

Fraksinasi dan Karakterisasi Fosfolipid dari Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

(Phospholipid Fractination and Characterisation of *Calophyllum inophyllum* Kernel)

Desiana Nuriza Putri^{1*}, Chusnul Hidayat², Pudji Hastuti²

¹Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan – Fakultas Pertanian Peternakan - Universitas Muhammadiyah Malang
Jl. Raya Tlogomas No. 246 – Malang Indonesia 65144

²Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan – Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas GADJAH MADA
Jl. Flora No. 1 Bulaksumur Yogyakarta - Indonesia 55281
Email : dndesiana.nuriza@gmail.com (085259648865)

Abstract

The aim of this research is to obtain the Phospholipid characteristic of *Calophyllum inophyllum* which is suitable with the need by means of fractination process. Phospholipid characterisation resulted from fractination will generate recommendation of Phospholipid fractination use on suitable product and food processing. The extraction process was performed by using chloroform-methanol (1:2 v/v). The polar lipid is separated by using ethanol, then ethanol is used to extract Phospholipid. Fractination was performed based on the solubility in ethanol and acetone. There were 5 Phospholipid fraction namely crude Phospholipid (without fractination), ethanol soluble, ethanol insoluble, ethanol-acetone insoluble fraction. Each fraction was characterised for phosphatidylcholine content (PC), hydrophilic-lipophilic balance (HLB), peroxide value, viscosity and color. The result showed that the highest PC content was found on ethanol-soluble fraction, whereas highest fatty acid which arrange Phospholipid were palmitat (C16:0) and Oleat (C:18). Phospholipid fraction which is suitable to be used as oil in water emulsifier is ethanol soluble fraction, and ethanol insoluble fraction is used as water in oil emulsifier.

Keywords: *Calophyllum inophyllum* kernel, phosphatidylcholine, phospholipid, phospholipid characteristic

1. Pendahuluan

Fosfolipid merupakan struktur penting dan komponen fungsional dari suatu membran sel. Fosfolipid mempunyai banyak manfaat dalam berbagai aplikasi. Menurut Reddy *et al.* (2005) fosfolipid dapat digunakan pada beberapa aplikasi yang cukup penting seperti pengemulsi pada produk pangan, farmasi, dan juga kosmetika. Sejauh ini fosfolipid yang diproduksi secara komersial berasal dari lesitin kedelai dan kuning telur (Hara *et al.*, 2002). Dengan banyaknya manfaat dan potensi fosfolipid tersebut, diperlukan sumber fosfolipid yang lain agar tingkat produksi fosfolipid juga semakin besar. Salah satu sumber fosfolipid adalah dari Biji nyamplung. Biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) memiliki kandungan fosfolipid yang lebih tinggi dari pada kedelai. Penggunaan biji nyamplung sebagai sumber lesitin alternatif dapat mengurangi ketergantungan masyarakat akan produk berbasis kedelai serta dapat menambah nilai dari biji nyamplung. Hermavanthy (1990) menyatakan bahwa dalam biji

nyamplung mengandung fosfolipid sebesar 1,6%. Kandungan fosfolipid biji nyamplung ini lebih tinggi dari pada kedelai yang mengandung fosfolipid sebesar 1,12% (Nzai and Proctor, 1998).

Penelitian pada biji nyamplung yang telah dilakukan adalah mengenai minyak nyamplung sebagai biodiesel (Bustomi, *et al.*, 2008), komposisi kimia anti mikrobia dari biji nyamplung (Yimdojo *et al.*, 2004), evaluasi toksikologi biji nyamplung (Ajayi *et al.*, 2007) dan isolasi dan karakterisasi protein biji nyamplung (Prima, 2009). Sedangkan penelitian pada fraksinasi dan karakterisasi fosfolipid dari biji nyamplung belum dilakukan. Belum diketahuinya potensi pemanfaatan dari gum minyak biji nyamplung membuka peluang penelitian mengenai karakter fosfolipid biji nyamplung sebagai sumber lesitin.

