926	36977	2.147	5.025
6	3.890	117931	15261	0.594	2.074
7	4.086	181830	13809	0.917	1.877
8	4.519	302026	24271	1.522	3.298
9	5.077	91996	5354	0.464	0.728
10	5.317	22589	3372	0.114	0.458
11	5.488	41822	3412	0.211	0.464
12	5.753	43067	3475	0.217	0.472
13	5.934	25785	2898	0.130	0.394
14	6.130	36729	3651	0.185	0.496
15	6.302	66940	3627	0.337	0.493
16	6.727	91315	4830	0.460	0.656
17	7.239	65550	3804	0.330	0.517
18	7.838	387843	22178	1.955	3.014
19	8.409	61264	3553	0.309	0.483
20	8.848	419988	26417	2.117	3.590
21	9.542	169583	9145	0.855	1.243
22	9.989	382640	21122	1.929	2.870
23	10.618	380119	19892	1.916	2.703
24	11.451	155485	4289	0.784	0.583
25	12.580	47876	1779	0.241	0.242

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
26	13.415	204500	4782	1.031	0.650
27	14.203	32640	1309	0.165	0.178
28	14.900	152094	3821	0.767	0.519
29	15.982	344720	12176	1.738	1.655
30	17.928	220370	6021	1.111	0.818
31	19.032	725421	13667	3.657	1.857
32	19.682	453082	17451	2.284	2.371
33	20.207	1003585	19693	5.059	2.676
34	21.410	2340330	84197	11.797	11.442
35	21.928	3486959	89693	17.577	12.189
36	24.166	4995951	140941	25.183	19.153
37	25.650	424614	5577	2.140	0.758
Total		19838333	735858	100.000	100.000

Keterangan:

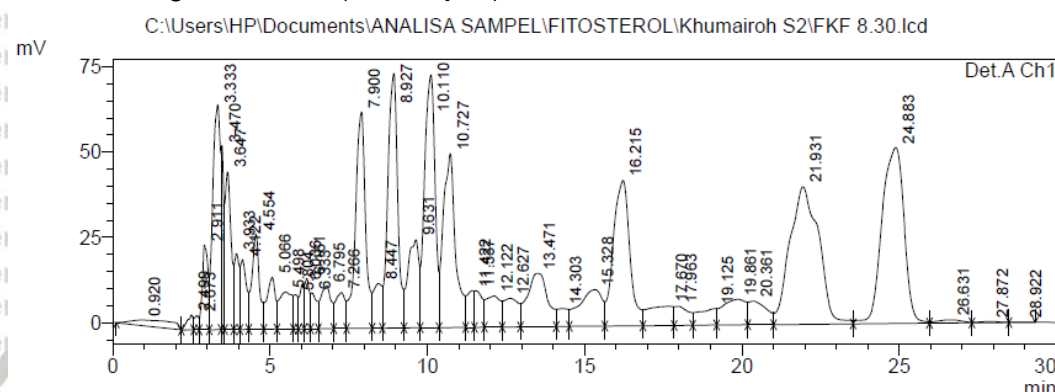
Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	4995951	1858558	26,8808	268807,91
Stigmasterol	20	2	725421	508773	14,2582	142582,45
Kampesterol	20	2	3486959	1438651	24,2377	242376,99

18. Kromatografi FKF 12 (8:1, 72 jam)



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.920	172059	1569	0.764	0.173
2	2.499	58227	4414	0.258	0.486
3	2.673	37636	4179	0.167	0.460
4	2.911	311521	24809	1.383	2.732
5	3.333	1078191	65871	4.787	7.253
6	3.470	323894	54031	1.438	5.949
7	3.647	593369	46209	2.634	5.088
8	3.933	234257	22221	1.040	2.447
9	4.122	277371	20478	1.231	2.255
10	4.554	466341	27809	2.070	3.062
11	5.066	283361	15164	1.258	1.670
12	5.498	308779	10905	1.371	1.201
13	5.804	97507	9993	0.433	1.100
14	6.036	123273	13167	0.547	1.450
15	6.161	160595	14744	0.713	1.623
16	6.333	133335	10468	0.592	1.153
17	6.795	294882	12638	1.309	1.391
18	7.266	225477	10568	1.001	1.164
19	7.900	1417554	63414	6.293	6.982
20	8.447	238062	13094	1.057	1.442
21	8.927	1624581	74582	7.212	8.212
22	9.631	629889	25850	2.796	2.846
23	10.110	1702567	74102	7.558	8.159
24	10.727	1385170	50958	6.149	5.611
25	11.422	173807	10715	0.772	1.180
26	11.537	181429	10661	0.805	1.174
27	12.122	284541	9134	1.263	1.006

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
28	12.627	272663	8413	1.210	0.926
29	13.471	703075	15585	3.121	1.716
30	14.303	131634	5262	0.584	0.579
31	15.328	542190	10732	2.407	1.182
32	16.215	1556354	42699	6.909	4.701
33	17.670	317610	5662	1.410	0.623
34	17.963	169802	5612	0.754	0.618
35	19.125	192336	4831	0.854	0.532
36	19.861	390253	7497	1.732	0.825
37	20.361	272190	6917	1.208	0.762
38	21.931	2578432	40330	11.447	4.441
39	24.883	2512934	51592	11.156	5.681
40	26.631	48902	885	0.217	0.097
41	27.872	16401	354	0.073	0.039
42	28.922	3133	102	0.014	0.011
Total		22525583	908214	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

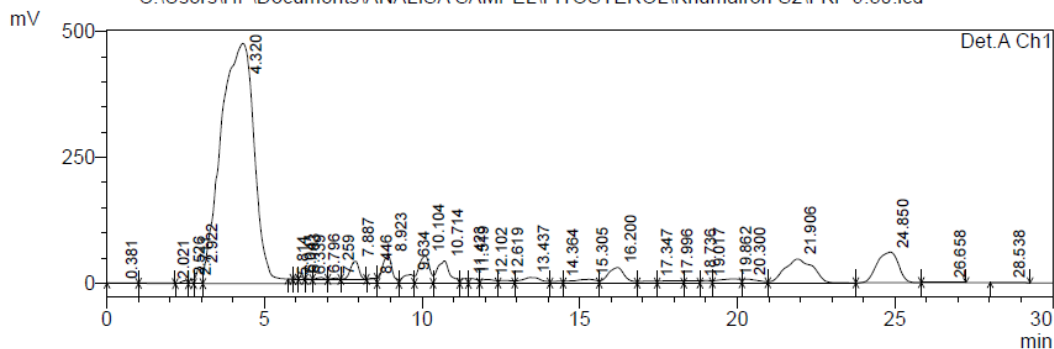
$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar}} \times 100\%$$

$$\text{Berat Sampel Injeksi}$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2512934	1858558	13,5209	135208,80
Stigmasterol	20	2	1556354	508773	30,5903	305903,42
Kampesterol	20	2	2578432	1438651	17,9226	179225,68

19. Kromatografi FKF 13 (8:1, 72 jam)

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\FITOSTEROL\Khumairoh S2\FKF 9.30.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.381	29808	610	0.058	0.062
2	2.021	74245	1713	0.143	0.175
3	2.526	92849	7061	0.179	0.720
4	2.711	77398	8793	0.149	0.896
5	2.922	425212	32875	0.821	3.352
6	4.320	36297801	476899	70.097	48.619
7	5.814	1469	281	0.003	0.029
8	6.041	24302	3701	0.047	0.377
9	6.163	45490	5291	0.088	0.539
10	6.339	12264	1765	0.024	0.180
11	6.796	49284	3585	0.095	0.365
12	7.259	33114	2505	0.064	0.255
13	7.887	665340	35846	1.285	3.655
14	8.446	15810	1337	0.031	0.136
15	8.923	1190229	54917	2.299	5.599
16	9.634	420353	17813	0.812	1.816
17	10.104	1262496	54703	2.438	5.577
18	10.714	1219128	44534	2.354	4.540
19	11.423	146272	9394	0.282	0.958
20	11.519	176573	9385	0.341	0.957
21	12.102	228658	7283	0.442	0.742
22	12.619	166219	5680	0.321	0.579
23	13.437	490988	11204	0.948	1.142
24	14.364	88302	3671	0.171	0.374
25	15.305	388079	7307	0.749	0.745
26	16.200	1113893	31006	2.151	3.161
27	17.347	131021	3649	0.253	0.372
28	17.996	209767	4636	0.405	0.473

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
29	18.736	134027	4758	0.259	0.485
30	19.017	112526	4911	0.217	0.501
31	19.862	375936	7719	0.726	0.787
32	20.300	253319	7222	0.489	0.736
33	21.906	2933248	47392	5.665	4.832
34	24.850	2863042	60691	5.529	6.187
35	26.658	18775	397	0.036	0.040
36	28.538	14841	350	0.029	0.036
Total		51782079	980885	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
= 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

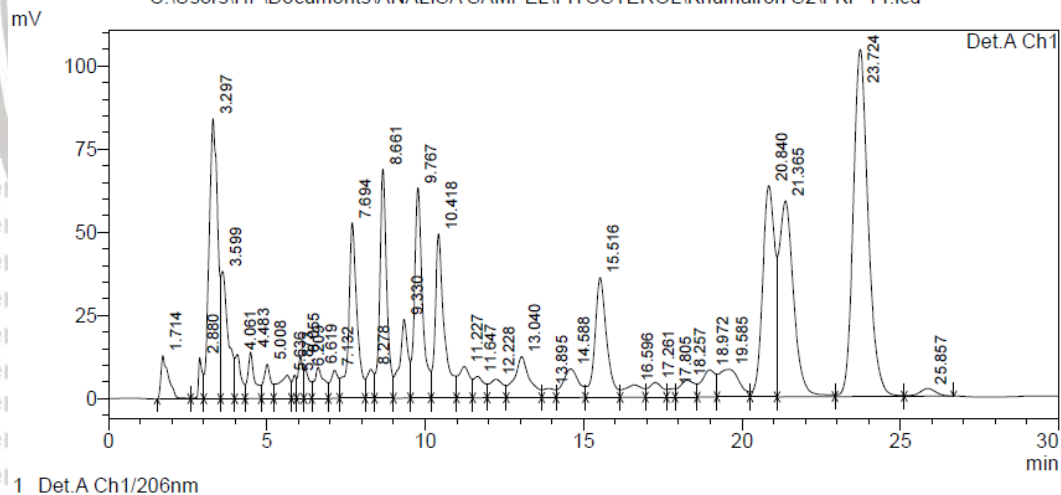
$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar}} \times 100\%$$

Berat Sampel Injeksi

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	2863042	1858558	15,4046	154046,42
Stigmasterol	20	2	375936	508773	7,3891	73890,71
Kampesterol	20	2	2933248	1438651	20,3889	203888,78

20. Kromatografi FKF Kondisi Optimum (7,80:1, 70,82 jam)

C:\Users\HP\Documents\ANALISA SAMPEL\FITOSTEROL\Khumairoh S2\FKF 14.lcd



1 Det.A Ch1/206nm

PeakTable

Detector A Ch1 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.714	218955	13123	1.155	1.549
2	2.880	104711	12367	0.553	1.460
3	3.297	1601548	84206	8.451	9.938
4	3.599	620155	38280	3.272	4.518
5	4.061	174127	13331	0.919	1.573
6	4.483	215513	13961	1.137	1.648
7	5.008	157540	10312	0.831	1.217
8	5.636	182720	6968	0.964	0.822
9	5.873	62308	7039	0.329	0.831
10	6.055	130053	12558	0.686	1.482
11	6.209	101121	8594	0.534	1.014
12	6.619	198139	9283	1.046	1.096
13	7.132	141812	8383	0.748	0.989
14	7.694	961879	52798	5.076	6.231
15	8.278	135893	8702	0.717	1.027
16	8.661	1053502	68890	5.559	8.130
17	9.330	437646	23677	2.309	2.794
18	9.767	1094013	63207	5.773	7.460
19	10.418	959990	49314	5.066	5.820
20	11.227	234737	9433	1.239	1.113
21	11.647	146016	6423	0.770	0.758
22	12.228	169282	5600	0.893	0.661

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
23	13.040	412941	12332	2.179	1.455
24	13.895	68429	2732	0.361	0.322
25	14.588	297933	8567	1.572	1.011
26	15.516	924701	36066	4.879	4.257
27	16.596	144249	3709	0.761	0.438
28	17.261	133141	4434	0.703	0.523
29	17.805	39016	2513	0.206	0.297
30	18.257	170133	5085	0.898	0.600
31	18.972	243056	8168	1.283	0.964
32	19.585	360455	8225	1.902	0.971
33	20.840	1694753	63465	8.943	7.490
34	21.365	1868512	58914	9.860	6.953
35	23.724	3409632	104305	17.992	12.310
36	25.857	82344	2346	0.435	0.277
Total		18950956	847308	100.000	100.000

Keterangan:

