

## EKSTRAKSI DAN STABILITAS ANTOSIANIN DARI KULIT BUAH DUWET (*Syzygium cumini*)

[Extraction and Stability of Anthocyanins From Jambolan (*Syzygium cumini*) Skins]

Puspita Sari <sup>1)</sup>, Fitriyah Agustina <sup>2)</sup>, Mukhamad Komar <sup>2)</sup>, Unus<sup>1)</sup>, Mukhamad Fauzi <sup>1)</sup>,  
dan Triana Lindriati <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP – Universitas Jember

<sup>2)</sup> Alumni Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP – Universitas Jember

Diterima 18 Januari 2005 / Disetujui 18 Juli 2005

### ABSTRACT

Anthocyanins were extracted from jambolan skins using neutral solvents e.i water, ethanol, isopropanol, water : ethanol (1 : 1), water : isopropanol (1 : 1), ethanol : isopropanol (1 : 1), and water : ethanol : isopropanol (1 : 1 : 1) at 5 and 27°C. The stability of the anthocyanins was as affected by pH, heat, oxidator, and light was investigated. The extraction using combination of water and isopropanol at 27°C showed the highest total yield, i.e. 71.54 % (db). Furthermore, the highest anthocyanin concentration and yield were obtained in the extracts using combination of water and ethanol at 27°C i.e. 10.007.03 mg/L (db) and 2.78 % (db), respectively. At low pH, the pigment extracts showed high stability; and gradually decreased and lost colour when the pH was increased. The greatest colour intensity (red) was obtained at pHs values less than 3.5. The anthocyanins were relatively stable during heating at temperature of 40 dan 60°C in which more than 80% of pigment could be maintained for 4 hours of heating. Heating at high temperatures (80 and 100°C) decreased the colour stability of more than 80%. Presence of oxidator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced the stability up to 73.52%. The UV and fluoresescent light exposure for 7 days also reduced the stability by 11.47% and 10.62%, respectively.

**Key words:** Anthocyanin, jambolan skin, extraction, pigment stability

### PENDAHULUAN

Buah duwet (*Syzygium cumini*) merupakan salah satu buah yang berpotensi sebagai sumber bahan pewarna alami untuk produk pangan. Kenampakan kulit buah duwet masak berwarna ungu kehitaman menunjukkan adanya kandungan antosianin. Menurut Bridle dan Timberlake (1997); Elbe dan Schwartz (1996); Francis (1989), antosianin dapat memberikan warna merah, violet, ungu, dan biru pada daun, bunga, buah, dan sayur. Lebih lanjut disebutkan dalam Anonim (2001), buah duwet mengandung antosianin yaitu sianidin, petunidin, dan malvidin ramno-glikosida.

Untuk keperluan pewarnaan produk pangan maka ekstraksi antosianin pada kulit buah duwet harus dilakukan dengan metode ekstraksi yang sesuai sehingga dapat dihasilkan rendemen yang tinggi. Metode ekstraksi antosianin telah banyak dikembangkan, antara lain dengan perlakuan asam menggunakan asam organik atau anorganik.

Pada penelitian ini dipilih pelarut netral yang tidak toksik dengan tujuan: a) tidak menimbulkan efek negatif bagi kesehatan bila nantinya diaplikasikan pada produk pangan, b) memudahkan dalam produksi dan aplikasi bahan pewarna alami, serta c) mencegah terjadinya hidrolisis (parsial atau total) pada antosianin

yang terasilasi. Pemilihan pelarut netral didasarkan pada penelitian Revilla et al., (1998) yang membandingkan beberapa prosedur ekstraksi antosianin pada anggur merah dengan menggunakan pelarut yang diasamkan dan netral. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penggunaan pelarut yang mengandung 1 % HCl 12 N untuk ekstraksi antosianin anggur merah menghasilkan hidrolisis parsial dari malvidin 3-O-asetilglukosida sehingga hal ini dapat mengubah kandungan antosianin dalam ekstrak. Penggunaan pelarut netral cukup efisien digunakan untuk mengekstrak antosianin anggur merah.

Untuk penggunaan ekstrak antosianin kulit buah duwet dalam pada pangan, maka perlu diketahui stabilitasnya selama pengolahan dan penyimpanan. Stabilitas antosianin terutama dipengaruhi oleh pH, suhu, cahaya, oksigen, asam askorbat, enzim, ion logam, gula, dan kopigmentasi. Umumnya antosianin lebih stabil dalam kondisi asam, media bebas oksigen, di dalam kondisi suhu dingin dan gelap (Nollet, 1996; Francis, 1989; Elbe dan Schwartz, 1996)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode ekstraksi yang menghasilkan rendemen antosianin tinggi dan mengetahui stabilitas antosianin yang diekstrak dari kulit buah duwet.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bahan utama adalah buah duwet yang dipetik dari pohon yang tumbuh di hutan Bondowoso, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan yaitu etanol, isopropanol, potasium klorida, sodium asetat, HCl, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (berspesifikasi pro analysis dari Merck, Jerman). Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, neraca, waring blender, pengering beku, stirer, sentrifuse, penyaring vakum, rotary vakum evaporator, vortek, water bath, pH-meter, lampu UV, lampu neon, termometer, mikropipet, dan spektrofotometer.

### Ekstraksi antosianin

Buah duwet segar diambil kulitnya dengan cara dikupas menggunakan pisau stainless steel. Kulit buah duwet (kadar air 85.08 %) diblansing selama 2 menit untuk menginaktivkan enzim polifenol oksidase. Kulit buah duwet dikecilkan ukurannya dengan cara diblender kemudian dikeringkan dengan pengering beku (*freeze drier*). Sampel kering (kadar air 10.47 %) sebanyak 9 gram diekstrak menggunakan pelarut (100 ml) selama 60 menit dengan cara diaduk (stirer). Adapun perlakuan ekstraksi terdiri dari jenis pelarut dan suhu. Pelarut yang digunakan meliputi air, etanol, isopropanol, air : etanol (1 : 1), air : isopropanol (1 : 1), etanol : isopropanol (1 : 1), dan air : etanol : isopropanol (1 : 1 : 1), sedangkan suhu ekstraksi dilakukan pada suhu dingin (5°C) dan suhu kamar (27°C). Setelah ekstraksi selesai, kemudian ekstrak disentrifuse untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat dituang ke dalam erlenmeyer dan residu diekstrak kembali dengan cara yang sama. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali sampai diperoleh warna filtrat bening yang menandakan antosianin sudah terekstrak semua. Filtrat yang dihasilkan dari 3 kali ekstraksi digabung dan disaring dengan penyaring vakum. Filtrat dievaporasi dengan vakum rotary evaporator pada suhu 40°C sampai volume filtrat sekitar 25 ml, kemudian dikeringkan dengan pengering beku. Ekstrak kering dianalisa total rendemen, konsentrasi antosianin, dan rendemen antosianin. Ekstraksi yang menghasilkan rendemen antosianin tertinggi dipilih untuk pengujian kestabilan antosianin kulit buah duwet yang meliputi stabilitas terhadap pH, suhu, oksidator, dan sinar.

### Analisis

#### Total rendemen

Total rendemen dihitung dalam persen sebagai berat ekstrak kering dibagi berat kulit buah duwet kering.

#### Konsentrasi antosianin

Konsentrasi antosianin diukur berdasarkan metode *pH-differential* (Prior et al., 1998; Giusti dan

Wrolstad, 2000). Ekstrak kering dilarutkan dalam pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan ditera sampai volume 25 ml. Sebanyak masing-masing 0.05 ml sampel dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambah larutan buffer potasium klorida (0.025 M) pH 1 sebanyak 4.95 ml dan tabung reaksi kedua ditambahkan larutan buffer sodium asetat (0.4 M) pH 4.5 sebanyak 4.95 ml. Pengaturan pH dalam pembuatan buffer potasium klorida dan sodium asetat menggunakan HCl pekat. Absorbansi dari kedua perlakuan pH diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm setelah didiamkan selama 15 menit. Nilai absorbansi dihitung dengan rumus :  $A = [(A_{520} - A_{700})_{pH 1} - (A_{520} - A_{700})_{pH 4.5}]$ . Konsentrasi antosianin dihitung sebagai sianidin-3-glikosida menggunakan koefisien ekstingsi molar sebesar 29 600 L cm<sup>-1</sup> dan berat molekul sebesar 448.8. Konsentrasi antosianin (mg/L) =  $(A \times BM \times FP \times 1000) / (\epsilon \times x)$ , dimana A adalah absorbansi, BM adalah berat molekul (448.8), FP adalah faktor pengenceran (5 ml / 0.05 ml), dan  $\epsilon$  adalah koefisien ekstingsi molar (29 600 L cm<sup>-1</sup>).

#### Rendemen antosianin

Rendemen antosianin dihitung dalam persen sebagai konsentrasi antosianin dibagi dengan konsentrasi kulit buah duwet kering (Metrieva, 1995).