Fosfolipid dalam biji nyamplung terdiri dari fosfatidiletanolamin (46,3%) fosfatidilkolin (33,8%), dan asam fosfatidat (8,1%). Untuk mendapatkan sifat fosfolipid biji nyamplung yang sesuai dengan kebutuhan diperlukan proses fraksinasi. Palacios dan Wang (2005) menyatakan bahwa fosfolipid kuning telur diekstrak dengan menggunakan etanol, dilanjutkan ekstraksi aseton untuk menghilangkan

lemak dari fraksi etanol. Karakterisasi fraksi fosfolipid hasil fraksinasi diharapkan dapat menghasilkan rekomendasi penggunaan fraksi fosfolipid pada produk dan proses pengolahan pangan yang sesuai.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan adalah biji Nyamplung didapat dari Desa Mandiri Energi, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: etanol (teknis); metanol (teknis); aseton (teknis), gas nitrogen, akuades dan bahan kimia yang termasuk dalam "analytical grade" antara lain: aseton, metanol, etanol BF3, asam klorida (HCl), *Zinc oxide*, potasium hidroksida (KOH), asam sulfat (H₂SO₄), *sodium molybdate*, *hydrazine sulfate*, *potassium dihydrogen phosphate* diperoleh dari Merck. Standar *fosfatidilkolin* diperoleh dari Sigma.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: (IKAT-50), *cabinet dryer* (Eyela Type NDS 601D), *shaker waterbath* (Julabo SW23), *stirrer* (Glas-Col), *rotary vacuum evaporator*, *sentrifuge* (IKA-WERKE), corong kaca, pengukur waktu, alat gelas seperti tabung reaksi, erlenmeyer 100 ml dan 250 ml, gelas ukur, gelas beker, pipet ukur, dan labu ukur. spektrofotometer (Genesys-20), lampu UV λ 254 nm, vortex, timbangan elektronik, timbangan analitik (Shimadzu dan Metler), pipet mikro 100-1000 μ L, dan propipet, oven, plat TLC (Silica gel G60F254 diperoleh dari Merck KGaA, Jerman), chamber TLC (Camag), penggaris, *microsyringe* (Hamilton), pipet mikro 2-20 μ L, Automatic TLC Scanner (Shimadzu), kromatografi gas (Shimadzu).

2.2 Ekstraksi Total Lipid (metode modifikasi Yunoki et al., 2008)

Sejumlah 100 g biji nyamplung yang telah dikeringkan dan diiris diekstrak dengan 200 ml kloroform:metanol (1:2 v/v) selama 1 jam pada suhu ruang (disertai dengan shaker). Setelah disaring menggunakan kertas saring, ekstrak dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 50°C. Total lipid kasar yang diperoleh kemudian ditimbang.

2.3 Separasi Fosfolipid Kasar dari Ekstrak Total Lipid

Total lipid yang diperoleh dari proses ekstraksi diekstrak dengan menggunakan metanol.

Sebanyak 10 g total lipid diekstrak dengan menggunakan 20 ml metanol untuk melarutkan fosfolipid/lipid polar. Fase yang larut methanol diaerasi/dievdaporasi sehingga didapatkan fase larut methanol (lipid polar/fosfolipid)

2.4 Fraksinasi Fosfolipid

5 gram fosfolipid kasar dilarutkan dalam 20 ml etanol kemudian diagitasi selama 60 menit. Supernatan dan endapan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 15000 g selama 10 menit. Residu diambil dan merupakan fraksi tidak larut etanol. Fraksi larut etanol diambil dengan caramenguapkan aseton dengan menyemprotkan gas nitrogen. Fraksi larut etanol diambil sebagian untuk dikarakterisasi dan sebagian lagi difraksinasi lebih lanjut dengan melarutkan dalam aseton (1:4 b/v) dan diagitasi selama 60 menit. Fraksi tidak larut aseton dipisahkan dari larutan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 15000 g. fraksi larut aeton diambil dengan cara menguapkan aseton dengan gas nitrogen. Dari hasil fraksinasi ini diperoleh empat fraksi fosfolipid yaitu fraksi tidak larut etanol (*etanol insoluble*), fraksi larut etanol (*etanol soluble*), fraksi tidak larut aseton (*etanol soluble-acetone insoluble*), fraksi larut aseton (*acetone soluble-ethanol soluble*), dan fosfolipid tanpa fraksinasi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian diidentifikasi jenis-jenis fosfolipid dan asam lemak penyusunnya serta dikarakterisasi lebih lanjut.

2.5 Karakterisasi fraksi-fraksi fosfolipid dan fosfolipid tanpa fraksinasi (Fosfolipid Kasar)

Jenis-jenis fosfolipid dari hasil fraksinasi dan tanpa fraksinasi diidentifikasi meliputi kadar fosfolipid, kadar PC, nilai HLB (*Hydrophilic lipophilic balance*), angka peroksida, warna dan viskositas.