Warna biru=β-Sitosterol; jingga=stigmasterol; hijau=kampesterol

- Berat sampel = 3 mg dalam 3 ml = 1 mg/ml = 1 µg/µl
- Berat sampel injeksi = 20 µl x 1 = 20 µg
- Volume standar injeksi = 100 mg/l = 0,1 mg/ml = 0,1 µg/µl
- Berat standar = 20 µl x 0,1 = 2 µl
- Berat standar = 2 µg

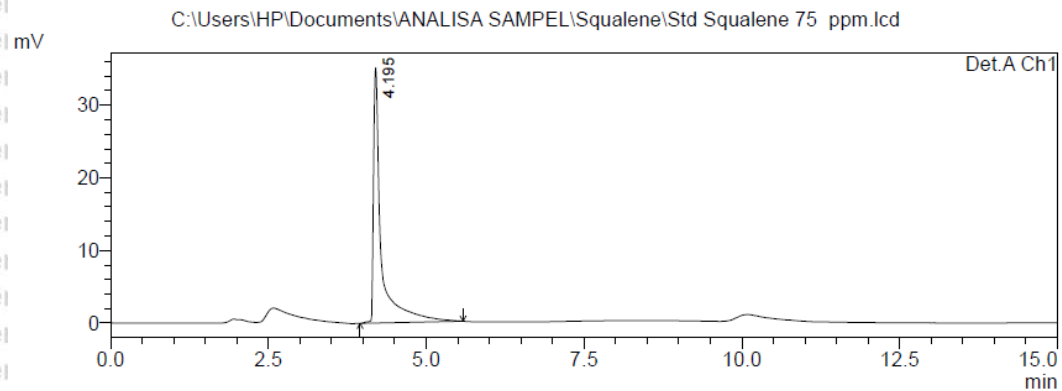
$$\text{Konsentrasi Sampel (\%)} = \frac{\text{Berat Standar} \times \text{Luas Area Sampel}}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Berat Sampel Injeksi}} \times 100\%$$

Senyawa	Berat Sampel Injeksi (µg)	Berat Standar (µg)	LA Sampel	LA Standar	Konsentrasi Sampel (%)	ppm
β-Sitosterol	20	2	3409632	1858558	18,3456	183455,77
Stigmasterol	20	2	1694753	508773	6,0556	60555,69
Kampesterol	20	2	1868512	1438651	12,9879	129879,45



Lampiran 5. Hasil Analisa Komponen Skualen

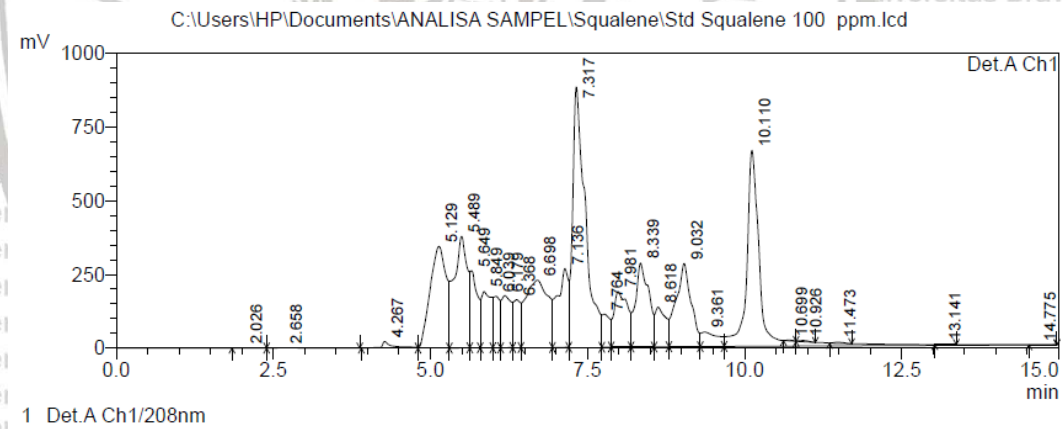
1. Kromatografi Standar Skualen 75 ppm



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.195	298036	35163	100.000	100.000
Total		298036	35163	100.000	100.000

2. Kromatografi Standar Skualen 100 ppm

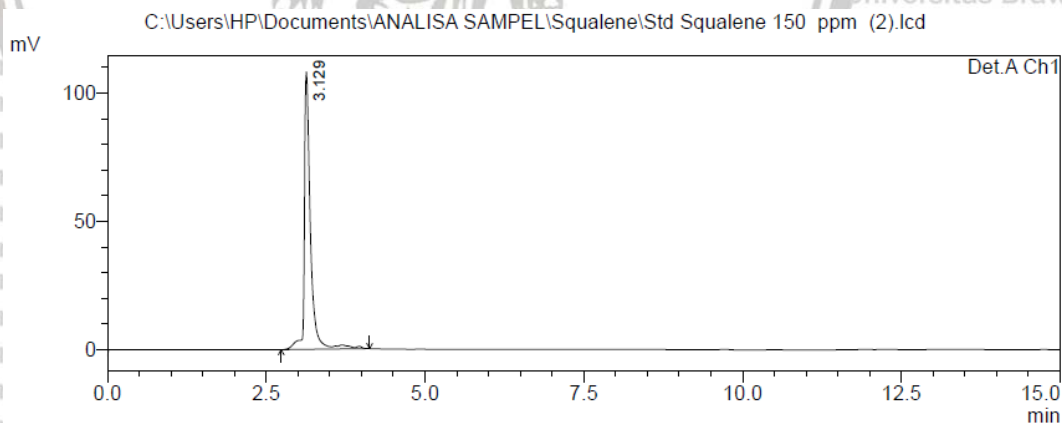


PeakTable

Detector A Ch1 208nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.026	7399	555	0.011	0.012
2	2.658	66241	1784	0.098	0.037
3	4.267	298205	22966	0.440	0.476
4	5.129	6165000	345403	9.104	7.161
5	5.489	5583138	378810	8.245	7.853
6	5.649	2122303	261591	3.134	5.423
7	5.849	2126586	190834	3.140	3.956
8	6.039	1269630	174197	1.875	3.611
9	6.179	1908701	177032	2.819	3.670
10	6.368	1263144	162752	1.865	3.374
11	6.698	5759436	228705	8.505	4.741
12	7.136	3179614	267641	4.695	5.549
13	7.317	12476708	883847	18.424	18.324
14	7.764	942595	112250	1.392	2.327
15	7.981	2845002	188305	4.201	3.904
16	8.339	4200542	284631	6.203	5.901
17	8.618	1590611	134940	2.349	2.798
18	9.032	4724009	282401	6.976	5.855
19	9.361	927156	49132	1.369	1.019
20	10.110	10162274	665254	15.007	13.792
21	10.699	18838	2622	0.028	0.054
22	10.926	36553	3431	0.054	0.071
23	11.473	41417	4132	0.061	0.086
24	13.141	1961	202	0.003	0.004
25	14.775	1414	124	0.002	0.003
Total		67718478	4823541	100.000	100.000

3. Kromatografi Standar Squalen 125 ppm

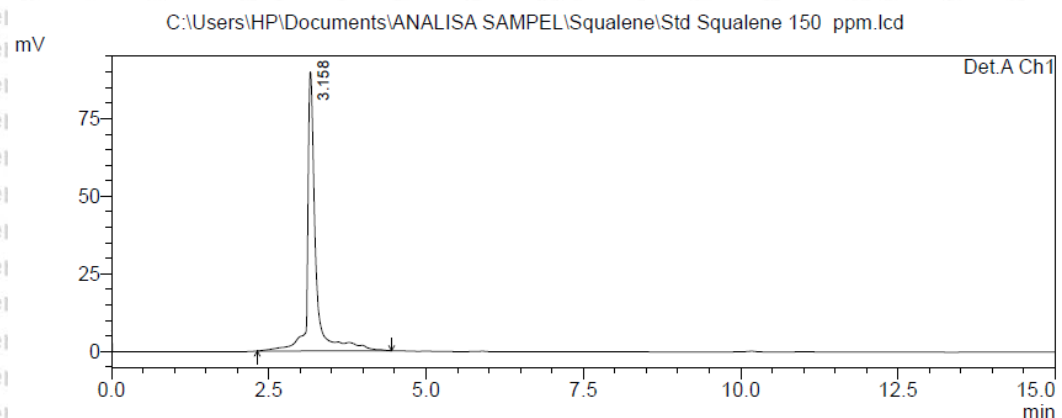


PeakTable

Detector A Ch1 208nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.129	718767	108120	100.000	100.000
Total		718767	108120	100.000	100.000

4. Kromatografi Standar Skualen 150 ppm



1 Det.A Ch1/208nm

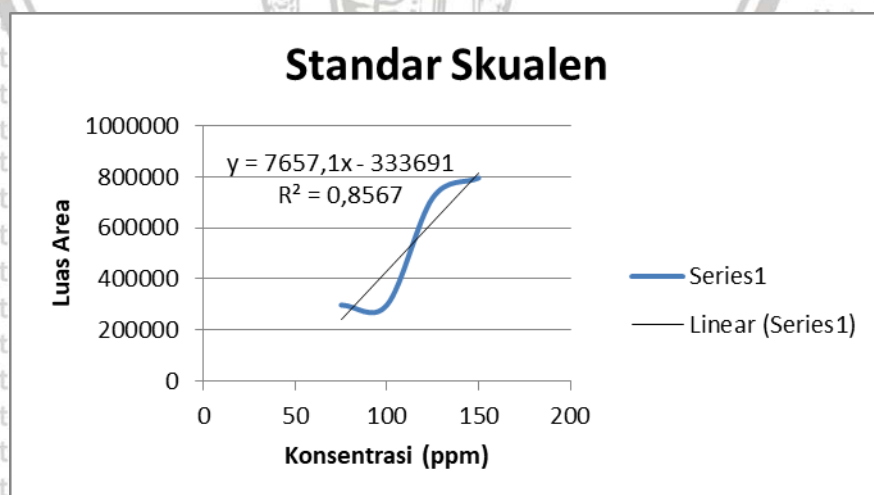
PeakTable

Detector A Ch1 208nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.158	795944	89823	100.000	100.000
Total		795944	89823	100.000	100.000

5. Kurva Standar Skualen

Konsentrasi (ppm)	Luas Area	Waktu Retensi
75	298036	4,195
100	298205	4,267
125	718767	3,129
150	795944	3,158

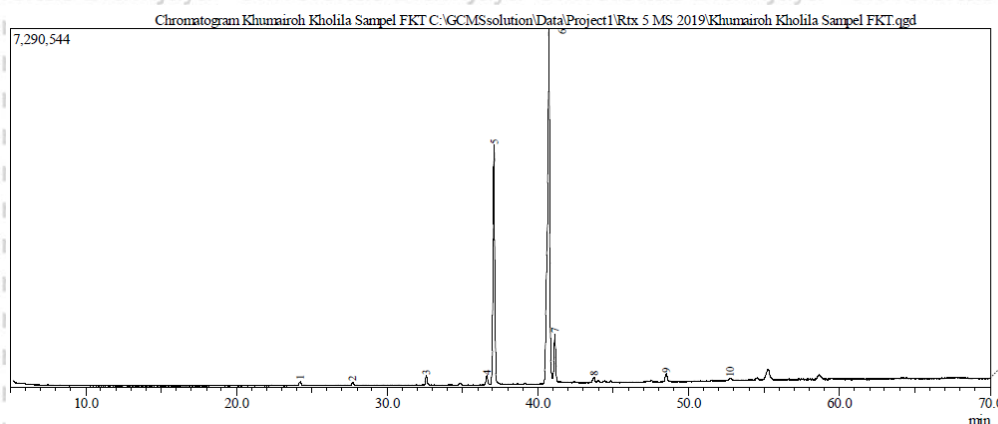


Sampel	Waktu Retensi	Luas Area	% Skualen	Skualen (ppm)
DALMS	3,884	298036	44927	0,0049
FTT	3,175	298205	652944	0,0129
FKT	3,173	718767	370235	0,0092
FKF Optimum	3,168	795944	567559	0,0118



Lampiran 6. Hasil Analisa Jenis Asam Lemak

1. Sampel FKT

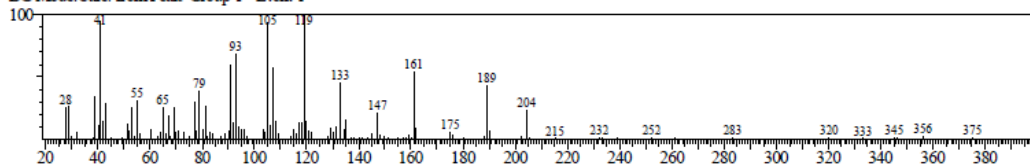


Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height
1	24.227	24.117	24.375	498556	0.39	69077
2	27.688	27.642	27.800	359083	0.28	60819
3	32.582	32.450	32.733	1387323	1.08	187345
4	36.620	36.417	36.775	1427955	1.11	175520
5	37.098	36.858	37.358	36525027	28.34	4861879
6	40.726	40.383	40.983	78977812	61.27	7191938
7	41.124	40.983	41.275	7254281	5.63	957112
8	43.701	43.592	43.808	661502	0.51	89511
9	48.501	48.375	48.717	1424707	1.11	161175
10	52.745	52.583	52.900	379209	0.29	36197
				128895455	100.00	13790573