#### Stabilitas terhadap pH

Untuk menguji stabilitas terhadap pH (0.5-5) digunakan larutan buffer potasium klorida (0.025 M) dan buffer sodium asetat (0.4 M). Pengaturan pH menggunakan HCl pekat. Ekstrak pekat antosianin kulit buah duwet sebanyak 15  $\mu$ l ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi larutan buffer dari pH 0.5 sampai pH 5 sebanyak masing-masing 5 ml dan didiamkan selama 15 menit. Perubahan nilai absorbansi akibat perlakuan pH diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{max}$ ) pigmen antosianin kulit buah duwet.

#### Stabilitas terhadap suhu

Ekstrak pekat antosianin kulit buah duwet sebanyak 250  $\mu$ l ditambahkan kedalam erlenmeyer yang berisi 40 ml larutan buffer potasium klorida (0.025 M) pH 1 kemudian diaduk dengan stirer hingga homogen. Campuran larutan dimasukkan ke dalam botol gelap dan diinkubasi pada suhu 40, 60, 80, dan 100°C selama 4 jam dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm setiap interval waktu 30 menit.

#### Stabilitas terhadap oksidator

Ekstrak pekat antosianin kulit buah duwet sebanyak 200  $\mu$ l dan 0.25 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 % berturut-turut ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 30 ml

larutan buffer potasium klorida (0.025 M) pH 1, kemudian diaduk dengan stirer hingga homogen. Campuran larutan dimasukkan ke dalam botol gelap dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm pada setiap waktu kontak 0, 3, 6, 9, dan 12 jam.

**Stabilitas terhadap sinar**

Ekstrak pekat antosianin kulit buah duwet sebanyak 200 µl ditambahkan dalam erlenmeyer yang berisi 30 ml larutan buffer potasium klorida (0.025 M) pH 1. Campuran larutan dimasukkan dalam botol bening dan disinari dengan sinar UV dan lampu neon (11 watt) dalam kotak gelap selama 7 hari. Pengukuran absorbansi dilakukan setiap hari dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.

**Penentuan stabilitas pigmen antosianin**

Stabilitas pigmen antosianin dinyatakan sebagai % etensi warna yang dihitung menggunakan rumus :  $B/A \times 100\%$ , dimana A adalah nilai absorbansi sebelum perlakuan dan B adalah nilai absorbansi setelah perlakuan.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Ekstraksi antosianin**

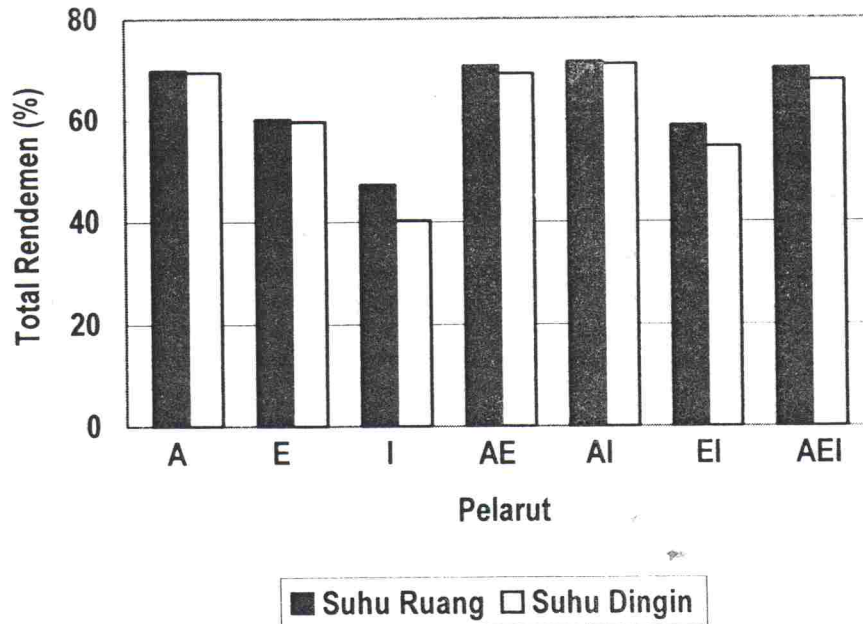
**Total rendemen**

Total rendemen menunjukkan kandungan dari semua zat-zat yang terkandung dalam kulit buah duwet yang mampu terekstrak oleh pelarut seperti lemak, protein, karbohidrat, serat, abu, vitamin, fenol, tanin, dan zat-zat lainnya termasuk juga antosianin.

Hasil penelitian diperoleh nilai total rendemen tertinggi sebesar 71.54 % pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut kombinasi air dan isopropanol pada suhu ruang, sedangkan total rendemen terendah diperoleh pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut isopropanol pada suhu dingin sebesar 40.25 %. Pada ekstraksi menggunakan pelarut air, air : etanol, air : isopropanol, dan air : etanol : isopropanol menunjukkan nilai total rendemen yang hampir sama pada kisaran nilai 69 – 71 % (Gambar 1).

**Konsentrasi antosianin**

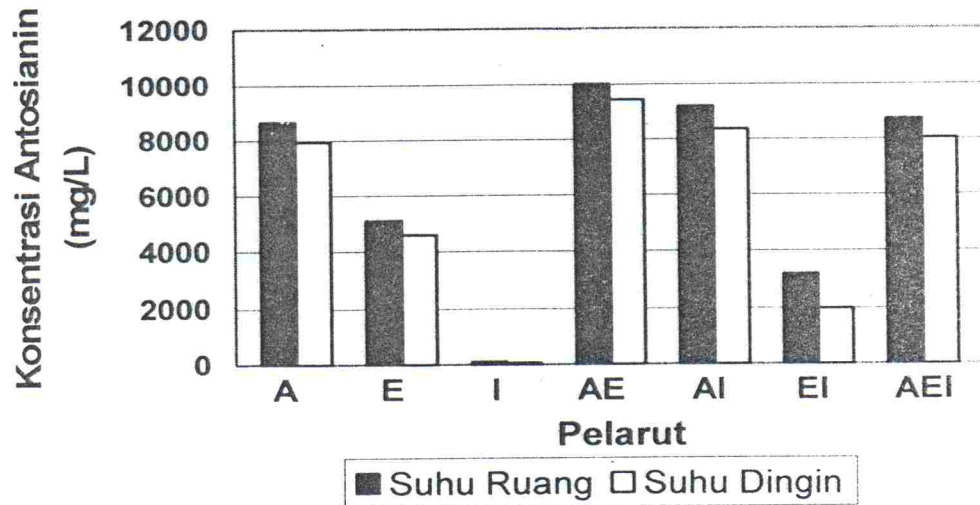
Konsentrasi antosianin dalam kulit buah duwet pada berbagai jenis pelarut dan suhu ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 2.



Keterangan:

A = air, E = etanol, I = isopropanol, AE = air:etanol, AI = air:isopropanol, EI = etanol:isopropanol, AEI = air:etanol:isopropanol

Gambar 1. Pengaruh jenis pelarut dan kondisi suhu selama ekstraksi terhadap total rendemen



Gambar 2. Pengaruh jenis pelarut dan kondisi suhu selama ekstraksi terhadap konsentrasi antosianin

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi antosianin tertinggi terdapat pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut kombinasi air dan etanol pada suhu ruang yaitu sebesar 10 007.03 mg/L, diikuti dengan pelarut kombinasi air : isopropanol, air : etanol : isopropanol, dan air. Penelitian Saati et al., (2002) juga mendapatkan hasil yang sama, dimana ekstraksi antosianin pada bunga pacar air (*Impatiens balsamina Linn*) dengan menggunakan pelarut etanol (95 %) yang ditambah aquades dan HCl 1 N (5 : 4 : 1) menunjukkan kadar antosianin tertinggi ( 5.35 mg/100 ml), diikuti dengan ekstraksi menggunakan pelarut campuran isopropanol dan air yang diasamkan dengan HCl 1 N (5.08 mg/100 ml). Kadar antosianin terendah pada bunga pacar air didapatkan pada diekstraksi dengan menggunakan pelarut aquades dan HCl 1 N (4.27 mg/100 ml).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa ekstraksi menggunakan pelarut air dan pelarut yang dikombinasikan dengan air menunjukkan konsentrasi antosianin yang lebih tinggi dibandingkan ekstraksi dengan pelarut etanol, isopropanol, dan kombinasi etanol-isopropanol. Hal ini dikarenakan dengan adanya kombinasi dengan pelarut air dapat meningkatkan polaritas. Sifat kepolaran pelarut berpengaruh pada konsentrasi antosianin yang terekstrak. Semakin polar pelarut maka konsentrasi antosianin semakin tinggi dan sebaliknya. Menurut Bridle dan Timberlake (1997), antosianin merupakan pewarna alami yang berasal dari famili flavonoid yang larut dalam air (*water soluble*). Di dalam tumbuhan, antosianin selalu terdapat sebagai glikosida (Robinson, 1991). Sebagai glikosida, antosianin larut dalam air, tetapi setelah mengalami

hidrolisis maka bentuk non glikosidanya (antosianidin) kurang larut dalam air (Wijaya et al., 2001). Pada ekstraksi menggunakan pelarut isopropanol diperoleh konsentrasi antosianin terendah, karena isopropanol termasuk dalam pelarut agak non polar sehingga isopropanol kurang mampu melarutkan antosianin.