2.6 Pengamatan dan Analisa

Pengamatan dan analisa pada penelitian ini dilakukan pada fosfolipid kasar dan fosfolipid hasil fraksinasi meliputi:

1. Kadar fosfolipid kasar biji nyamplung
2. Kuantifikasi fosfatidilkolin (PC) setiap fraksi dengan TLC scanner (Nzai dan Proctor, 1998)
3. Bilangan peroksida
4. Viskositas
5. Warna

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Ekstraksi Fosfolipid Biji Nyamplung

Proses ekstraksi total lipid dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform:methanol (1:2 v/v) menghasilkan total lipid sebanyak 37% (persen gram lipid hasil ekstraksi terhadap gram biji nyamplung). Kloroform merupakan jenis pelarut non polar yang mampu mengekstrak lipid dari biji nyamplung. Sedangkan metanol merupakan jenis pelarut polar yang dapat mengoptimalkan proses ekstraksi fosfolipid yang termasuk dalam senyawa lipid polar. Penggunaan kombinasi kedua jenis pelarut tersebut adalah untuk optimalisasi ekstraksi fosfolipid dari biji nyamplung.

Hasil pengukuran kadar fosfolipid pada ekstrak total lipid dengan pelarut kloroform:metanol diperoleh kadar fosfolipid sebesar 60,57%. Hal ini karena kombinasi pelarut kloroform:metanol memiliki polaritas yang sesuai dengan lipid biji nyamplung sehingga pelarut kloroform:metanol sangat baik untuk digunakan dalam ekstraksi total lipid pada biji nyamplung. Nilai indeks polaritas pelarut kloroform-metanol berada di antara etanol dan heksana. Penggunaan etanol mungkin bersifat terlalu polar sedangkan heksana terlalu nonpolar. Oleh karena itu campuran kloroform dengan metanol (biasanya 2:1) sering dianjurkan sebagai pelarut dalam ekstraksi total lipid (Meeren *et al.*, 1996).

Hasil ekstraksi lipid dari biji nyamplung masih terdiri dari lipid polar dan lipid netral dimana fosfolipid merupakan bagian lipid polar. Fosfolipid merupakan lipid polar karena mempunyai gugus fosfat yang teresterifikasi pada posisi sn-3 dari kerangka gliserol. Proses pemisahan pada lipid dilakukan berdasarkan polaritas dan kelarutan senyawa dalam pelarut. Menurut Schneider (1989)

pemisahan lipid netral dan lipid polar dapat dilakukan dengan perlakuan pelarut secara *deoiling*. Prinsipnya berdasarkan sifat lipid polar seperti glikolipid dan fosfolipid yang kebanyakan tidak larut dalam aseton.

Tabel 1. Hasil Separasi Metanol pada 10 g Lipid biji nyamplung

Fraksi	Berat (g)	Proporsi (%)
Larut Metanol	7,8	78
Tidak larut	2,2	22

Catatan : Berat fraksi tidak larut etanol merupakan hasil pengurangan

Rendemen fosfolipid dalam sampel sebesar 2,02% (persen gram fosfolipid hasil ekstraksi terhadap gram biji nyamplung). Hasil ini serupa dengan penelitian Hermavathy (1990) bahwa pada biji nyamplung terdapat fosfolipid sebesar 1,6%. Fosfolipid yang dihasilkan dari proses ekstraksi memiliki kenampakan kuning kecoklatan yang dimungkinkan karena tingginya senyawa fosfatida yang terkandung dalam fosfolipid. Tabel 1 menunjukkan fraksi larut metanol sebesar 78%. Hal ini menunjukkan bahwa proses separasi menggunakan pelarut kloroform dan metanol berhasil didapatkan fraksi lipid polar yang merupakan komponen fosfolipid sejumlah 78% dari ekstrak lipid biji nyamplung. Chow dan Ho (2002) melaporkan fosfolipid dapat dipisahkan dengan menggunakan pelarut metanol, kloroform dan aseton.

3.2 Fraksinasi Fosfolipid

Proses fraksinasi bertujuan untuk mendapatkan fraksi-fraksi berdasarkan kelarutan pada pelarut yang berbeda derajat polaritasnya. Menurut Colbert (1998) komponen spesifik fosfolipid dari lesitin dapat diisolasi dengan

menggunakan ekstraksi alkohol. Isolat fosfolipid menunjukkan sifat fungsional berbeda yang dapat meningkatkan penggunaan pada proses dan produk selektif.