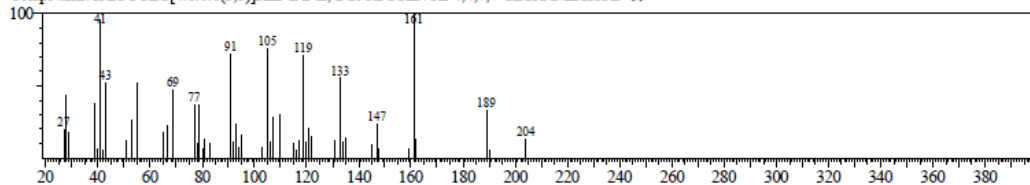
Library

<< Target >>

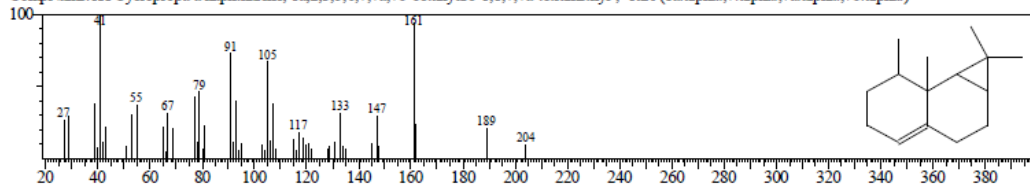
Line# 1 R. Time: 24.225 (Scan#: 2284) Mass Peaks: 110
 Raw Mode: Averaged 24.217-24.233 (2283-2285) Base Peak: 119.10 (4708)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



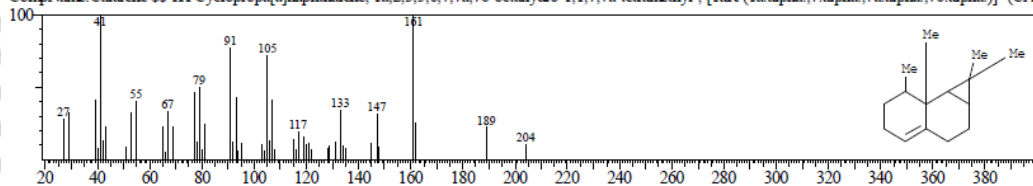
Hit# 1 Entry: 71071 Library: WILEY229.LIB
 SI-86 Formula: C15H24 CAS: 0-00-0 MolWeight: 204 RetIndex: 0
 CompName: TRICYCLO[4.1.0.0(3,5)]HEPTANE, 2-ISOBUTENYL-4,4,7,7-TETRAMETHYL- 5\$



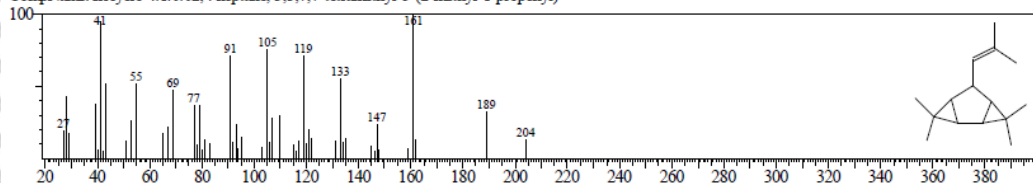
Hit# 2 Entry: 7643 Library: NIST12.LIB
 SI-86 Formula: C15H24 CAS: 17334-55-3 MolWeight: 204 RetIndex: 0
 CompName: 1H-Cyclopropanaphthalene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, 1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.alpha.,7b.alpha.)-



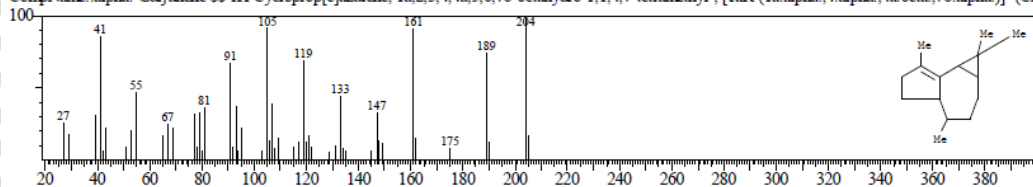
Hit# 3 Entry: 71054 Library: WILEY229.LIB
 SI: 86 Formula: C15 H24 CAS: 17334-55-3 MolWeight: 204 RetIndex: 0
 CompName: Calarene $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ 1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.alpha.,7b.alpha.)]- (CAS)



Hit# 4 Entry: 23907 Library: NIST62.LIB
 SI: 86 Formula: C15H24 CAS: 56348-21-1 MolWeight: 204 RetIndex: 0
 CompName: Tricyclo 4.1.0.02,4 heptane, 3,3,7,7-tetramethyl-5-(2-methyl-1-propenyl)-

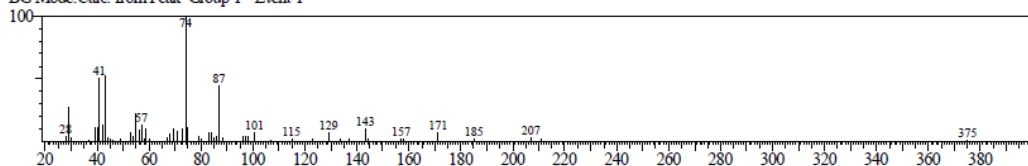


Hit# 5 Entry: 71030 Library: WILEY229.LIB
 SI: 86 Formula: C15 H24 CAS: 489-40-7 MolWeight: 204 RetIndex: 0
 CompName: alpha-Gujunene $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ 1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7b.alpha.)]- (CAS)

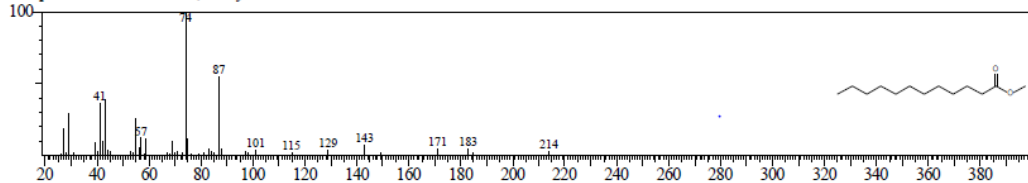


<< Target >>

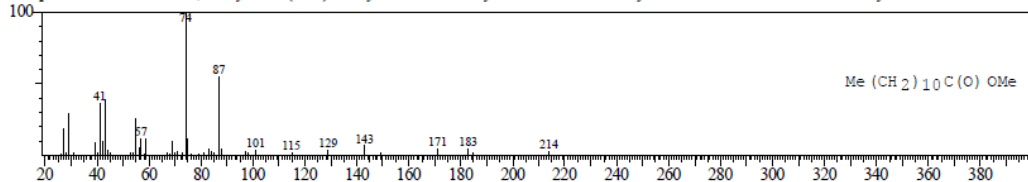
Line#: 2 R. Time: 27.683 (Scan#: 2699) MassPeaks: 56
 RawMode: Averaged 27.675-27.692 (2698-2700) BasePeak: 74.05 (7700)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



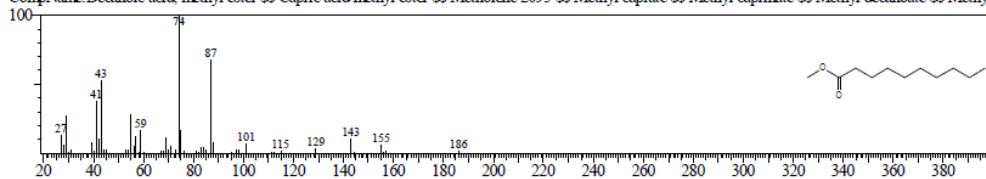
Hit# 1 Entry: 8113 Library: NIST12.LIB
 SI: 89 Formula: C13H26O2 CAS: 111-82-0 MolWeight: 214 RetIndex: 0
 CompName: Dodecanoic acid, methyl ester



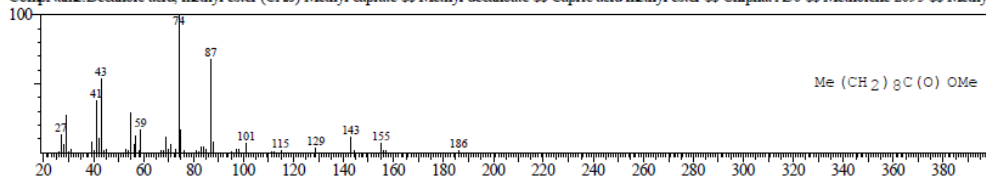
Hit# 2 Entry: 79503 Library: WILEY229.LIB
 SI: 89 Formula: C13H26O2 CAS: 111-82-0 MolWeight: 214 RetIndex: 0
 CompName: Dodecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl laurate $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$ Methyl dodecanoate Methyl n-dodecanoate Lauric acid methyl ester Metholene 2296 Methyl



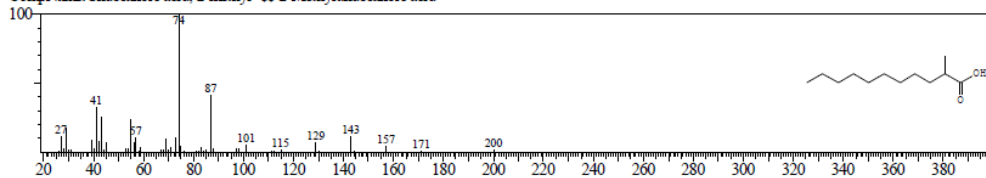
Hit# 3 Entry:19451 Library:NIST62.LIB
 SI:89 Formula:C11H22O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName:Decanoic acid, methyl ester \$S\$ Capric acid methyl ester \$S\$ Metholene 2095 \$S\$ Methyl caprate \$S\$ Methyl caprinatate \$S\$ Methyl decanoate \$S\$ Methyl-n-caprate



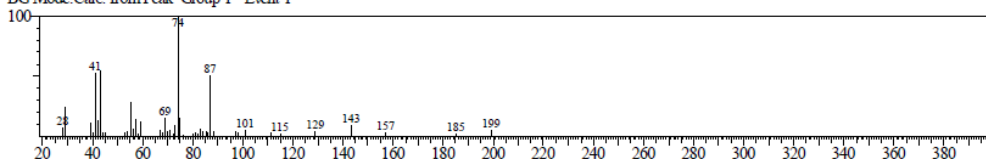
Hit# 4 Entry:55938 Library:WILEY229.LIB
 SI:89 Formula:C11 H22 O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName:Decanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl caprate \$S\$ Methyl decanoate \$S\$ Capric acid methyl ester \$S\$ Uniphat A30 \$S\$ Metholene 2095 \$S\$ Methyl caprinatate



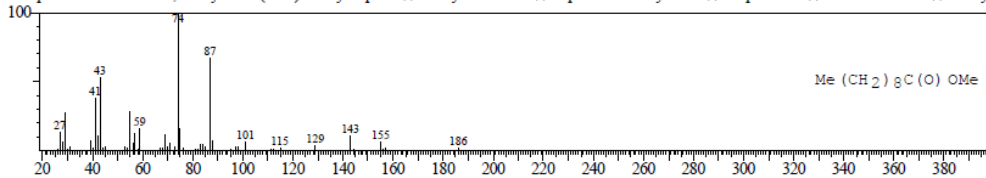
Hit# 5 Entry:22950 Library:NIST62.LIB
 SI:88 Formula:C12H24O2 CAS:24323-25-9 MolWeight:200 RetIndex:0
 CompName:Undecanoic acid, 2-methyl- \$S\$ 2-Methylundecanoic acid



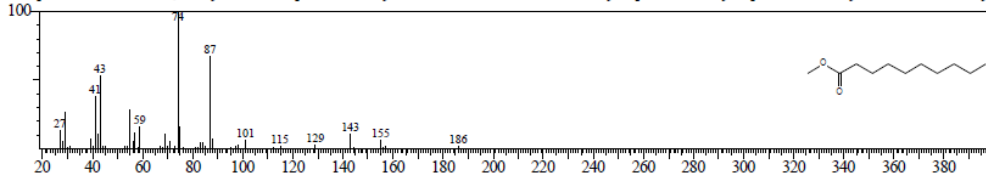
<< Target >>
 Line# 3 R Time: 32.583(Scan#: 3287) MassPeaks: 45
 RawMode: Averaged 32.575-32.592(3286-3288) BasePeak: 74.00(35016)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