Untuk mengetahui pengaruh suhu selama ekstraksi terhadap konsentrasi antosianin maka dilakukan ekstraksi pada suhu dingin (5°C) dan ruang (27°C). Perbedaan suhu ekstraksi dapat mengakibatkan perbedaan kecepatan kelarutan komponen dalam kulit buah duwet dan kemudahan antosianin teroksidasi. Pada Gambar 1 dan 2 terlihat bahwa ekstraksi pada suhu ruang menghasilkan total rendemen dan konsentrasi antosianin lebih tinggi dibandingkan dengan ekstraksi pada suhu dingin. Hal ini disebabkan pada suhu dingin kecepatan terlarutnya komponen-komponen dalam kulit buah duwet termasuk antosianin tidak secepat pada suhu kamar. Menurut Geankoplis (1983), semakin tinggi suhu ekstraksi maka kecepatan perpindahan massa dari solut ke solven akan semakin tinggi karena suhu mempengaruhi nilai koefisien transfer massa dari suatu komponen.

**Rendemen antosianin**

Nilai rendemen antosianin kulit buah duwet sangat kecil bila dibandingkan dengan total rendemen. Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa rendemen antosianin tertinggi sebesar 2.78 % pada ekstraksi menggunakan pelarut kombinasi air dan etanol pada suhu ruang, sedangkan rendemen antosianin terendah ditunjukkan pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut isopropanol pada suhu dingin sebesar 0.02 %.

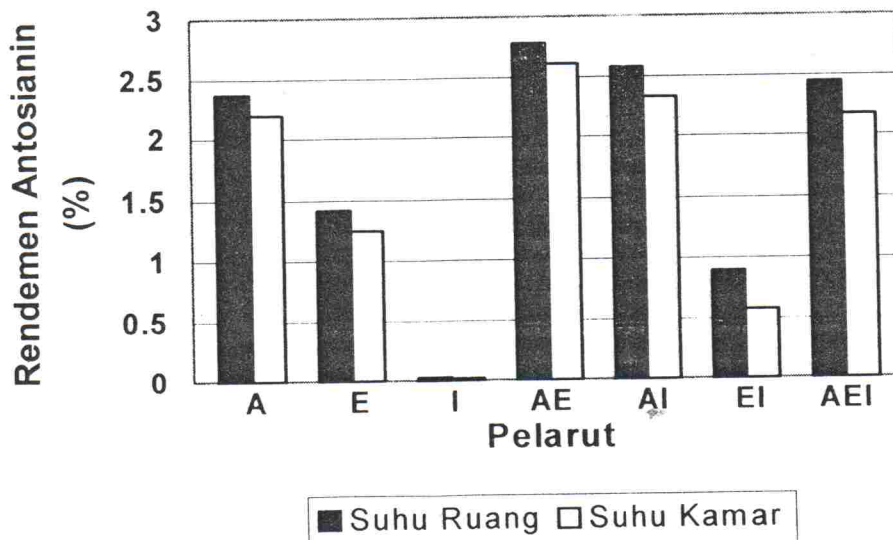
Nilai rendemen antosianin hasil penelitian ini sangat jauh berbeda dengan rendemen antosianin pada bunga pacar air dan kulit buah rambutan. Kisaran rata-rata rendemen antosianin pada bunga pacar air diperoleh sebesar 17.07 – 25.43 % (Saati, 2002) dan rendemen antosianin pada kulit buah rambutan berkisar antara 6.41 – 13.67 % (Wijaya et al., 2001).

**Stabilitas warna antosianin**

**Stabilitas terhadap pH**

Stabilitas warna antosianin kulit buah duwet terhadap pengaruh pH dapat dilihat pada Gambar 4. Pada Gambar 4 terlihat bahwa intensitas warna yang ditunjukkan oleh nilai absorbansi sangat dipengaruhi oleh nilai pH, semakin tinggi nilai pH maka intensitas warna merah semakin menurun. Nilai absorbansi mengalami penurunan secara tajam sampai pH 3.5, kemudian nilai absorbansi cenderung stabil sampai pH 5. Pada pH 3.5 – 5 terlihat nilai absorbansi sangat kecil yang menunjukkan warna merah antosianin semakin menghilang. Perubahan warna akibat pengaruh pH terjadi karena adanya degradasi warna dari antosianin yang disebabkan oleh kation flavilium yang berwarna merah menjadi basa karbinol dan akhirnya menjadi kalkon yang tidak berwarna. Pada pH rendah sebagian besar antosianin terdapat dalam bentuk kation flavilium

yang berwarna merah, sedangkan senyawa basa karbinol dan kalkon yang tidak berwarna relatif kecil jumlahnya. Semakin meningkatnya pH akan semakin banyak terbentuk senyawa basa karbinol dan kalkon yang menyebabkan tidak berwarna. Menurut Nollet (1996) dan Elbe dan Schwartz (1996), dalam medium cair, antosianin mengalami perubahan struktur (*reversible*) tergantung dari pH. Empat struktur antosianin yang terdapat dalam kondisi kesetimbangan adalah basa quinodal (biru), kation flavilium (merah), karbinol (tidak berwarna), dan kalkon (tidak berwarna). Pada media sangat asam (pH dibawah 2), kation flavilium yang berwarna merah mendominasi, sedangkan pada kondisi tingkat keasaman yang lemah, netral, dan basa maka karbinol dan basa quinodal mendominasi kation flavilium sehingga warna menjadi memudar (tidak berwarna) dan warna berubah dari merah ke biru. Shi dan Francis (1992) juga mengemukakan bahwa warna antosianin sangat sensitif kestabilannya terhadap beberapa faktor salah satunya dipengaruhi oleh kondisi pH. Di dalam larutan dengan pH rendah antara 1-4 (asam) pigmen antosianin akan berwarna merah atau semakin mendekati satu maka pigmen semakin stabil, sedangkan pada pH yang tinggi lebih dari 4 maka akan mulai terjadi perubahan warna sehingga antosianin menjadi tidak berwarna.



Keterangan:

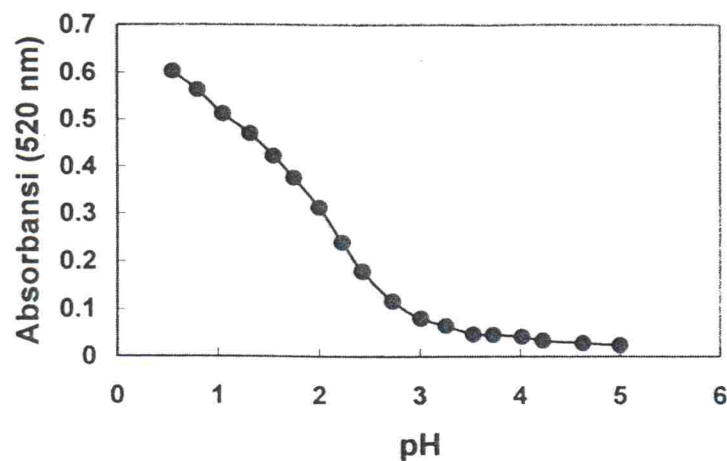
A = air, E = etanol, I = isopropanol, AE = air:etanol, AI = air:isopropanol, EI = etanol:isopropanol, AEI = air:etanol:isopropanol

Gambar 3. Pengaruh jenis pelarut dan kondisi suhu selama ekstraksi terhadap rendemen antosianin

# Karakterisasi Dan Produksi Zat Warna Alami Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* Linn) Serta Aplikasinya Pada Minuman Fungsional Rempah-Rempah