Tabel 2. Fraksinasi Pelarut Etanol dan Aseton pada 10 g Fosfolipid Kasar dan Kemurnian Fosfolipid

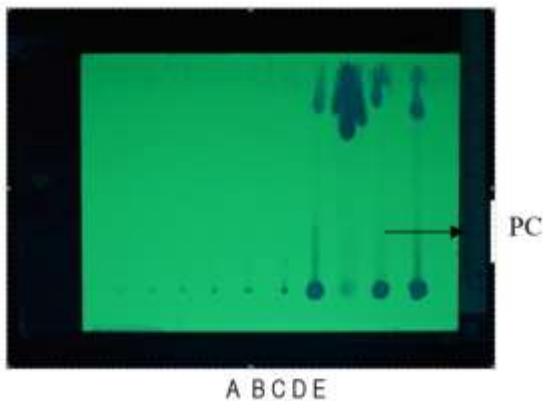
Fraksi Fosfolipid	Jumlah (g)	Proporsi (%)	Kadar Fosfolipid (%)
Fosfolipid Kasar	10		80,07
Tidak larut etanol	3,4	7,0	65,78
Larut etanol	6,6	72	84,44
Tidak larut aseton-larut etanol	4,7	1,2	69,06
Larut aseton larut etanol	1,9	7,0	68,49

Fraksi larut etanol diperoleh paling banyak (72%) dibandingkan jumlah fraksi fosfolipid yang lain dengan kemurnian terbaik (84,44%) dibandingkan fraksi lain. Hal ini menunjukkan fraksi yang larut dalam etanol diperoleh lebih banyak dibandingkan fraksi yang tidak larut dalam etanol sehingga lebih memungkinkan untuk dilanjutkan proses fraksinasi selanjutnya dengan aseton. Tingginya kadar fosfolipid dalam fraksi larut etanol diduga karena banyak kandungan fosfolipid polar dalam total lipid sehingga menyebabkan komponen lipid banyak terlarut dalam etanol disamping masih banyaknya kandungan pelarut metanol dalam fosfolipid kasar. Menurut Schneider (1989) fraksinasi menggunakan etanol pada lesitin tumbuhan akan memberikan distribusi paling spesifik dari banyak komponen fosfolipid, baik komponen yang larut maupun tidak larut. Komponen fosfolipid kedelai yang larut etanol lebih banyak dari pada tidak larut etanol. Komponen pengotor fraksi fosfolipid adalah ALB (asam lemak bebas) dan NL (netral lipid).

3.3 Karakterisasi Fraksi Fosfolipid

A. Kandungan Fosfatidilkolin (PC)

Pemisahan fosfatidilkolin dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 1 dan kadar komponen PC pada setiap fraksi dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 1. Separasi PC pada Fraksi Fosfolipid menggunakan kromatografi lapis tipis

Keterangan : A. Fraksi fosfolipid Kasar B. Fraksi larut etanol, C. Fraksi tidak larut etanol, D. Fraksi larut etanol tidak larut aseton, E. Fraksi larut etanol-larut aseton.

Lipid netral merupakan komponen pengotor dalam fraksi fosfolipid sehingga menurunkan kemurnian fosfatidilkolin yang didapatkan. Komponen fosfolipid tertinggi pada biji nyamplung

antara lain Fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilkolin (PC) dan asam fosfatidat (PA) yaitu sebesar 46,3%, 33,8% dan 8,1% (Hermavanthy, 1990). Lesitin kasar (fosfolipid kedelai) bentuknya kental dan mengandung komponen fosfolipid sebesar 60-70% (Meeren et al., 1996) dengan kandungan fosfatidilkolin (PC) sebesar 27,1% (Nzai and Proctor, 1998).

Komponen PC tertinggi terdapat pada fraksi larut etanol, sedangkan komponen PC terendah terdapat pada fraksi tidak larut etanol. Menurut Wu dan Wang (2004), ekstraksi dengan etanol menghasilkan fraksi kaya PC. Pada penelitian ini, pengayaan PC setelah fraksinasi etanol sebesar 2 kali. Tingkat kemurnian fosfatidilkolin berkisar 0,30-12,01 %. Hal ini karena fosfolipid kasar yang digunakan dalam proses fraksinasi memiliki kemurnian relatif rendah (5,96 %) sehingga hasil fraksinasi pelarut etanol dan aseton didapatkan kemurnian rendah dengan peningkatan PC sebesar 2 kali (Tabel 3).