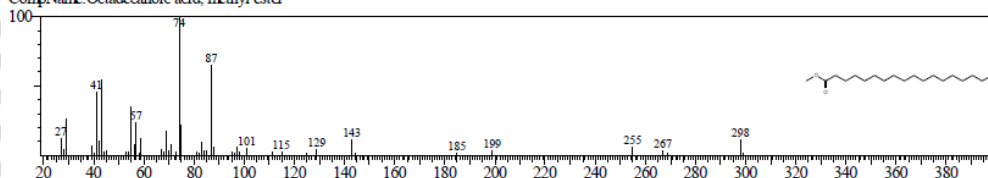
Hit# 1 Entry:55938 Library:WILEY229.LIB
 SI:93 Formula:C11 H22 O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName:Decanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl caprate \$S\$ Methyl decanoate \$S\$ Capric acid methyl ester \$S\$ Uniphat A30 \$S\$ Metholene 2095 \$S\$ Methyl caprinatate



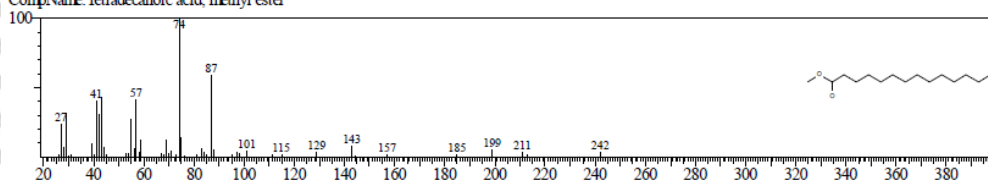
Hit# 2 Entry:19451 Library:NIST62.LIB
 SI:93 Formula:C11H22O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName:Decanoic acid, methyl ester \$S\$ Capric acid methyl ester \$S\$ Metholene 2095 \$S\$ Methyl caprate \$S\$ Methyl caprinatate \$S\$ Methyl decanoate \$S\$ Methyl-n-caprate



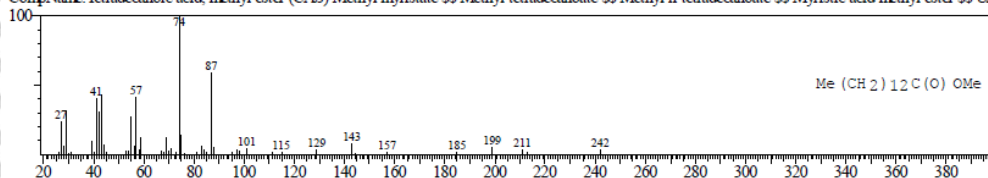
Hit# 3 Entry:10479 Library:NIST12.LIB
 SI:93 Formula:C19H38O2 CAS:112-61-8 MolWeight:298 RetIndex:0
 CompName:Octadecanoic acid, methyl ester



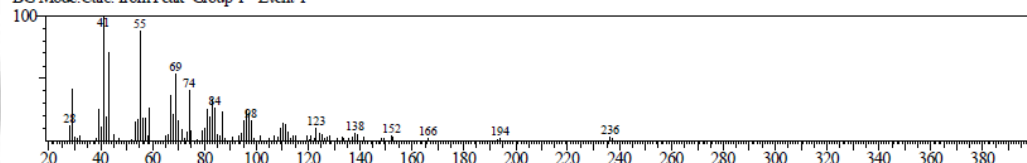
Hit# 4 Entry:9005 Library:NIST12.LIB
 SI:92 Formula:C15H30O2 CAS:124-10-7 MolWeight:242 RetIndex:0
 CompName:Tetradecanoic acid, methyl ester



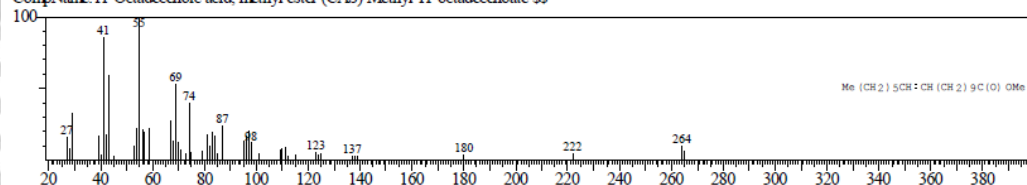
Hit# 5 Entry:103148 Library:WILEY229.LIB
 SI:92 Formula:C15H30O2 CAS:124-10-7 MolWeight:242 RetIndex:0
 CompName:Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl myristate \$\$ Methyl tetradecanoate \$\$ Methyl n-tetradecanoate \$\$ Myristic acid methyl ester \$\$ Uniphat A50



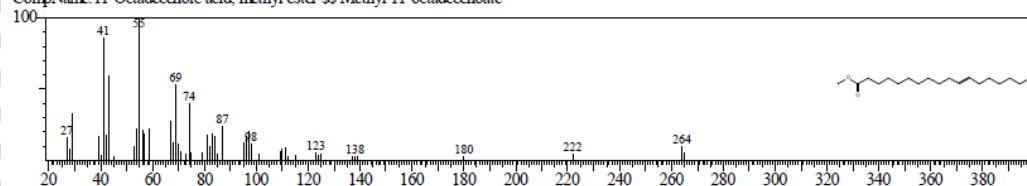
<< Target >>
 Line# 4 R_Time:36.617(Scan#:3771) MassPeaks:90
 RawMode:Averaged 36.608-36.625(3770-3772) BasePeak:41.05(15690)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



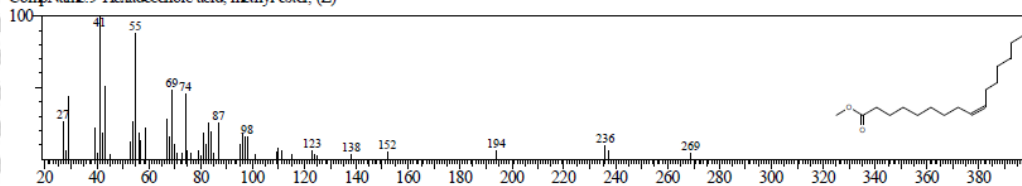
Hit# 1 Entry:142908 Library:WILEY229.LIB
 SI:91 Formula:C19H36O2 CAS:52380-33-3 MolWeight:296 RetIndex:0
 CompName:11-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) Methyl 11-octadecenoate \$\$



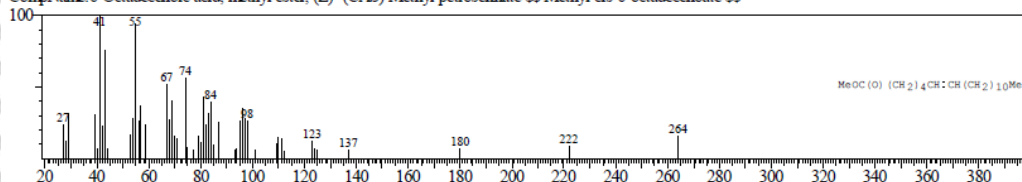
Hit# 2 Entry:42139 Library:NIST62.LIB
 SI:91 Formula:C19H36O2 CAS:52380-33-3 MolWeight:296 RetIndex:0
 CompName:11-Octadecenoic acid, methyl ester \$\$ Methyl 11-octadecenoate



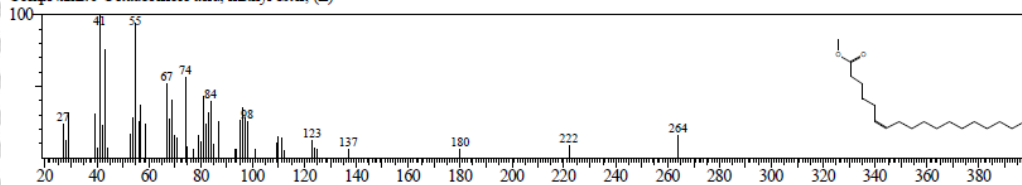
Hit#:3 Entry:9701 Library:NIST12.LIB
 SI:91 Formula:C17H32O2 CAS:1120-25-8 MolWeight:268 RetIndex:0
 CompName:9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-



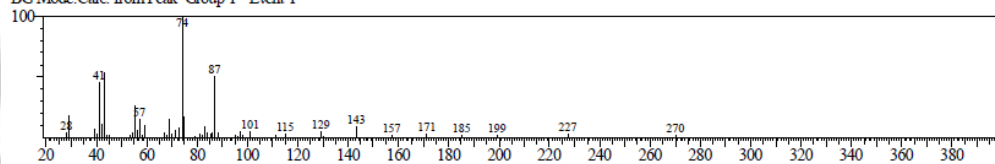
Hit#:4 Entry:142878 Library:WILEY229.LIB
 SI:90 Formula:C19H36O2 CAS:2777-58-4 MolWeight:296 RetIndex:0
 CompName:6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) Methyl petroselinate \$\$ Methyl cis-6-octadecenoate \$\$



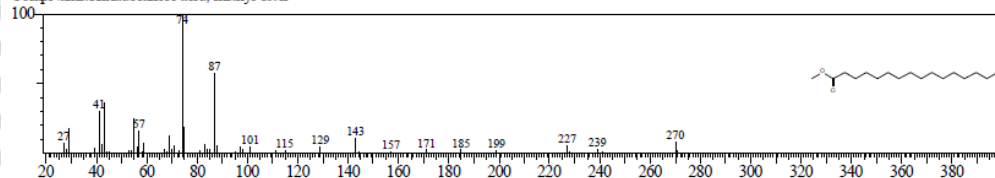
Hit#:5 Entry:10432 Library:NIST12.LIB
 SI:90 Formula:C19H36O2 CAS:2777-58-4 MolWeight:296 RetIndex:0
 CompName:6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-



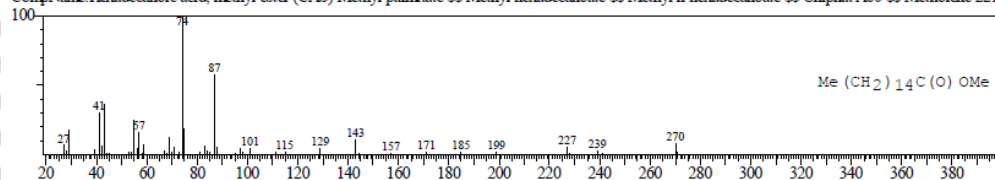
<< Target >>
 Line#:5 R.Time:37.100(Scan#:3829) MassPeaks:49
 RawMode:Averaged 37.092-37.108(3828-3830) BasePeak:74.05(951154)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



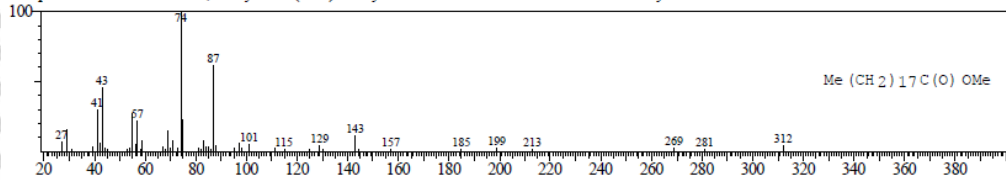
Hit#:1 Entry:9769 Library:NIST12.LIB
 SI:93 Formula:C17H34O2 CAS:112-39-0 MolWeight:270 RetIndex:0
 CompName:Hexadecanoic acid, methyl ester



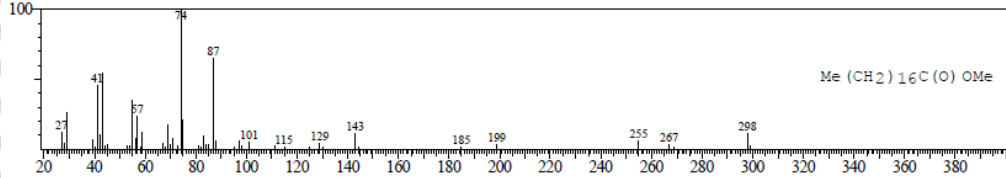
Hit#:2 Entry:124619 Library:WILEY229.LIB
 SI:93 Formula:C17H34O2 CAS:112-39-0 MolWeight:270 RetIndex:0
 CompName:Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl palmitate \$\$ Methyl hexadecanoate \$\$ Methyl n-hexadecanoate \$\$ Uniphac A60 \$\$ Metholene 2216 \$\$ Palmitic:



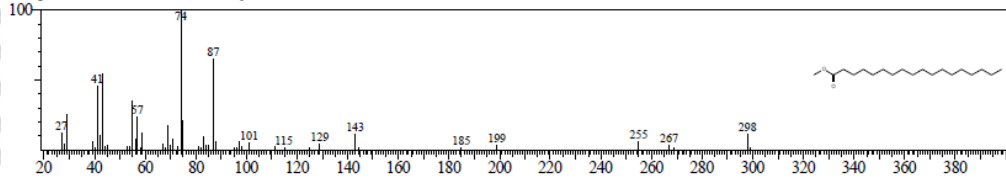
Hit# 3 Entry: 153311 Library: WILEY229.LIB
 SI: 93 Formula: C₂₀H₄₀O₂ CAS: 1731-94-8 MolWeight: 312 RefIndex: 0
 CompName: Nonadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl nonadecanoate \$\$ Nonadecanoic acid methyl ester \$\$ METHYL N-NONADECANOATE \$\$