**Abstrak** Kayu secang telah lama dikenal menghasilkan warna merah jika direbus dalam air panas dan telah digunakan untuk mewarnai minuman dan kain. Untuk dapat memproduksi pigmen merah alami dari kayu secang, maka perlu dilakukan karakterisasi terutama dari segi kestabilan pigmen secang tersebut terhadap faktor-faktor yang berpengaruh selama proses pengolahan maupun penyimpanan. Selain itu salah satu syarat penggunaan pewarna makanan adalah tidak toksis dan antikarsinogenik. Penelitian ini bertujuan melakukan (1) karakterisasi pigmen alami kayu secang terutama kestabilannya terhadap berbagai faktor yang berpengaruh pada proses pengolahan; (2) karakterisasi aktivitas biologis ekstrak pigmen terutama pengaruhnya terhadap proliferasi sel limfosit dan sel kanker k-562; (3) enkapsulasi dan produksi pigmen dalam bentuk bubuk dengan metode spray dry dan ko-kristalisasi dan (4) uji coba aplikasi pigmen alami secang pada pembuatan minuman fungsional, kue basah dan permen. Pigmen alami kayu secang (*Caesalpinia sappan*) dipengaruhi oleh tingkat keasaman. Pada suasana asam (pH 2-4) berwarna kuning sedangkan pada suasana netral dan alkali (pH 6-8) berwarna merah keunguan. Degradasi termal pigmen secang mengikuti kinetika reaksi ordo pertama dengan laju degradasi (k) pada suhu 40 C adalah  $3.86 \times 10^{-3}$ , dan pada suhu 60 dan 100 derajat C masing-masing adalah sebesar  $4.24 \times 10^{-3}$  dan  $5.26 \times 10^{-3}$ . Proses Pengawetan sterilisasi dan penyimpanan pada suhu dingin mampu menghambat laju degradasi pigmen dibandingkan dengan proses pasteurisasi dan penyimpanan pada suhu ruang. Konstanta laju reaksi (k) pada suhu refrigerator (8-10 C) adalah sebesar  $2.93 \times 10^{-5}$ , sedangkan pada suhu kamar (28-30 derajat C) adalah  $9.15 \times 10^{-5}$ . Pigmen secang menunjukkan ketidakstabilan pada perlakuan sinar UV dan metal (Fe, Cu, Zn dan Cu). Akan tetapi pigmen secang tidak begitu terpengaruh dengan adanya oksidator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan reduktor Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ekstrak pigmen secang mampu meningkatkan aktivitas proliferasi sel limfosit dengan nilai indeks stimulasi diatas 1. Selain itu pigmen secang tidak bersifat toksik karena tidak membunuh sel limfosit bahkan pada konsentrasi 20 kali lebih besar dari konsumsi normal. Hasil pengujian terhadap sel kanker K-562 menunjukkan ekstrak secang memiliki sifat menurunkan proliferasi sel pada konsentrasi rendah (1/10x) sedangkan pada konsentrasi tinggi dapat meningkatkan proliferasi sel. Perbedaan proses enkapsulasi pigmen secang menghasilkan larutan dengan karakter warna yang berbeda. Proses enkapsulasi dengan metode spray dry menghasilkan larutan dengan warna merah, sedangkan proses kokristalisasi menghasilkan larutan dengan warna merah keunguan sampai ungu. Metode spray dry menghasilkan produk dengan karakter warna yang lebih baik dibandingkan dengan metode kokristalisasi. Penambahan bubuk secang dalam formulasi minuman rempah mampu meningkatkan penerimaan panelis karena warna yang dihasilkan lebih menarik. Akan tetapi penambahan bubuk secang tidak menunjukkan efek sinergis aktivitas antioksidan terhadap jahe maupun pala. Akan tetapi aktivitas antioksidan dari minuman yang diformulasikan masih lebih tinggi dari aktivitas antioksidan sintetis (BHT). Aplikasi pewarna alami secang pada makanan basah sangat dipengaruhi oleh jenis adonan yang digunakan. Warna merah akan tampak pada penggunaan adonan berbasis pati (tapioka, maizena atau tepung sagu). Sedangkan aplikasi pada hard candy menghasilkan warna kuning pada produk akhir.

<b>Keywords</b>	Kayu Secang, <i>Caesalpinia Sappan</i> Linn, Rempah-Rempah
<b>Lokasi Penelitian</b>	
<b>Bidang Ilmu</b>	
<b>Tahun Penulisan</b>	2003
<b>Pelaksana Penelitian</b>	Anatomi - FKH
<b>Sumberdana</b>	DIKTI
<b>Jenis Penelitian</b>	HB
<b>No. Panggil</b>	HB/002.03/ADA/k
<b>Peneliti Utama</b>	Dede Robiatul Adawiyah



Gambar 4. Stabilitas warna antosianin kulit buah duwet terhadap pengaruh pH

Hasil yang sama juga ditunjukkan dari penelitian yang dilakukan Francis (1977) dalam Elbe dan Schwartz (1996) pada antosianin cranberry, dimana perubahan nilai pH dapat menyebabkan perubahan warna. Pada sekitar pH 1, antosianin cranberry menunjukkan intensitas warna paling bagus sedangkan pada pH 4.5, antosianin cranberry mendekati tidak berwarna (sedikit biru). Penelitian dari Wijaya et al., (2001) juga menyebutkan bahwa intensitas warna dari ekstrak pigmen kulit buah rambutan sangat dipengaruhi oleh nilai pH. Pada pH 3 dan 4 masih menampilkan peak maksimum, sedangkan pada pH 5 tidak terdapat peak maksimumnya yang menunjukkan hilangnya warna merah antosianin.

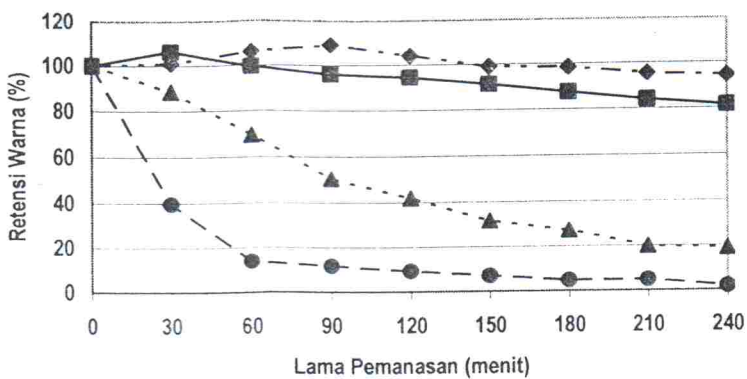
#### Stabilitas terhadap suhu

Untuk melihat stabilitas warna antosianin kulit buah duwet terhadap pengaruh suhu maka dilakukan pemanasan ekstrak antosianin pada suhu 40, 60, 80, dan 100°C selama 4 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara keseluruhan antosianin mengalami kerusakan dengan semakin meningkatnya suhu dan bertambahnya waktu pemanasan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penurunan nilai retensi warna (%) (Gambar 5). Pada pemanasan suhu 40 dan 60°C (suhu medium), penurunan nilai retensi warna tidak terlalu besar dibandingkan pada pemanasan suhu 80 dan 100°C (suhu tinggi). Pada perlakuan pemanasan suhu 100°C mengalami penurunan nilai retensi warna yang paling tinggi hingga dibawah 20 % pada interval waktu 60 – 240 menit.

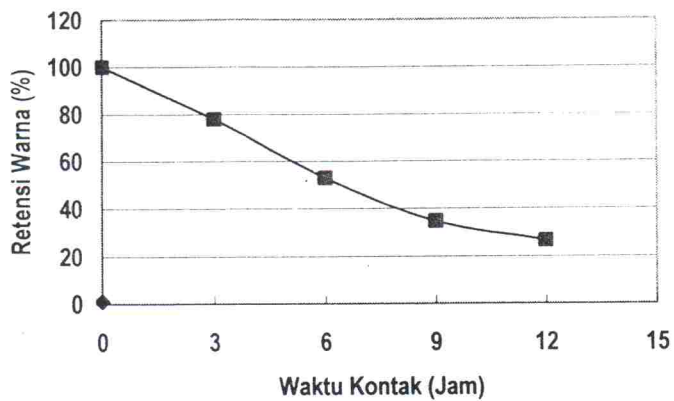
Hasil penelitian Hanum (2000) juga menunjukkan bahwa pemanasan pada suhu 100°C selama 8 jam secara terus menerus dapat menurunkan stabilitas antosianin dari katul beras ketan hitam.

Wijaya et al., (2001) juga melaporkan terjadinya penurunan nilai peak absorbansi dengan makin meningkatnya suhu yang digunakan. Hal ini menunjukkan stabilitas yang semakin menurun dengan semakin meningkatnya suhu pemanasan.

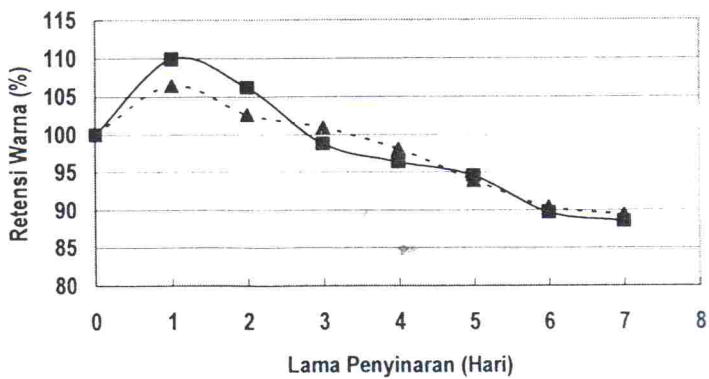
Antosianin sangat sensitif terhadap proses termal yang dapat menyebabkan kehilangan warna merah dan terjadinya peningkatan warna coklat sebagai hasil dari degradasi dan polimerisasi pigmen. Mekanisme pasti dari degradasi termal pada antosianin belum sepenuhnya dapat dijelaskan, tetapi kemungkinan degradasi warna dari antosianin disebabkan oleh berubahnya kation flavilium yang berwarna merah menjadi basa karbinol dan akhirnya menjadi kalkon yang tidak berwarna dan berakhir pada produk degradasi berwarna coklat. Menurut Elbe dan Schwartz (1996), panas mengubah kesetimbangan terhadap kalkon yang tidak berwarna. Brouillard (1982) juga mengemukakan bahwa temperatur tinggi mengubah kation flavilium ke formasi kalkon. Setelah cincin terbuka, degradasi berlanjut ke produk berwarna coklat. Penelitian dari Hrazdina (1971) dalam Francis (1989) menyebutkan bahwa kaumarin merupakan produk degradasi dari pigmen antosianin anggur. Lebih lanjut dijelaskan oleh Elbe dan Schwartz (1996), kaumarin adalah produk degradasi umum untuk antosianin dimana mekanismenya adalah kation flavilium pertama kali ditransformasikan ke basa quinodal kemudian ke beberapa struktur intermediat dan akhirnya ke derivatif kaumarin.