Tabel 3. Data Perbandingan Fosfatidilkolin pada Fraksi Fosfolipid

Fraksi Fosfolipid	Kadar Fosfatidilkolin (%) (terhadap gram fraksi fosfolipid)
Fosfolipid Kasar	6,16
Larut Etanol	12,01
Tidak Larut Etanol	0,30
Larut Etanol-Aseton	0,77
Larut Etanol- Tidak Larut Aseton	5,96
Larut Etanol pada Serat Sawit	2,16

(Choo et al, 2014)

Presentase PC dalam fosfolipid kasar yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini memiliki kadar 6,16 % (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa ekstraksi menggunakan pelarut kloroform dan metanol dengan perbandingan 1:2 (v/v) selama 1 jam diduga merupakan kombinasi pelarut dan lama waktu ekstraksi optimal yang dapat dijadikan pilihan untuk menghasilkan kadar fosfolipid yang lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan pelarut lain seperti heksan dan etanol. Choo et al. (2004) dalam penelitiannya serat sawit yang diekstrak dengan menggunakan heksan dan etanol mendapatkan kadar PC dalam fosfolipid kasar ekstraksi pelarut etanol sebesar 2,16%.

B. Bilangan Peroksida



Gambar 1. Bilangan peroksida fraksi Fosfolipid

Tingginya bilangan peroksida pada fraksi larut etanol menunjukkan tingginya proses oksidasi dibandingkan fraksi lainnya. Hal ini dimungkinkan karena fraksi larut etanol memiliki asam lemak tidak jenuh oleat (4,269 mg/ml) dan asam lemak linoleat (0,965 mg/ml) paling tinggi sehingga fraksi larut etanol relatif mudah teroksidasi dibandingkan fraksi fosfolipid lainnya. Asam lemak tidak jenuh memiliki ikatan rangkap yang lebih mudah teroksidasi baik autoksidasi maupun adanya katalis.

C. Viskositas Emulsi

Fosfolipid merupakan bahan pengemulsi untuk menyatukan fase minyak dan air. Kenaikan viskositas emulsi disebabkan karena semakin tingginya luas permukaan yang dapat distabilkan oleh fosfolipid dengan dinyatakan sebagai nilai EAI. Disamping itu, viskositas memiliki kaitan dengan stabilitas emulsi, dimana dengan semakin meningkatnya stabilitas emulsi maka akan diikuti dengan peningkatan viskositas emulsi. Fraksi larut etanol dan fraksi larut etanol-aseton memiliki nilai EAI dan ASI relatif tinggi sehingga menyebabkan peningkatan viskositas emulsi.

Nilai rerata viskositas fraksi larut etanol memiliki nilai tertinggi yaitu 47 cps, sedangkan fraksi tidak larut etanol menunjukkan nilai terendah yaitu 33 cps. Hal ini karena fraksi tidak larut etanol memiliki kandungan PC relatif rendah (0,30 %). Dalam fraksinasi etanol, fraksi tidak larut etanol banyak mengandung PI dimana pengemulsi fosfolipid yang banyak mengandung gugus inositol lebih sesuai digunakan dalam emulsi air dalam minyak dari pada ketika dipakai dalam emulsi minyak dalam air (Wu and Wang,

2004). Ketidakesesuaian penggunaan pengemulsi dapat menurunkan stabilitas emulsi yang berakibat penurunan viskositas pengemulsi. Schnaider (1989) menyatakan bahwa fraksi larut etanol dari hasil fraksinasi lesitin banyak mengandung fosfatidilkolin yang sangat sesuai digunakan dalam sistem emulsi minyak dalam air.

D. Warna

Pengukuran warna dilakukan dengan menggunakan color reader hingga diperoleh nilai L, a dan b. Warna L menyatakan tingkat gelap terang, warna a menyatakan tingkat hijau-merah, warna b menyatakan tingkat biru-kuning.