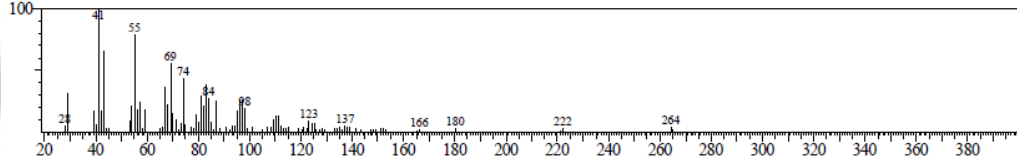
Hit# 4 Entry: 144206 Library: WILEY229.LIB
 SI: 92 Formula: C₁₉H₃₈O₂ CAS: 112-61-8 MolWeight: 298 RefIndex: 0
 CompName: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl stearate \$\$ Methyl octadecanoate \$\$ Methyl n-octadecanoate \$\$ Stearic acid methyl ester \$\$ Kenester 9718



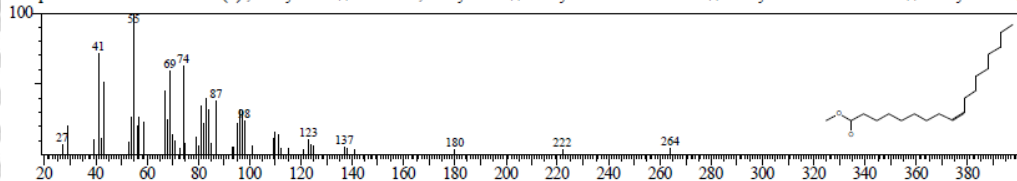
Hit# 5 Entry: 10479 Library: NIST12.LIB
 SI: 92 Formula: C₁₉H₃₈O₂ CAS: 112-61-8 MolWeight: 298 RefIndex: 0
 CompName: Octadecanoic acid, methyl ester



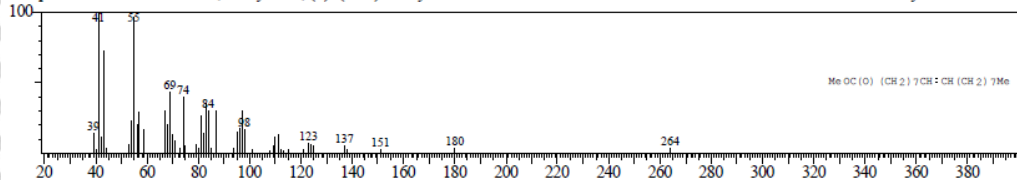
<< Target >>
 Line# 6 R. Time: 40.725(Scan#: 4264) MassPeaks: 92
 RawMode: Averaged 40.717-40.733(4263-4265) BasePeak: 41.05(651399)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



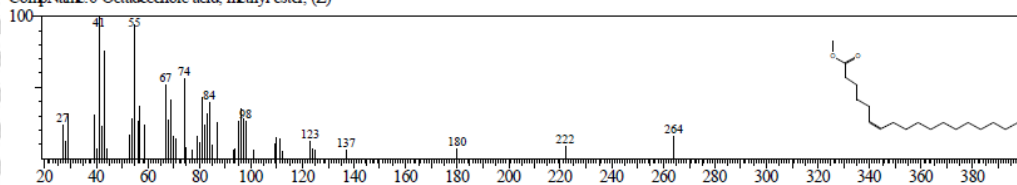
Hit# 1 Entry: 42154 Library: NIST62.LIB
 SI: 93 Formula: C₁₉H₃₆O₂ CAS: 112-62-9 MolWeight: 296 RefIndex: 0
 CompName: 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester \$\$ Oleic acid, methyl ester \$\$ Emery oleic acid ester 2301 \$\$ Methyl cis-9-octadecenoate \$\$ Methyl oleate \$\$ (Z)-



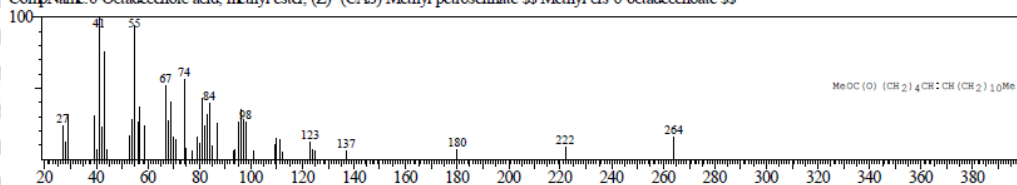
Hit# 2 Entry: 142902 Library: WILEY229.LIB
 SI: 92 Formula: C₁₉H₃₆O₂ CAS: 1937-62-8 MolWeight: 296 RefIndex: 0
 CompName: 9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)- (CAS) Methyl elaidate \$\$ METHYL-TRANS 9-OCTADECENOATE \$\$ Elaidic acid methyl ester \$\$ Elaidic acid,



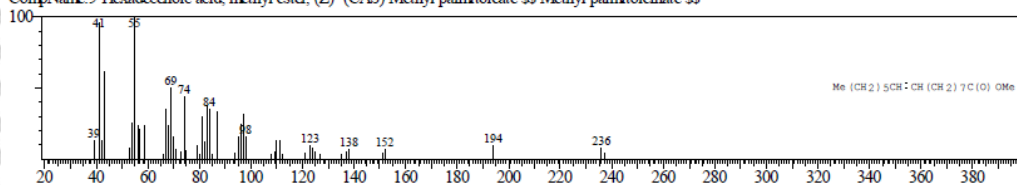
Hit#:3 Entry:10432 Library:NIST12.LIB
 SI:92 Formula:C19H36O2 CAS:2777-58-4 MolWeight:296 RetIndex:0
 CompName:6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-



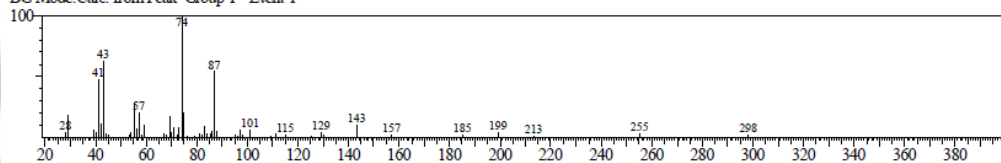
Hit#:4 Entry:142878 Library:WILEY229.LIB
 SI:92 Formula:C19 H36 O2 CAS:2777-58-4 MolWeight:296 RetIndex:0
 CompName:6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) Methyl petroselinate \$\$ Methyl cis-6-octadecenoate \$\$



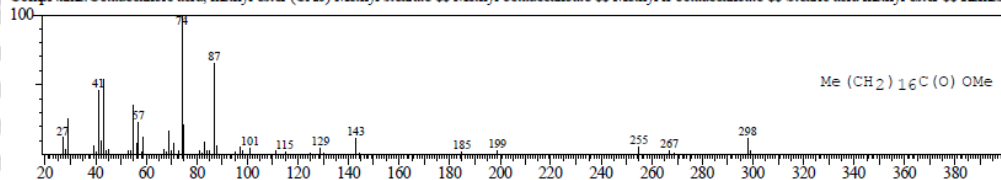
Hit#:5 Entry:123055 Library:WILEY229.LIB
 SI:91 Formula:C17 H32 O2 CAS:1120-25-8 MolWeight:268 RetIndex:0
 CompName:9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) Methyl palmitoleate \$\$ Methyl palmitoleate \$\$



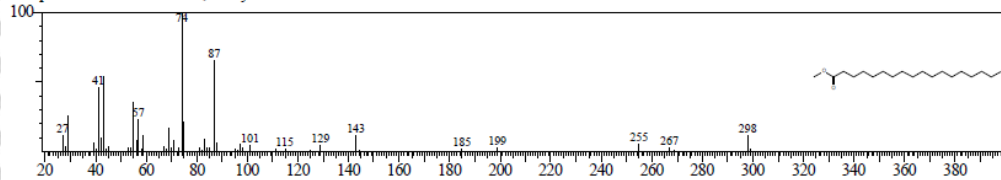
<< Target >>
 Line#:7 R Time:41.125(Scan#:4312) MassPeaks:53
 RawMode:Averaged 41.117-41.133(4311-4313) BasePeak:74.05(166016)
 BGMode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



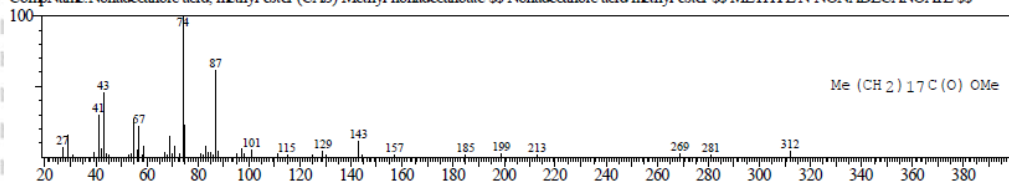
Hit#:1 Entry:144206 Library:WILEY229.LIB
 SI:95 Formula:C19 H38 O2 CAS:112-61-8 MolWeight:298 RetIndex:0
 CompName:Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl stearate \$\$ Methyl octadecanoate \$\$ Methyl n-octadecanoate \$\$ Stearic acid methyl ester \$\$ Kenesmer 9718



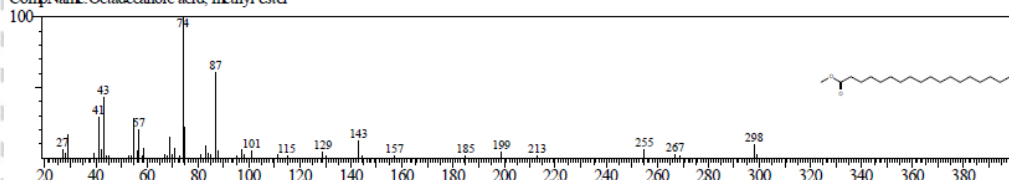
Hit#:2 Entry:10479 Library:NIST12.LIB
 SI:95 Formula:C19H38O2 CAS:112-61-8 MolWeight:298 RetIndex:0
 CompName:Octadecanoic acid, methyl ester



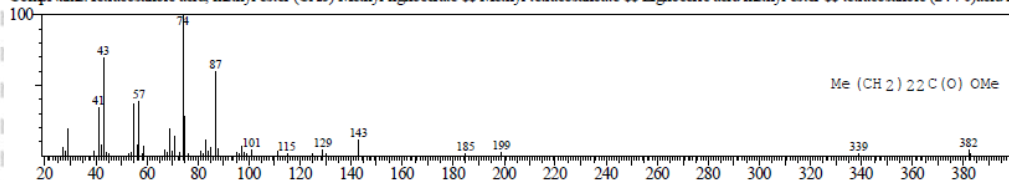
Hit# 3 Entry: 153311 Library: WILEY229.LIB
 SI: 93 Formula: C20 H40 O2 CAS: 1731-94-8 MolWeight: 312 RefIndex: 0
 CompName: Nonadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl nonadecanoate \$\$ Nonadecanoic acid methyl ester \$\$ METHYL N-NONADECANOATE \$\$



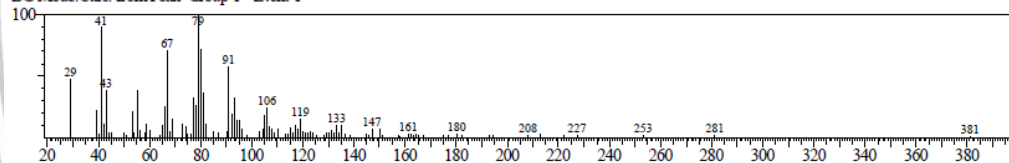
Hit# 4 Entry: 10480 Library: NIST12.LIB
 SI: 93 Formula: C19H38O2 CAS: 112-61-8 MolWeight: 298 RefIndex: 0
 CompName: Octadecanoic acid, methyl ester



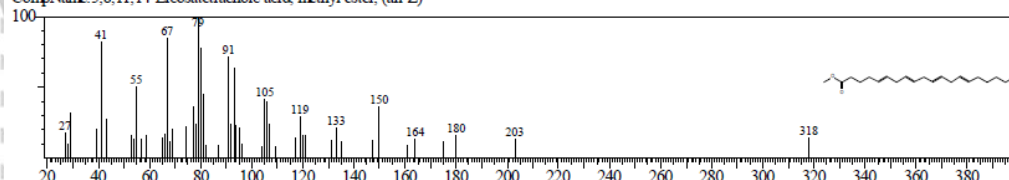
Hit# 5 Entry: 187516 Library: WILEY229.LIB
 SI: 93 Formula: C25 H50 O2 CAS: 2442-49-1 MolWeight: 382 RefIndex: 0
 CompName: Tetracosanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl lignocerate \$\$ Methyl tetracosanoate \$\$ Lignoceric acid methyl ester \$\$ tetracosanoic (24 : 0) acid methyl ester !