Gambar 5. Stabilitas warna antosianin kulit buah duwet terhadap pengaruh suhu dan lama pemanasan.  
● = suhu 100°C, ▲ = suhu 80°C, ■ = suhu 60°C, ◆ = suhu 40°C



Gambar 6. Stabilitas warna antosianin kulit buah duwet terhadap oksidator



Keterangan :

▲ = sinar lampu neon, ■ = sinar UV

Gambar 7. Stabilitas warna antosianin kulit buah duwet terhadap penyinaran



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SUJI (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown)**[Antioxidant Activity of Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) Leaf Extract]**Endang Prangdimurti, Deddy Muchtadi, Made Astawan dan Fransiska R. Zakaria**

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan FATETA IPB

Diterima 20 September 2006 / Disetujui 10 Oktober 2006

**ABSTRACT**

Numerous studies showed that chlorophyll and its derivatives had antioxidant activity. This research was conducted to obtain the chlorophyll-rich suji leaf liquid extract (SLE) and then to investigate the oral administration this extract on the antioxidant status by means of animal study. The use of Tween 80 0.75% in sodium citrate 12 mM solution as an extraction solution combined with 30 minutes incubation time at 70-75°C increased significantly the total chlorophylls content, the water-soluble chlorophylls content and the antioxidant activity of the yielded extract, compared to the suji leaf water-only extract. Two-months oral administration of SLE to male Sprague Dawley rats showed that the liver malondialdehyde (MDA) level significantly decreased, and the liver catalase and superoxide dismutase antioxidant enzyme activities significantly increased compared to the control group. This study suggested that the chlorophyll content in SLE might increase the antioxidant status of animal tested.

**Key words :** suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown), chlorophyll, antioxidant

**PENDAHULUAN**

Peningkatan konsumsi fitokimia yang memiliki aktivitas antioksidan dapat menekan timbulnya penyakit-penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, kanker, dan diabetes mellitus. Berbeda dengan senyawa fitokimia lain, seperti komponen fenolik, klorofil terdapat dalam jumlah banyak dalam tanaman yaitu rata-rata 1% berat kering, sehingga sangat berpotensi dikembangkan sebagai suplemen pangan atau pangan fungsional. Klorofil alami (seperti klorofil-a dan klorofil-b) bersifat lipofilik karena keberadaan gugus fitolnya ( $C_{20}H_{39}OH$ ). Hidrolisis terhadap gugus tersebut akan mengubah klorofil menjadi turunannya yang larut air, seperti klorofilid dan klorofilin. Klorofil dan beberapa turunannya menunjukkan kemampuan antioksidatif secara *in vitro* dan *ex vivo*. Endo et al., (1985) menyebutkan bahwa jika klorofil dioksidasi dalam sistem metil linoleat akan dihasilkan radikal  $\pi$ -kation dari klorofil yang dapat membentuk kompleks dengan radikal peroksi, kemudian dihasilkan produk yang stabil. Klorofilin memiliki kemampuan sebagai *radical scavenger* terhadap  $^{\bullet}OH$ ,  $ROO^{\bullet}$ ,  $^{\bullet}O_2$  dan  $H_2O_2$  dengan konstanta masing-masing sebesar  $6.1 \pm 0.4 \times 10^9$ ,  $5.0 \pm 1.3 \times 10^7$ ,  $1.3 \times 10^8$ ,  $2.7 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$  (Kumar et al., 2001; Kamat et al., 2000).

Sebelum adanya laporan Egner et al., (2000), klorofil dianggap tidak diserap oleh tubuh. Mereka adalah yang pertama kali menemukan adanya turunan klorofil dalam serum manusia yang berwarna hijau setelah pemberian klorofilin dengan dosis  $3 \times 100$  mg/hari selama

4 bulan. Pengujian secara *in vitro* menggunakan sel Caco-2 (*human intestinal cell line*), menunjukkan bahwa penyerapan klorofil yang lipofil sebesar 5-10% (Ferruzzi et al., 2001), sedangkan klorofilin sebesar 45-60% (Ferruzzi et al., 2002a). Klorofilid maupun klorofilin memiliki aktivitas menangkap radikal bebas yang lebih tinggi dibandingkan klorofil yang masih mengandung gugus fitol (Ferruzzi et al., 2002b). Oleh karena itu upaya menghidrolisis gugus fitol klorofil agar diperoleh klorofil yang larut air diduga dapat meningkatkan manfaat klorofil bagi kesehatan tubuh. Hidrolisis dapat dilakukan menggunakan asam, alkali atau enzim klorofilase.

Saat ini semakin banyak beredar produk impor suplemen pangan kaya klorofil, padahal dilihat dari segi geografis Indonesia memiliki potensi sumber klorofil yang besar. Salah satunya adalah daun suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) yang sejak dahulu digunakan sebagai sumber pewarna hijau alami untuk pangan. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian untuk meningkatkan manfaat daun suji, khususnya dalam meningkatkan status antioksidatif tubuh.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan ekstrak cair daun suji kaya klorofil dan menguji aktivitas antioksidannya secara *in vivo*.

**METODOLOGI****Bahan**

Daun suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) yang digunakan berasal dari satu lokal di daerah

perumahan dosen IPB Darmaga Bogor. Daun yang digunakan adalah daun tua, yaitu 7-10 helai di bawah pucuk daun. Untuk pembuatan ekstrak digunakan Tween 80 (Sigma Co.), trinitrium sitrat dihidrat,  $\text{NaHCO}_3$ . Sebagai pembanding ekstrak daun suji digunakan klorofilin (*Sodium Copper Chlorophyllin/SCC*, Sigma Co.). Untuk studi *in vivo*, digunakan tikus jenis *Sprague Dawley* jantan umur 2 bulan dari Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) Jakarta. Untuk simulasi pencernaan *in vitro* digunakan pepsin (P-7000), pankreatin (P-1750) dan ekstrak bile (B-8631) dari Sigma Co., lipase (NOVO), dan kantung dialisis 6000-8000 MWCO (Spectrapor). Untuk analisis digunakan antara lain *1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl* (DPPH), xantin oksidase (*Grade IV*, dari susu sapi), xantin, *nitroblue tetrazolium* (NBT), *phosphat buffer saline* (PBS), tetraetoksipropana (TEP), asam tiobarbiturat (TBA), asam trikloroasetat (TCA),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aseton, petroleum eter.

## Metode penelitian

### Penentuan prosedur ekstraksi daun suji

Penentuan prosedur ekstraksi daun suji yang digunakan difokuskan pada jenis larutan pengeksrak yang digunakan dan lama inkubasi yang diterapkan untuk menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan dan kadar klorofil yang terbaik. Ada 6 jenis larutan pengeksrak yang digunakan yaitu  $\text{NaHCO}_3$  0.5%, Na-sitrat 12 mM dan akuades, masing-masing dengan maupun tanpa penambahan Tween 80 1% (b/v). Pembuatan ekstrak daun suji mengikuti prosedur umum berikut ini. Daun suji yang telah dicuci dan dipotong-potong, dihancurkan dengan larutan pengeksrak (1:10, b/v). Setelah diinkubasi pada 70-75°C selama 60 menit, dilakukan penyaringan dengan kain batis 2 lapis dan disentrifugasi 600xg selama 10 menit untuk membuang padatan. Supernatan (ekstrak) yang diperoleh kemudian diblansir dalam air mendidih selama 1 menit. Untuk meminimalkan kerusakan klorofil, ekstraksi dilakukan dalam cahaya redup.

Tahap selanjutnya adalah penentuan konsentrasi Tween 80 yang ditambahkan ke dalam larutan pengeksrak terpilih (0.25, 0.5, 0.75, dan 1.0%; b/v) serta proses inkubasi yang diberikan (tanpa diinkubasi, diinkubasi selama 0, 30, dan 60 menit pada 70-75°C). Inkubasi 0 menit adalah saat pertama kali ekstrak mencapai suhu 70°C. Inkubasi ditujukan untuk memberi kesempatan klorofilase suji bekerja.

### Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak

Analisis dilakukan berdasarkan metode Kubo et al., (2002) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 1 ml buffer asetat 100 mM (pH 5.5), 1.87 ml metanol, dan 0.1 ml DPPH 3 mM dalam metanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Larutan DPPH dibuat segar setiap akan digunakan. Selanjutnya, sebanyak 0.03 ml larutan sampel ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan diinkubasi 25°C selama 20 menit. Absorbansi yang

dihasilkan dibaca pada 517 nm. Sebagai larutan blanko, digunakan 0.03 ml akuades sebagai pengganti larutan sampel. Semakin banyak radikal DPPH yang dinetralisir ditunjukkan oleh semakin pudarnya warna campuran reaksi atau semakin besarnya selisih absorbansi terhadap larutan blanko. Aktivitas antioksidan (%) =  $(1 - \text{Absorbansi sampel} / \text{Absorbansi blanko}) \times 100\%$ .

### Analisis kadar klorofil ekstrak

Pengukuran kadar total klorofil dan klorofil larut air dalam ekstrak dilakukan dengan mengikuti prinsip Gross (1991). Sejumlah ekstrak (1,5 ml) dicampur dengan 8,5 ml aseton 99.5%, kemudian dibiarkan selama 1 malam dalam refrigerator. Selanjutnya campuran disentrifus 600xg selama 10 menit. Untuk menganalisis kadar total klorofil, supernatan yang diperoleh diukur absorbansinya pada 645 dan 663 nm atau pada 652 nm. Untuk mengukur kadar klorofil larut air, sebagian supernatan (3 ml) dicampur dengan 6 ml petroleum eter dan 0.2 ml air deionisasi, kemudian divorteks dan disentrifus. Klorofil larut air atau yang bersifat hidrofilik akan berada pada lapisan aseton (bawah), untuk selanjutnya diukur absorbansinya. Perhitungan kadar klorofil dilakukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Kadar klorofil (mg/L)} = 20.2 A_{645.0 \text{ nm}} + 8.02 A_{663.0 \text{ nm}}$$

atau

$$\text{Kadar klorofil (mg/L)} = \frac{1000 A_{652 \text{ nm}}}{34.5}$$

### Estimasi tingkat penyerapan klorofil menggunakan sistem pencernaan *in vitro*

Larutan yang diujikan yaitu ekstrak daun suji terpilih dan larutan klorofilin (SCC) sebagai pembanding. Sebelum pengujian dilakukan penyetaraan kadar klorofil larutan uji.

Sistem pencernaan *in vitro* mengadopsi prosedur Ferruzzi et al., (2001). Fase lambung (*gastric*) dilakukan dengan menginkubasi larutan uji dengan pepsin (1.6 mg/ml) selama 1 jam dalam penangas air bergoyang 37°C. Larutan uji sebelumnya telah diatur menjadi pH 2 menggunakan HCl 4 N. Selanjutnya, ke dalam larutan uji dimasukkan kantung dialisis berisi  $\text{NaHCO}_3$  0.5M. Setelah tercapai pH 7, inkubasi fase usus halus dimulai dengan menambahkan campuran pankreatin (0.2 mg/ml), ekstrak empedu (1.25 mg/ml) dan lipase (0.1 mg/ml). Setelah 2 jam inkubasi, kantung dialisis diangkat dan dibilas, kemudian isi kantung (dialisat) diukur volumenya. Pengukuran kadar klorofil terlarut dilakukan pada fraksi awal, fraksi lambung (*gastric*), fraksi digesta (luar kantung) dan fraksi dialisat (isi kantung). Tingkat penyerapan klorofil (%) diestimasi dari kadar klorofil fraksi dialisat per-kadar klorofil fraksi awal, lalu dikalikan 100. Data ini selanjutnya digunakan dalam perhitungan dosis pengujian secara *in vivo*.

**Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan tikus percobaan**

Tikus yang digunakan terlebih dahulu diadaptasikan selama 1 minggu. Setelah itu, tikus (berat rata-rata 220 g) dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok yang diberi: (1) ekstrak daun suji, (2) larutan klorofilin, dan (3) akuades (sebagai kontrol). Dosis per-hari yang diberikan setara dengan 20 mg klorofil/kg BB untuk kelompok suji, dan 6.6 mg SCC/kg BB untuk kelompok SCC. Ransum yang diberikan adalah ransum basal dengan sumber protein kasein 10% mengikuti AOAC (1984) diberikan *ad libitum*. Setelah 2 bulan masa perlakuan, tikus masing-masing kelompok (N=7) dietanasi untuk dianalisis kadar MDA (malondialdehida) hati, aktivitas katalase hati, dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) hati.

*Preparasi sampel hati*

Preparasi sampel dari organ hati dilakukan mengikuti metode Singh et al., (2002). Sebanyak 1.25 g hati dicacah dalam kondisi dingin dalam 5 ml larutan PBS (*phosphat buffer saline*) yang mengandung 11,5 g/L KCl. Homogenat yang dihasilkan kemudian disentrifus 1074xg hingga diperoleh supernatan jernih. Supernatan selanjutnya digunakan untuk pengukuran kadar MDA, aktivitas SOD dan katalase.

*Pengukuran kadar MDA*

Pengukuran kadar MDA dilakukan mengikuti prosedur Singh et al. (2002). Sebanyak 0.5 ml supernatan hati ditambah 2.0 ml HCl dingin (0.25 N) yang mengandung 15% TCA, 0.38% TBA dan 0.5% BHT. Campuran dipanaskan 80°C selama 1 jam. Setelah dingin, campuran disentrifus 822xg selama 10 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 532 nm. Sebagai larutan standar digunakan TEP.

*Pengukuran aktivitas SOD*

Pengukuran dilakukan dengan mengikuti prosedur Kubo et al. (2002) dan Wijeratne et al. (2005) dengan sedikit modifikasi. Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas menangkap radikal anion superoksida. Anion superoksida dihasilkan secara enzimatis oleh sistem xantin-xantin oksidase. Sebanyak 0.06 ml supernatan hati direaksikan dengan campuran yang terdiri dari 2.70 ml bufer Natrium-karbonat yang

mengandung 0.1 mM EDTA (pH 10), 0.06 ml xantin 10 mM, 0.03 ml *bovine serum albumin* (BSA) 0.5%, 0.03 ml NBT 2.5 mM. Selanjutnya dilakukan penambahan xantin oksidase (0.04 units). Absorbansi yang dihasilkan setelah 30 menit diukur pada panjang gelombang 560 nm. Sebagai kontrol digunakan larutan yang dipakai dalam preparasi sampel hati (yaitu PBS yang mengandung 11.5 g/L KCl). Aktivitas SOD (%) dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:  $[1 - (A/B)] \times 100$ , dimana A= absorbansi larutan sampel, B= absorbansi larutan kontrol.

*Pengukuran aktivitas katalase*

Pengukuran dilakukan dengan mengikuti prosedur Iwai et al. (2002). Aktivitas katalase diukur berdasarkan besarnya reduksi hidrogen peroksida. Dalam kuvet kuarsa, sebanyak 0.5 ml supernatan hati ditambahkan ke dalam 2.0 ml bufer kalium fosfat (pH 7.0) yang mengandung 10 mM hidrogen peroksida. Perubahan absorbansi pada 240 nm dicatat setiap 15 detik selama 1 menit. Aktivitas katalase dihitung dengan menggunakan data kemiringan (*slope*) kurva absorbansi larutan sampel (SL) maupun larutan blanko (SLb) mengikuti rumus berikut ini :

$$\text{Aktivitas katalase (U/ml)} = \frac{(SL - SLb) \times 2.5}{0.0436 \times 0.5}$$

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Penentuan prosedur ekstraksi daun suji**

Ekstrak daun suji yang diinginkan adalah ekstrak cair yang memiliki aktivitas antioksidan, kadar total klorofil dan kadar klorofil larut air yang tinggi. Skrining terdahulu terhadap beberapa larutan pengeksrak, yaitu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1-0.5%), NaHCO<sub>3</sub> (0.1-0.5%), Na-sitrat 12 mM menunjukkan bahwa penggunaan larutan pengeksrak NaHCO<sub>3</sub> 0.5% dan Na-sitrat 12 mM menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan, kadar total klorofil, dan kadar klorofil larut air yang baik (Prangdimurti et al., 2005). Oleh karena itu untuk selanjutnya dicobakan 6 jenis larutan yaitu NaHCO<sub>3</sub> 0.5%, Na-sitrat 12 mM dan akuades, masing-masing dengan maupun tanpa penambahan Tween 80 1% (b/v). Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh jenis larutan pengeksrak terhadap nilai rata-rata aktivitas antioksidan, kadar total klorofil, dan kadar klorofil larut air dari ekstrak daun suji yang dihasilkan

Larutan pengeksrak	Aktivitas antioksidan (%)	Kadar total klorofil (mg/10 ml)	Kadar klorofil larut air (mg/10 ml)
Akuades	1.74 <sup>a</sup>	1.487 <sup>a</sup>	0.091 <sup>a</sup>
Akuades + Tween 80 1%	8.74 <sup>b</sup>	2.540 <sup>b</sup>	0.509 <sup>bc</sup>
Na-sitrat 12 mM	8.07 <sup>b</sup>	2.478 <sup>b</sup>	0.129 <sup>ab</sup>
Na-sitrat 12 mM + Tween 80 1%	14.13 <sup>c</sup>	2.586 <sup>b</sup>	0.670 <sup>c</sup>
NaHCO <sub>3</sub> 0.5%	12.11 <sup>bc</sup>	2.575 <sup>b</sup>	0.258 <sup>ab</sup>
NaHCO <sub>3</sub> 0.5% + Tween 80 1%	11.94 <sup>bc</sup>	2.606 <sup>b</sup>	0.770 <sup>c</sup>

Ket. : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (p<0.05).

Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan Tween 80 1% ke dalam larutan pengestrak meningkatkan aktivitas antioksidan (aktivitas menangkap radikal DPPH) dari ekstrak akuades dan ekstrak Na-sitrat, meningkatkan kadar klorofil larut air dari ketiga ekstrak, serta meningkatkan kadar total klorofil dari ekstrak akuades. Penggunaan larutan pengestrak Tween 80 1% dalam Na-sitrat 12 mM menghasilkan aktivitas antioksidan ekstrak yang paling tinggi, serta pH ekstrak yang mendekati netral (sekitar 6.6), sehingga terpilih untuk digunakan pada tahap berikutnya.

Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat) merupakan surfaktan atau deterjen non ionik dan termasuk dalam bahan tambahan pangan kelas polisorbat. Penggunaan Tween 80 dalam ekstraksi klorofil dapat menekan pembentukan feofitin dibandingkan deterjen anionik (Vargas dan Lopez, 2003). Tween 80 dapat membantu klorofil lipofil teremulsi di dalam air dan mempermudah kontak dengan enzim klorofilase. Klorofilase bekerja menghidrolisis gugus fitol klorofil sehingga mengubahnya menjadi klorofilid yang larut air.

Na-sitrat 12 mM dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas klorofilase (Lopez et al., 1992). Larutan pengestrak Tween 80 1% dalam Na-sitrat 12 mM memiliki pH 7.65, yaitu mendekati pH optimum klorofilase daun suji (pH 7.4) (Sibarani, 1994). Kondisi tersebut menyebabkan lebih banyak klorofil larut air yang terbentuk. Penggunaan suhu inkubasi sebesar 70°C adalah berdasarkan pertimbangan bahwa suhu optimum klorofilase dalam pelarut air berkisar antara 65-75°C (Clydesdale dan Francis, 1976). Perlakuan blansir terhadap ekstrak dilakukan selama 1 menit, karena waktu yang lebih lama dapat merangsang terjadinya reaksi oksidasi non enzimatis (Eskin, 1979).

Tahap selanjutnya ditujukan untuk menentukan konsentrasi Tween 80 dan lama inkubasi, dengan menggunakan larutan pengestrak Tween 80 1% dalam Na-sitrat 12 mM. Hasil dari tahap ini dapat dilihat pada Gambar 1. Pengujian sidik ragam menunjukkan bahwa adanya tahapan inkubasi meningkatkan aktivitas antioksidan dan kadar klorofil larut air. Peningkatan konsentrasi Tween meningkatkan kadar klorofil larut air dari ekstrak, namun peningkatan konsentrasi Tween dari 0.75% menjadi 1% tidak menghasilkan perbedaan kadar klorofil larut air ( $p > 0.05$ ). Dari tahap ini disimpulkan bahwa prosedur ekstraksi yang terbaik adalah dengan menggunakan larutan pengestrak Tween 80 0.75% dalam Na-sitrat 12 mM dan pemberian inkubasi selama 30 menit pada suhu 70-75°C sebelum tahapan pemisahan padatan. Menurut Sibarani (1994) waktu inkubasi optimum untuk klorofilase daun suji adalah 30 menit.

### Estimasi tingkat penyerapan klorofil ekstrak daun suji

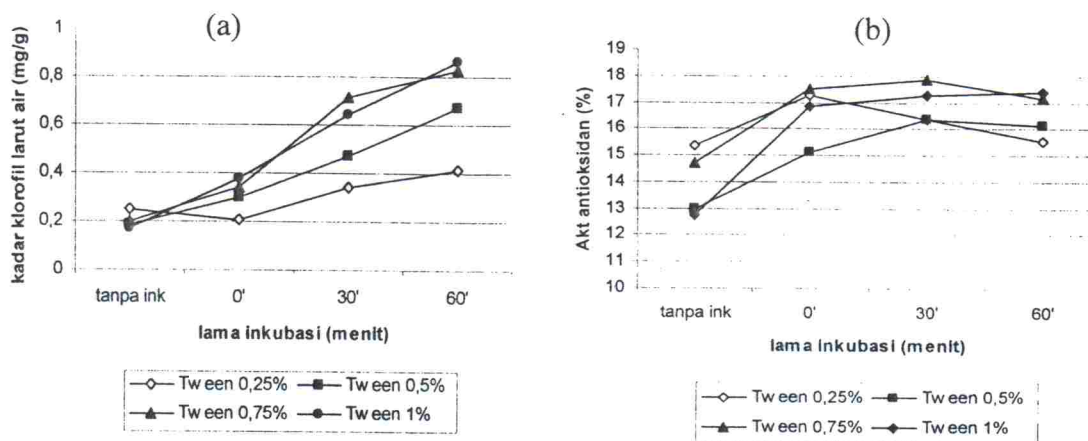
Suatu komponen pangan dapat dengan mudah diserap oleh usus apabila berada dalam kondisi terlarut atau tidak terikat oleh komponen lain yang berukuran besar, oleh karena itu besarnya klorofil yang dapat diserap berkorelasi positif dengan kadar klorofil terlarut.

Berdasarkan kurva standar SCC, kadar klorofil ekstrak daun suji (0.1 g/ml) setara dengan larutan SCC 2,3 mM. Selama pencernaan terjadi penurunan kadar klorofil terlarut, baik klorofil suji maupun SCC (Gambar 2). SCC, suatu klorofilin, umum digunakan sebagai bahan utama suplemen pangan kaya klorofil atau minuman klorofil. Sebanyak 45% klorofil suji terdegradasi di lambung (Gambar 2a), diperkirakan berubah menjadi feofitin. Ferruzzi et al., (2001) menyebutkan bahwa sebanyak 75-77% klorofil pure bayam berubah menjadi feofitin di lambung. Adanya senyawa antioksidan lain dalam ekstrak daun suji diduga turut berperan dalam mencegah degradasi klorofil suji. Analisis yang telah dilakukan terpisah terhadap ekstrak daun suji menunjukkan bahwa ekstrak mengandung total karoten sebanyak 17.0 ppm dan total fenol sebanyak 230.3 ppm. Ferruzzi et al., (2002a) mengungkapkan hal yang sama bahwa keberadaan antioksidan dalam saus apel yang ditambahkan ke dalam larutan SCC menurunkan laju degradasi klorofilin. Gambar 2a memperlihatkan adanya penurunan jumlah klorofil terlarut dari SCC pada kondisi asam (lambung), yang jika dilihat secara visual tampak adanya endapan butiran SCC. Namun endapan yang terbentuk bersifat *reversible* yaitu dengan adanya peningkatan pH hingga di atas 7, seperti yang terjadi pada kondisi usus halus, sebagian SCC dapat melarut kembali. Ferruzzi et al., (2002a) juga menyatakan adanya kehilangan sejumlah SCC selama pencernaan *in vitro* dan berubah menjadi produk yang belum diketahui. Hal ini menegaskan kembali bahwa SCC juga mengalami degradasi di dalam saluran pencernaan, meskipun tidak sebesar klorofil a maupun klorofil b.

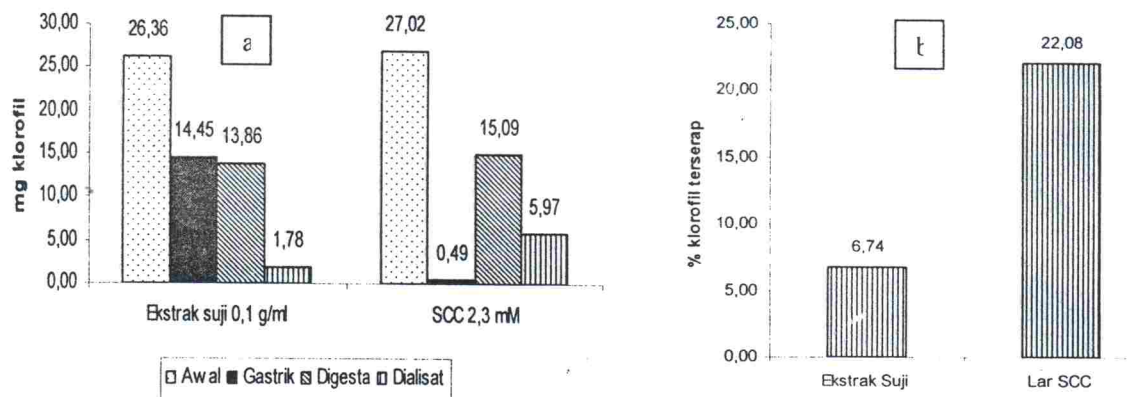
Tingkat penyerapan klorofil ekstrak daun suji jauh lebih rendah dibandingkan larutan SCC (Gambar 2b). Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Ferruzzi et al., (2001; 2002a), yang menggunakan sel absorptif Caco-2, dimana tingkat penyerapan klorofil lipofil sebesar 5-10% sedangkan klorofilin sebesar 45%-60%. Klorofil lipofil membentuk misel berukuran besar sehingga menghambat dialisisnya ke dalam kantung dialisis 6000-8000 MWCO (Salin et al., 1999).