Fraksi larut etanol memiliki kecerahan warna dan kecenderungan warna kuning dan merah paling rendah dibandingkan fraksi lainnya. Hal ini karena fraksi larut etanol relatif terjadi kerusakan lebih tinggi yang disebabkan tingginya kandungan asam lemak tidak jenuh. Kerusakan fosfolipid dapat diamati dari bilangan peroksida yang relatif tinggi (5,00 meq/kg) (Gambar 1) sehingga kecenderungan warna lipid menjadi gelap. Schnaider (1989) menyebutkan bahwa penampakan lesitin akibat oksidasi kemungkinan menjadi lebih kental dan produk bubuk berwarna coklat.

Kecerahan warna dan kecenderungan warna merah dan kuning tertinggi terdapat pada fraksi larut etanol - tidak larut aseton. Hal ini karena pengaruh kemampuan fosfolipid untuk menurunkan proses oksidasi yang mengakibatkan kerusakan fosfolipid sehingga warna lipid lebih cerah. Kemampuan penghambatan oksidasi disebabkan kadar PC dalam fraksi larut etanol - tidak larut aseton relatif tinggi (6,16%) dibanding fraksi lainnya

(Tabel 1). Menurut Saito dan Ishihara (1997), aktivitas antioksidan fosfolipid diperankan oleh gugus fungsinya, kolin dan etanolamin memiliki aktivitas antioksidan yang setara dengan antioksidan komersial BHA dan BHT. Gugus amino pada PC, PS, PE dan gugus gula pada PI menunjukkan sifat pengkelat logam; fosfolipid sebagai penghalang oksigen ketika terdispersi diantara permukaan minyak/air sehingga mencegah lipid kontak dengan oksigen (Judde, *et al.*, 2003).

4. Kesimpulan

Ekstraksi fosfolipid biji nyamplung dengan kloroform:metanol didapatkan kadar fosfolipid 88,07 % dan rendemen dalam sampel 2,02 %. Fraksi fosfolipid hasil fraksinasi kandungan PC tertinggi terdapat pada fraksi larut etanol (12,01%). Fraksi fosfolipid hasil fraksinasi diperoleh bilangan peroksida terendah (4,08 mek/kg) pada fosfolipid kasar, viskositas emulsi (44 cps) dan warna (L 28,83 ; a 3 ; b 7,7). Fraksi fosfolipid yang sesuai digunakan sebagai pengemulsi minyak dalam air adalah fraksi larut etanol, dan fraksi tidak larut etanol sebagai pengemulsi air dalam minyak

DAFTAR PUSTAKA

- Bustomi Sofwan, 2008. Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L) Sumber Energi Biofuel yang potensial. Dephut Balitbanghut, Jakarta
- Choo, Y. M., S.C. Bong, A.N. Ma, and C.H. Chuah. 2004. Phospholipids from Palm-ressed Fiber. *JAOCS*, 81 (5) : 471-475
- Colbert, L.B. 1998. Lecithins Tailored to Your Emulsification Needs. American Association of Cereal Chemistry, Inc. Illinois.
- Hara, S., Hasuo, H., Nakasato, M., Higaki, Y., and Totani, Y., 2002. Modification of Soybean Phospholipids by Enzymatic Transacylation. *J. OleoSci.* 51(6): 417-421
- Hermavathy, Jand J.V. Prabhakar. 1990. Lipid Composition of *Calophyllum inophyllum* Kernel. *Journal of The American Oil Chemists Society*. Vol.67, no.12
- Meeren, P.V., J. Vanderdeelen, L. Baert. 1996. Phospholipids. dalam Nollet, L.M.L. 1996. *Book of Food Analysis*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Nzai, J.M. dan A. Proctor. 1998. Phospholipids Determination In Vegetable Oil By Thin-Layer Chromatography And Imaging Densitometry. *J. Food Chemistry* vol. 63, No.4, pp:571-576.
- Palacios, L.E. dan T. Wang. 2005. Egg Yolk Lipid Fractionation and Lecithin Characterization. *Journal of The American Oil Chemists Society*. Vol.82, no.8
- Schneider, M. 1989. Fractionation and Purification of Lecithin. dalam Szuhaj, B.F. 1989. *Lecithins: Sources, Manufacture and Uses*. The American Oil Chemists society Champaign. Illinois.
- Wu, Y. dan T. Wang. 2004. Fractionation of Crude Soybean Lecithin with Aqueous Ethanol. *JAOCS*, vol.81, no.7
- Yunoki, K., O. Kukino, Y. Nadachi, T. Fujino. M. Ohnishi. 2008. Separation and Determination of Functional Complex Lipids from Chicken Skin. *JAOCS*, 85: 427-433