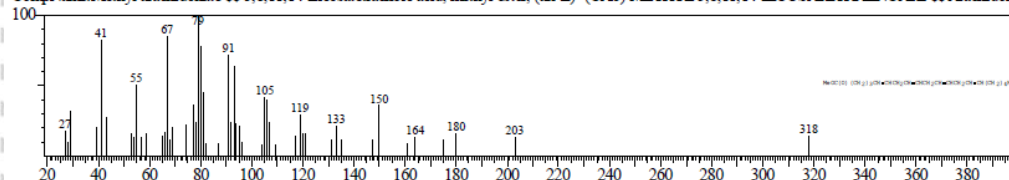
<< Target >>
 Line# 8 R. Time: 43.700 (Scan#: 4621) MassPeaks: 100
 RawMode: Averaged 43.692-43.708 (4620-4622) BasePeak: 79.00 (7261)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



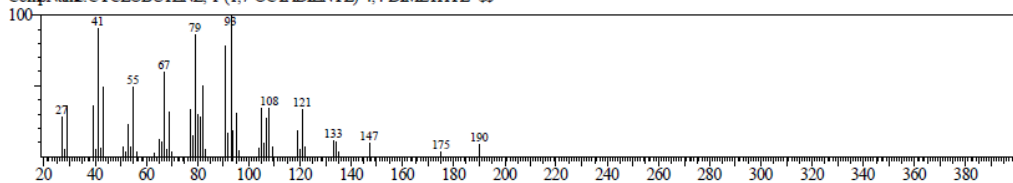
Hit# 1 Entry: 10996 Library: NIST12.LIB
 SI: 84 Formula: C21H40O2 CAS: 2566-89-4 MolWeight: 318 RefIndex: 0
 CompName: 5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester, (all-Z)-



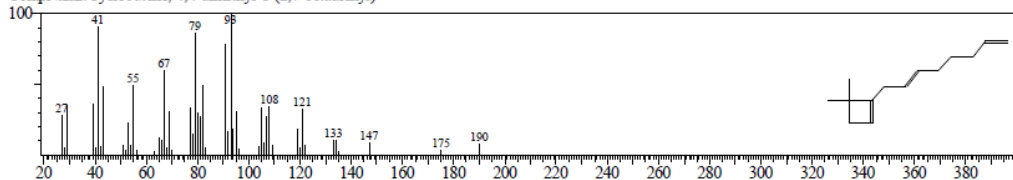
Hit# 2 Entry: 157240 Library: WILEY229.LIB
 SI: 84 Formula: C21 H34 O2 CAS: 2566-89-4 MolWeight: 318 RefIndex: 0
 CompName: Methyl arachidonate \$\$ 5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester, (all-Z)- (CAS) METHYL 5,8,11,14-EICOSATETRAENOATE \$\$ Arachidonic acid methyl ester



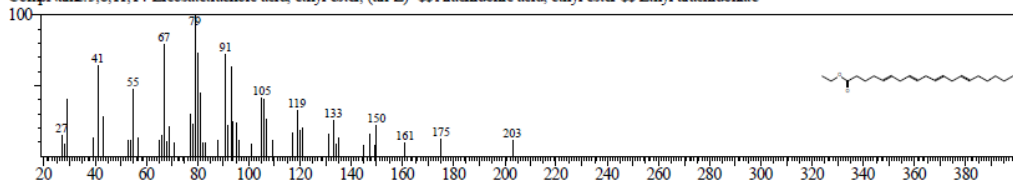
Hit#3 Entry:59015 Library:WILEY229.LIB
 SI:82 Formula:C14 H22 CAS:0-00-0 MolWeight:190 RetIndex:0
 CompName:CYCLOBUTENE, 1-(1,7-OCTADIENYL)-4,4-DIMETHYL- \$\$



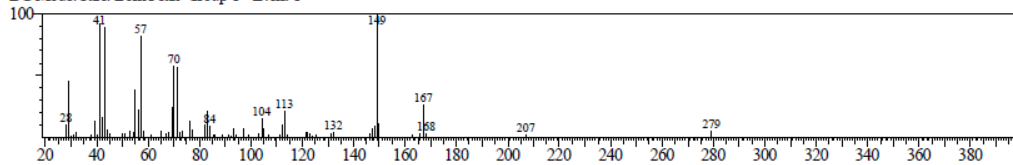
Hit#4 Entry:20382 Library:NIST62.LIB
 SI:82 Formula:C14H22 CAS:62338-42-5 MolWeight:190 RetIndex:0
 CompName:Cyclobutene, 4,4-dimethyl-1-(2,7-octadienyl)-



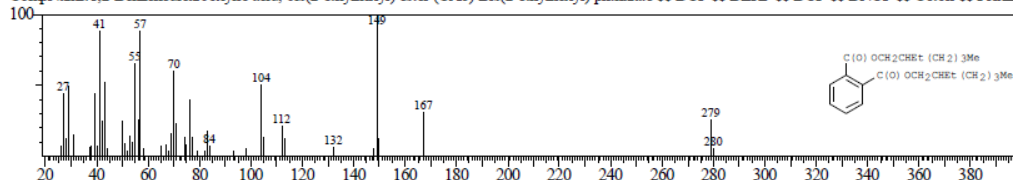
Hit#5 Entry:47236 Library:NIST62.LIB
 SI:82 Formula:C22H36O2 CAS:1808-26-0 MolWeight:332 RetIndex:0
 CompName:5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, ethyl ester, (all-Z)- \$\$ Arachidonic acid, ethyl ester \$\$ Ethyl arachidonate



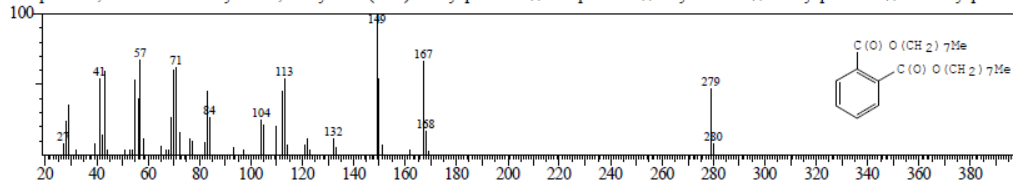
<< Target >>
 Line#:9 R.Time:48.500(Scan#:5197) MassPeaks:70
 RawMode:Averaged 48.492-48.508(5196-5198) BasePeak:149.00(16216)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



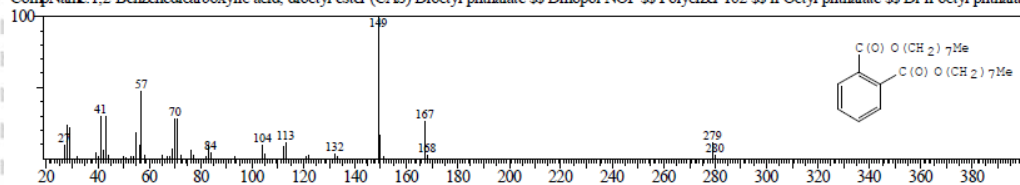
Hit#1 Entry:190635 Library:WILEY229.LIB
 SI:85 Formula:C24 H38 O4 CAS:117-81-7 MolWeight:390 RetIndex:0
 CompName:1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS) Bis(2-ethylhexyl) phthalate \$\$ DOP \$\$ DEHP \$\$ DOF \$\$ DNOP \$\$ Octoil \$\$ Fleximel \$\$



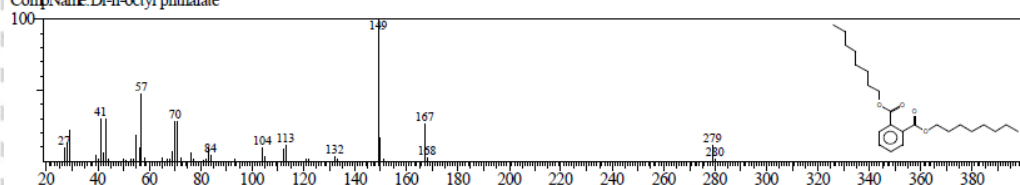
Hit#2 Entry:190626 Library:WILEY229.LIB
 SI:85 Formula:C24 H38 O4 CAS:117-84-0 MolWeight:390 RetIndex:0
 CompName:1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dioctyl phthalate \$\$ Dinopol NOP \$\$ Polycizer 162 \$\$ n-Octyl phthalate \$\$ Di-n-octyl phthalate \$\$



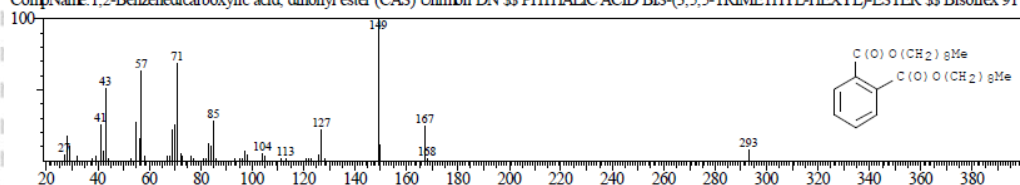
Hit# 3 Entry: 190624 Library: WILEY229.LIB
 SE: 82 Formula: C₂₄H₃₈O₄ CAS: 117-84-0 MolWeight: 390 RetIndex: 0
 CompName: 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dinopol NOP \$\$ Polycizer 162 \$\$ n-Octyl phthalate \$\$ Di-n-octyl phthalate \$\$ Dioctyl



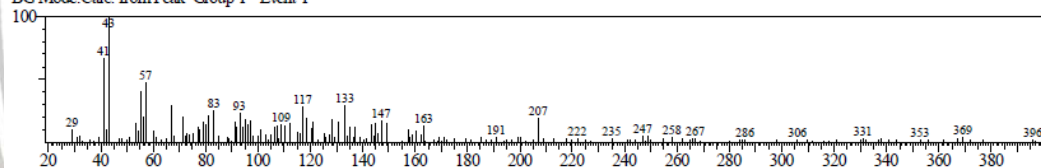
Hit# 4 Entry: 11937 Library: NIST12.LIB
 SE: 82 Formula: C₂₄H₃₈O₄ CAS: 117-84-0 MolWeight: 390 RetIndex: 0
 CompName: Di-n-octyl phthalate



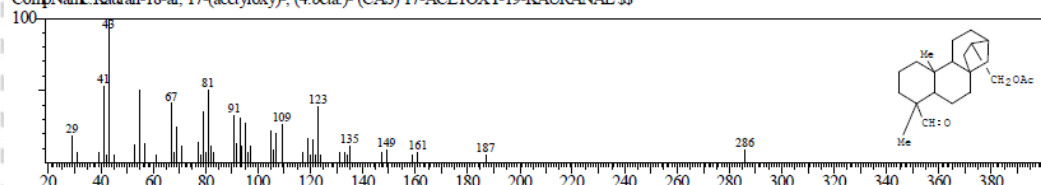
Hit# 5 Entry: 199741 Library: WILEY229.LIB
 SE: 80 Formula: C₂₆H₄₂O₄ CAS: 84-76-4 MolWeight: 418 RetIndex: 0
 CompName: 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester (CAS) Unimoll DN \$\$ PHTHALIC ACID BIS-(3,5,5-TRIMETHYL-HEXYL)-ESTER \$\$ Bisoflex 91 \$\$ Bisoflex I



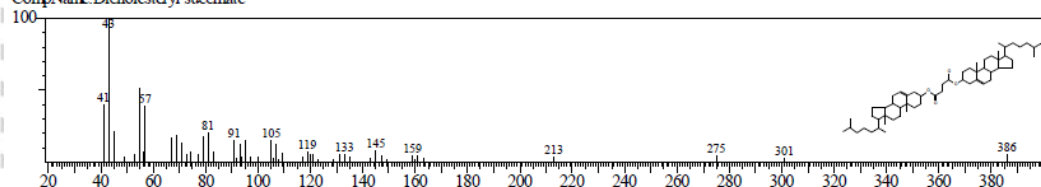
<< Target >>
 Line#: 10 R.Time: 52.742(Scan#: 5706) MassPeaks: 164
 RawMode: Averaged 52.733-52.750(5705-5707) BasePeak: 43.00(3275)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



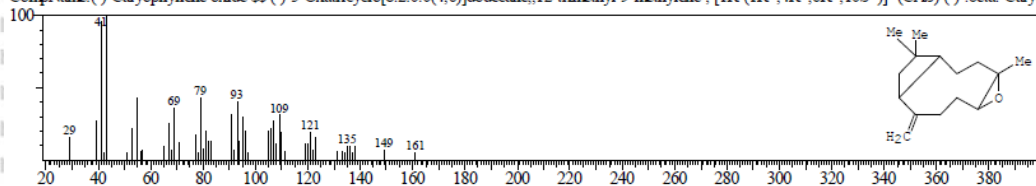
Hit# 1 Entry: 172196 Library: WILEY229.LIB
 SE: 71 Formula: C₂₂H₃₄O₃ CAS: 55902-84-6 MolWeight: 346 RetIndex: 0
 CompName: Kauran-18-ol, 17-(acetoxy)-, (4.beta.)- (CAS) 17-ACETOXY-19-KAURANAL \$\$



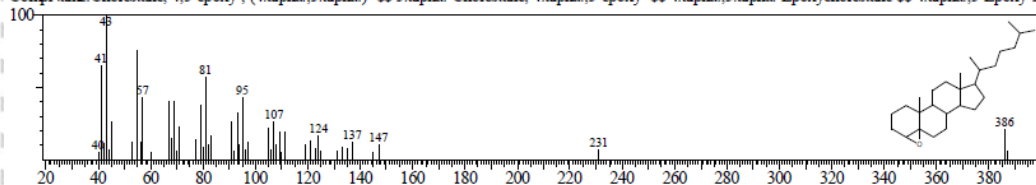
Hit# 2 Entry: 62078 Library: NIST62.LIB
 SE: 71 Formula: C₅₈H₉₄O₄ CAS: 0-00-0 MolWeight: 854 RetIndex: 0
 CompName: Dicholesteryl succinate



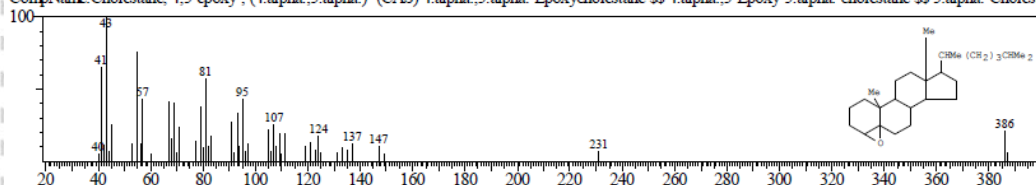
Hit# 3 Entry: 84617 Library: WILEY229.LIB
 SE 71 Formula: C15 H24 O CAS: 1139-30-6 MolWeight: 220 RetIndex: 0
 CompName: (-)-Caryophyllene oxide SS (-)-5-Oxatricyclo[8.2.0.0(4,6)]dodecane, 12-trimethyl-9-methylene-, [1R-(1R*,4R*,6R*,10S*)]- (CAS) (-)-beta-Caryophyllene



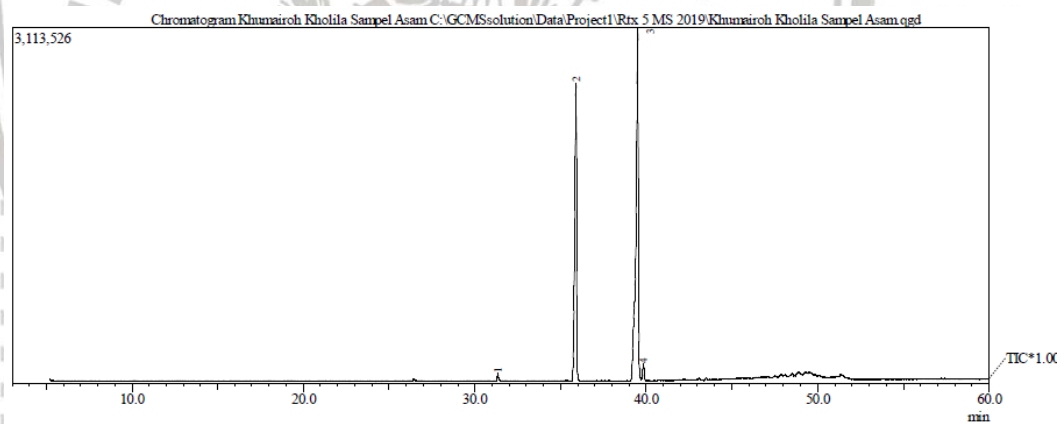
Hit# 4 Entry: 52794 Library: NIST62.LIB
 SE 70 Formula: C27H46O CAS: 6079-19-2 MolWeight: 386 RetIndex: 0
 CompName: Cholestane, 4,5-epoxy-, (4.alpha.,5.alpha.)- SS 5.alpha.-Cholestane, 4.alpha.,5-epoxy- SS 4.alpha.,5.alpha.-Epoxycholestane SS 4.alpha.,5-Epoxy-5.alpha.-cho



Hit# 5 Entry: 189250 Library: WILEY229.LIB
 SE 70 Formula: C27H46O CAS: 6079-19-2 MolWeight: 386 RetIndex: 0
 CompName: Cholestane, 4,5-epoxy-, (4.alpha.,5.alpha.)- (CAS) 4.alpha.,5.alpha.-Epoxycholestane SS 4.alpha.,5-Epoxy-5.alpha.-cholestane SS 5.alpha.-Cholestane, 4.alpha.

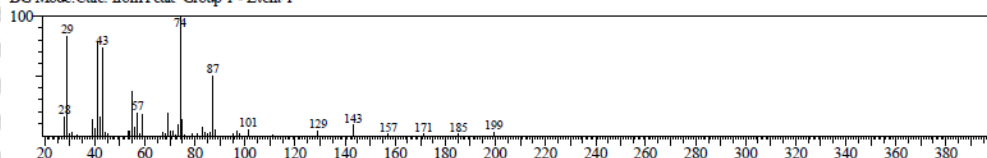


2. Sampel FKF Optimum

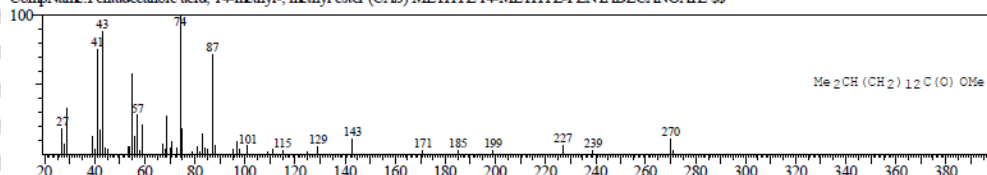


Peak#	R. Time	I Time	F. Time	Area	Area%	Height
1	31.340	31.250	31.442	310934	0.62	61903
2	35.906	35.650	36.083	19216670	38.20	2609049
3	39.503	39.100	39.692	29936586	59.51	3086747
4	39.834	39.692	39.950	837158	1.66	146718
				50301348	100.00	5904417

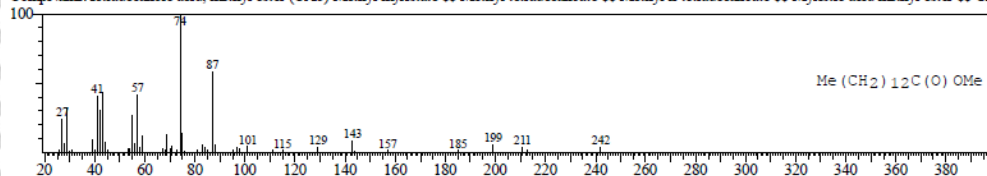
Library
 << Target >>
 Line#1 R.Time:31.342(Scan#:3138) MassPeaks:48
 RawMode:Averaged 31.333-31.350(3137-3139) BasePeak:74.05(8937)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



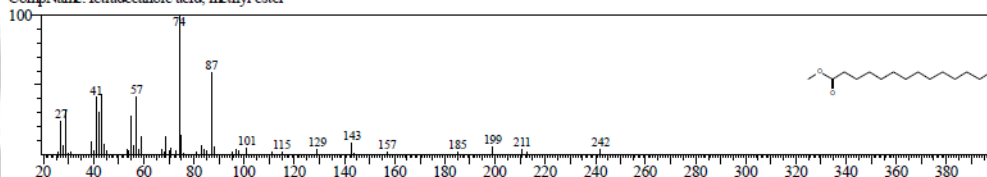
Hit#1 Entry:124651 Library:WILEY229.LIB
 SI:90 Formula:C17 H34 O2 CAS:5129-60-2 MolWeight:270 RetIndex:0
 CompName:Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester (CAS) METHYL 14-METHYL-PENTADECANOATE \$\$



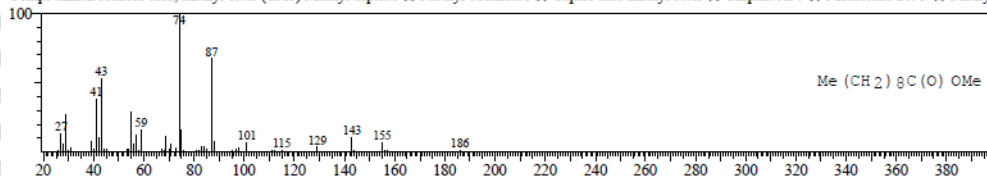
Hit#2 Entry:103148 Library:WILEY229.LIB
 SI:89 Formula:C15 H30 O2 CAS:124-10-7 MolWeight:242 RetIndex:0
 CompName:Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl myristate \$\$ Methyl tetradecanoate \$\$ Methyl n-tetradecanoate \$\$ Myristic acid methyl ester \$\$ Uniphat A50



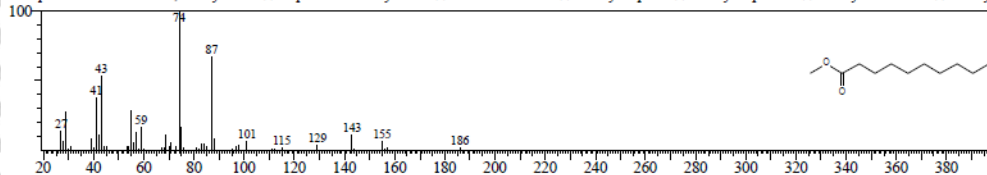
Hit#3 Entry:9005 Library:NIST12.LIB
 SI:89 Formula:C15H30O2 CAS:124-10-7 MolWeight:242 RetIndex:0
 CompName:Tetradecanoic acid, methyl ester



Hit#4 Entry:55938 Library:WILEY229.LIB
 SI:88 Formula:C11 H22 O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName:Decanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl caprate \$\$ Methyl decanoate \$\$ Capric acid methyl ester \$\$ Uniphat A30 \$\$ Metholene 2095 \$\$ Methyl caprate

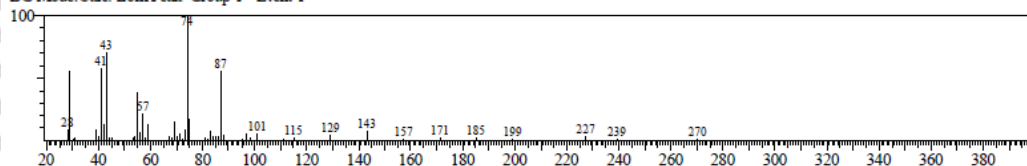


Hit#5 Entry:19451 Library:NIST62.LIB
 SI:88 Formula:C11H22O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName:Decanoic acid, methyl ester \$\$ Capric acid methyl ester \$\$ Metholene 2095 \$\$ Methyl caprate \$\$ Methyl caprinatate \$\$ Methyl decanoate \$\$ Methyl-n-caprate

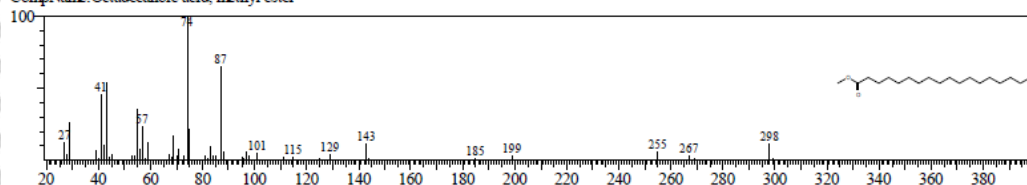


<< Target >>

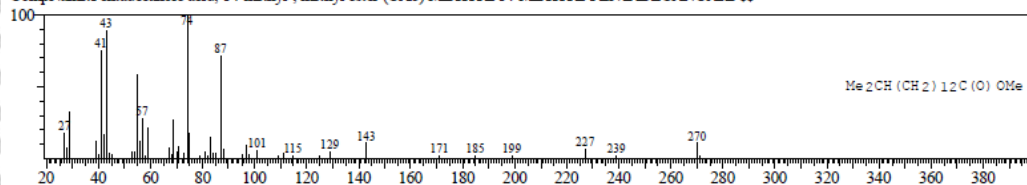
Line#:2 R. Time:35.908(Scan#:3686) MassPeaks:50
 RawMode:Averaged 35.900-35.917(3685-3687) BasePeak:74.05(417698)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



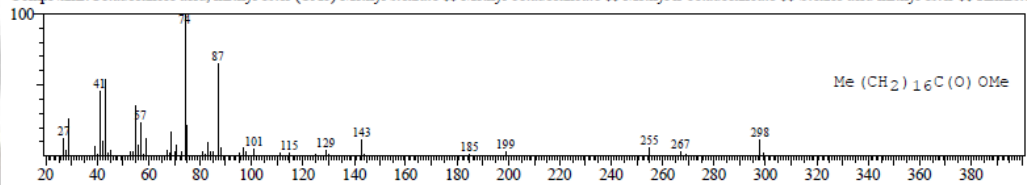
Hit#1 Entry:10479 Library:NIST12.LIB
 SE:91 Formula:C19H38O2 CAS:112-61-8 MolWeight:298 RetIndex:0
 CompName:Octadecanoic acid, methyl ester



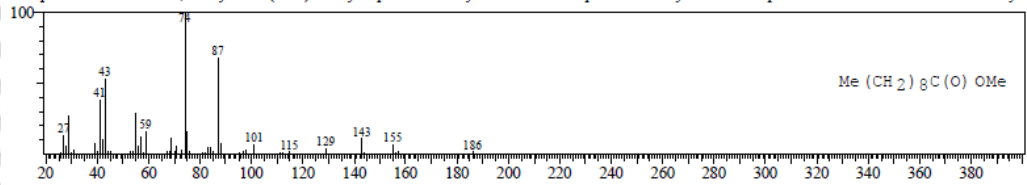
Hit#2 Entry:124651 Library:WILEY229.LIB
 SE:91 Formula:C17H34O2 CAS:5129-60-2 MolWeight:270 RetIndex:0
 CompName: Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester (CAS) METHYL 14-METHYL-PENTADECANOATE \$\$



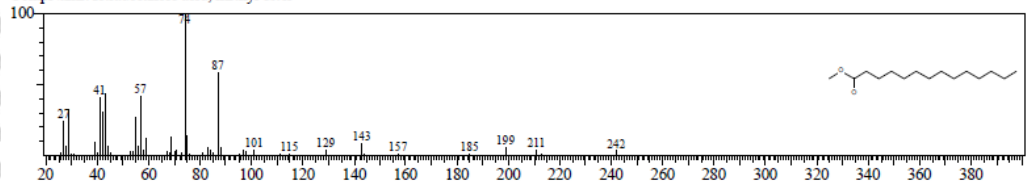
Hit#3 Entry:144206 Library:WILEY229.LIB
 SE:91 Formula:C19H38O2 CAS:112-61-8 MolWeight:298 RetIndex:0
 CompName: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl stearate \$\$ Methyl octadecanoate \$\$ Methyl n-octadecanoate \$\$ Stearic acid methyl ester \$\$ Kemester 9718 \$\$



Hit#4 Entry:55938 Library:WILEY229.LIB
 SE:91 Formula:C11H22O2 CAS:110-42-9 MolWeight:186 RetIndex:0
 CompName: Decanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl caprate \$\$ Methyl decanoate \$\$ Capric acid methyl ester \$\$ Uniphat A30 \$\$ Metholene 2095 \$\$ Methyl caprinate \$

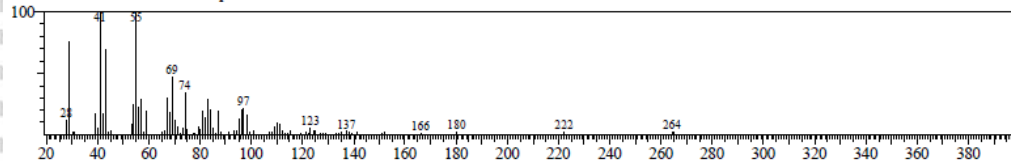


Hit#5 Entry:9005 Library:NIST12.LIB
 SE:91 Formula:C15H30O2 CAS:124-10-7 MolWeight:242 RetIndex:0
 CompName: Tetradecanoic acid, methyl ester

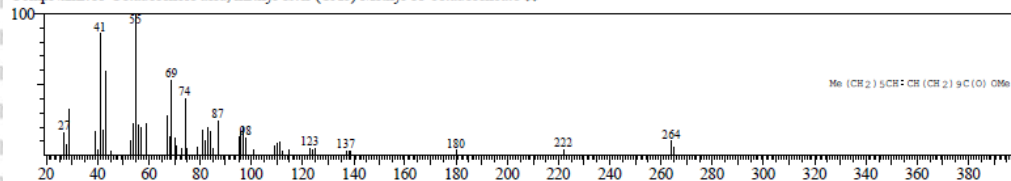


<< Target >>

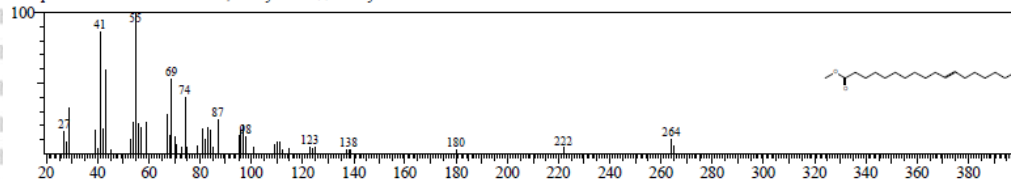
Line# 3 R. Time: 39.500 (Scan#: 4117) MassPeaks: 82
 RawMode: Averaged 39.492-39.508 (4116-4118) BasePeak: 55.05 (303206)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



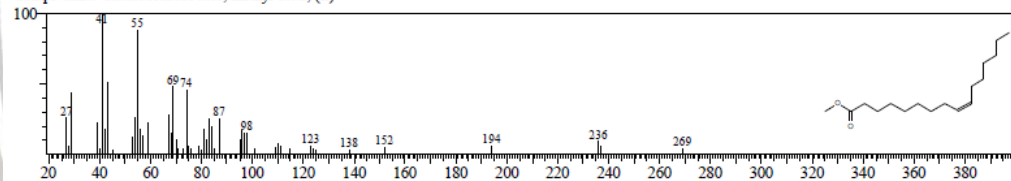
Hit# 1 Entry: 142908 Library: WILEY229.LIB
 SI: 94 Formula: C19 H36 O2 CAS: 52380-33-3 MolWeight: 296 RetIndex: 0
 CompName: 11-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) Methyl 11-octadecenoate \$S\$



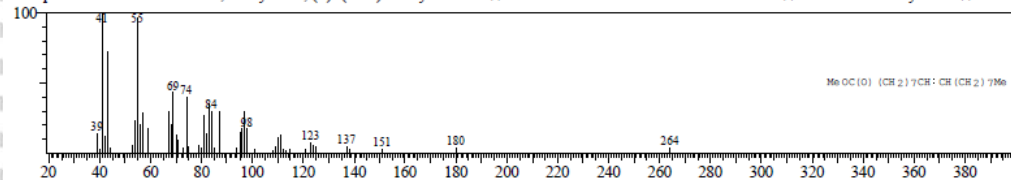
Hit# 2 Entry: 42139 Library: NIST62.LIB
 SI: 94 Formula: C19 H36 O2 CAS: 52380-33-3 MolWeight: 296 RetIndex: 0
 CompName: 11-Octadecenoic acid, methyl ester \$S\$ Methyl 11-octadecenoate



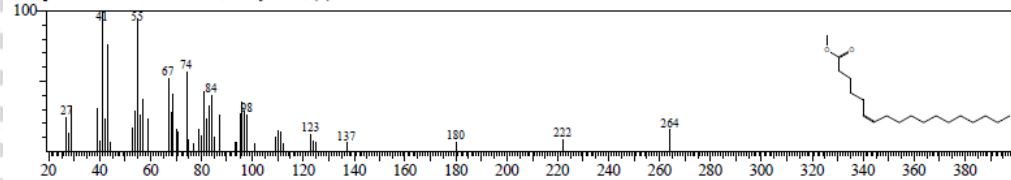
Hit# 3 Entry: 9701 Library: NIST12.LIB
 SI: 92 Formula: C17 H32 O2 CAS: 1120-25-8 MolWeight: 268 RetIndex: 0
 CompName: 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-



Hit# 4 Entry: 142902 Library: WILEY229.LIB
 SI: 90 Formula: C19 H36 O2 CAS: 1937-62-8 MolWeight: 296 RetIndex: 0
 CompName: 9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)- (CAS) Methyl elaidate \$S\$ METHYL-TRANS 9-OCTADECENOATE \$S\$ Elaidic acid methyl ester \$S\$ Elaidic acid, methyl ester

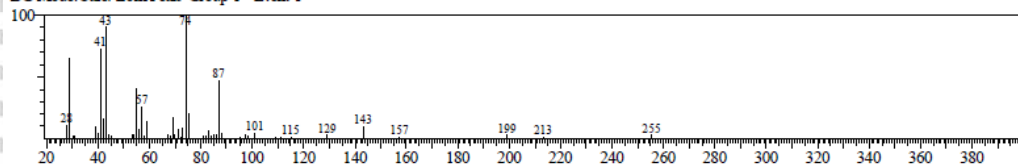


Hit# 5 Entry: 10432 Library: NIST12.LIB
 SI: 89 Formula: C19 H36 O2 CAS: 2777-58-4 MolWeight: 296 RetIndex: 0
 CompName: 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-

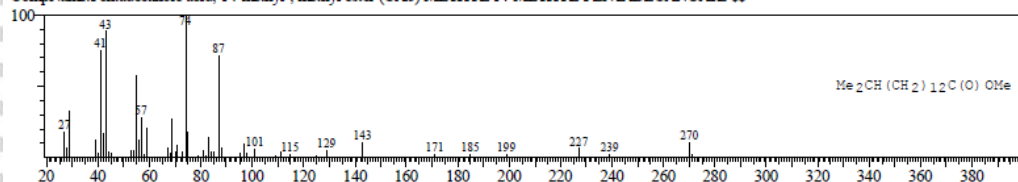


<< Target >>

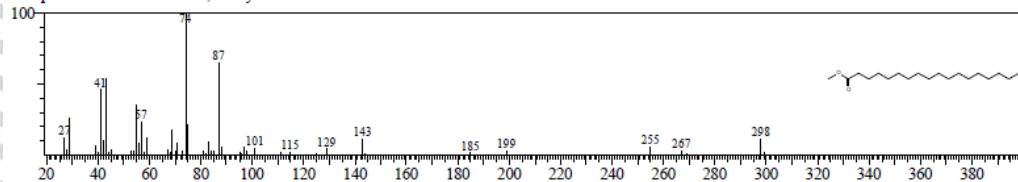
Line# 4 R. Time: 39.833(Scan#: 4157) MassPeaks: 48
 RawMode: Averaged 39.825-39.842(4156-4158) BasePeak: 74.10(20082)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



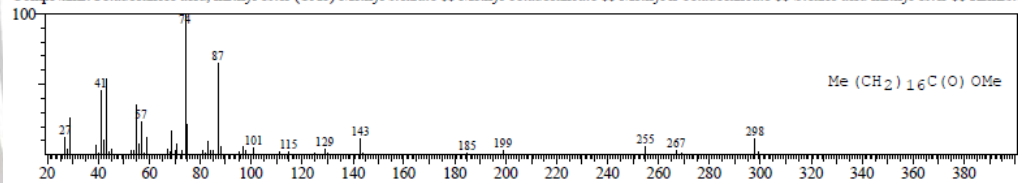
Hit# 1 Entry: 124651 Library: WILEY229.LIB
 SI: 91 Formula: C17 H34 O2 CAS: 5129-60-2 MolWeight: 270 RetIndex: 0
 CompName: Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester (CAS) METHYL 14-METHYL-PENTADECANOATE SS



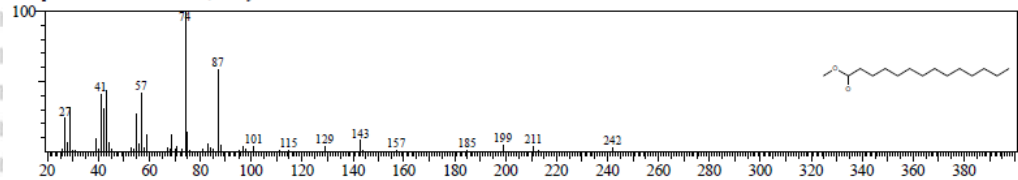
Hit# 2 Entry: 10479 Library: NIST12.LIB
 SI: 90 Formula: C19 H38 O2 CAS: 112-61-8 MolWeight: 298 RetIndex: 0
 CompName: Octadecanoic acid, methyl ester



Hit# 3 Entry: 144206 Library: WILEY229.LIB
 SI: 90 Formula: C19 H38 O2 CAS: 112-61-8 MolWeight: 298 RetIndex: 0
 CompName: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl stearate SS Methyl octadecanoate SS Methyl n-octadecanoate SS Stearic acid methyl ester SS Kemester 9718 S



Hit# 4 Entry: 9005 Library: NIST12.LIB
 SI: 89 Formula: C15 H30 O2 CAS: 124-10-7 MolWeight: 242 RetIndex: 0
 CompName: Tetradecanoic acid, methyl ester



Hit# 5 Entry: 103148 Library: WILEY229.LIB
 SI: 89 Formula: C15 H30 O2 CAS: 124-10-7 MolWeight: 242 RetIndex: 0
 CompName: Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl myristate SS Methyl tetradecanoate SS Methyl n-tetradecanoate SS Myristic acid methyl ester SS Uniphart A50