### Pengujian aktivitas antioksidatif menggunakan tikus percobaan

Tikus selama percobaan dalam keadaan sehat yang ditunjukkan oleh adanya kenaikan berat badan sebesar 1,7-1,8 g/hari, dan konsumsi ransum rata-rata sebanyak 15 g/hari. Hasil pengukuran terhadap berat organ dan parameter antioksidatif dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Pengaruh tingkat konsentrasi Tween 80 yang ditambahkan ke dalam larutan pengekstrak Na-sitrat 12 mM dan lama inkubasi terhadap: (a) kadar klorofil larut air, dan (b) aktivitas antioksidan



Gambar 2. (a) Kadar klorofil terlarut pada masing-masing fraksi selama pencernaan *in vitro*, (b) estimasi jumlah klorofil yang terserap

Tabel 2. Pengaruh pemberian ekstrak daun suji dan SCC terhadap berat organ dan parameter antioksidatif tikus percobaan

Parameter	Kelompok Kontrol	Kelompok Suji	Kelompok SCC
Berat organ (g per 100 g BB):			
hati	2.98 <sup>a</sup>	3.22 <sup>a</sup>	3.21 <sup>a</sup>
limpa	0.20 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>
ginjal	0.54 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>
Kadar MDA hati (pmol/g)	217.97 <sup>b</sup>	65.17 <sup>a</sup>	116.49 <sup>a</sup>
Aktivitas katalase hati (U/ml)	16.75 <sup>a</sup>	23.49 <sup>b</sup>	19.58 <sup>ab</sup>
Aktivitas SOD hati (%)	19.02 <sup>a</sup>	23.77 <sup>b</sup>	31.52 <sup>c</sup>

Ket. : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata (p<0.05)

Pemberian ekstrak daun suji maupun SCC tidak mengakibatkan perbedaan berat organ hati, limpa dan ginjal ( $p > 0.05$ ). Berdasarkan laporan JECFA (Anonim, 1969), tembaga (Cu) dalam senyawa Cu-klorofil/klorofilin terikat kuat dan tidak ada efek toksikologis yang berarti jika diberikan melalui jalur oral, bahkan pada pengujian jangka panjang menggunakan tikus percobaan. Pemberian Cu-klorofilin dalam ransum sebanyak 1500 mg/kg berat badan per hari tidak mengakibatkan efek toksikologis. Perkiraan ADI (*Acceptable Daily Intake*) Cu-klorofil/klorofilin untuk manusia sebesar 0-15 mg/kg berat badan. Sedangkan untuk ekstrak daun suji belum dilakukan analisis histopatologis maupun uji toksisitas.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur kadar MDA (malondialdehid), aktivitas SOD dan aktivitas katalase hati. MDA adalah produk peroksidasi lipid, dan kadarnya dapat ditekan oleh keberadaan senyawa-senyawa antioksidan. Dengan kata lain kadar MDA yang rendah menunjukkan adanya penghambatan terhadap oksidasi lipid oleh suatu antioksidan. Tabel 2 di atas menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun suji maupun SCC menurunkan kadar MDA sebesar 70% dan 47%, diduga karena sifat antioksidatif dari klorofil. Endo et al., (1985) mengemukakan bahwa klorofil merupakan antioksidan pemutus rantai yang bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas. Dalam menghambat oksidasi lipid, klorofil bekerja pada tahap inisiasi. Dikatakannya pula bahwa yang berperan dalam sifat antioksidatif klorofil adalah struktur porfirinnya.

Kerentanan suatu jaringan terhadap kerusakan oksidatif tergantung terutama pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain enzim-enzim antioksidannya. Enzim katalase dan SOD termasuk enzim-enzim utama yang berperan dalam melindungi oksidasi jaringan. Katalase dan SOD adalah enzim-enzim yang bekerjasama menetralkan radikal superoksida. Radikal superoksida pertama-tama didismutasi oleh SOD menjadi  $H_2O_2$  yang masih bersifat toksik, dan selanjutnya  $H_2O_2$  didegradasi oleh katalase menjadi produk yang tidak toksik. Dalam analisis yang dilakukan, katalase ditambahkan ke dalam campuran reaksi dalam jumlah yang sama, kemudian dihitung kecepatan penguraian dari  $H_2O_2$  yang ditambahkan. Hasil pengujian terhadap ekstrak hati kelompok suji menunjukkan adanya peningkatan aktivitas katalase sebesar 40% lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol ( $p < 0.05$ ). Kecepatan penguraian  $H_2O_2$  ini diduga disebabkan oleh: (1) peningkatan aktivitas katalase hati dan/atau (2) kemampuan klorofil menangkap (*scavenge*)  $H_2O_2$ . Efek klorofil terhadap katalase telah dibuktikan secara *in vitro* antara lain oleh Hsu et al., (2005) yang menyatakan bahwa klorofil larut air, dalam hal ini feoforbida dan feoforbida b, memperkuat ketahanan limfosit manusia terhadap kerusakan oksidatif yang diinduksi oleh  $H_2O_2$ . Kemampuan klorofil menangkap  $H_2O_2$  telah diteliti oleh Kumar et al., (2001) yang

menyebutkan bahwa konstanta kecepatan reaksi antara klorofilin dengan  $H_2O_2$  adalah sebesar  $2.7 \times 10^6 M^{-1}.s^{-1}$ . Katalase maupun klorofil memiliki kerangka porfirin dalam strukturnya, sehingga diduga klorofil berkontribusi dalam sintesis katalase. Selain itu keberadaan antioksidan lain dalam ekstrak daun suji, seperti karotenoid dan komponen fenolik berkontribusi dalam peningkatan status antioksidatif kelompok suji.

SOD merupakan enzim antioksidan yang berperan dalam dismutasi radikal superoksida. Dalam analisis yang dilakukan, radikal superoksida dihasilkan terlebih dahulu dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Radikal superoksida akan mengoksidasi garam tetrazolium (berwarna kuning) menjadi formazan yang berwarna biru. Semakin tinggi aktivitas SOD berarti semakin banyak radikal superoksida yang dinetralkan, dan hal ini ditunjukkan oleh semakin rendahnya jumlah formazan yang terbentuk. Kelompok suji dan SCC memiliki aktivitas menangkap radikal superoksida yang lebih besar, yaitu masing-masing 25% dan 66% lebih besar dibandingkan kelompok kontrol. Bloor et al. (2000) menyatakan bahwa klorofilin pada konsentrasi 10  $\mu M$  melindungi membran mitokondria hati tikus terhadap radiasi dan fotosensitasi, yang ditandai dengan penurunan peroksida, protein oksidasi, serta restorasi GSH (glutathion) dan SOD.

## KESIMPULAN

Ekstraksi daun suji dilakukan dengan menggunakan larutan pengestrak Tween 80 0.75% dalam Na-sitrat 12 mM diikuti dengan inkubasi selama 30 menit pada 70-75°C. Metode ini mampu menghasilkan ekstrak daun suji yang lebih baik, yaitu memiliki kadar total klorofil, kadar klorofil larut air dan aktivitas antioksidan yang signifikan lebih tinggi, dibandingkan dengan ekstrak yang dihasilkan dengan hanya menggunakan air (akuades) seperti yang biasa dilakukan di tingkat rumah tangga. Pengujian dengan menggunakan kantung dialisis menunjukkan bahwa klorofilin (SCC) diserap lebih banyak dibandingkan klorofil ekstrak daun suji, yaitu berturut-turut sekitar 22% dan 7%.

Pemberian ekstrak daun suji maupun SCC secara oral selama 2 bulan tidak mengakibatkan perbedaan berat organ hati, limpa dan ginjal tikus Sprague Dawley jantan. Pemberian ekstrak daun suji dapat meningkatkan status antioksidatif tubuh, yang antara lain ditunjukkan oleh adanya penurunan kadar MDA hati sebesar 70% dan peningkatan aktivitas katalase hati sebesar 40% dibandingkan kelompok kontrol, bahkan kondisi ini lebih baik dibandingkan kelompok SCC. Pemberian ekstrak daun suji maupun SCC meningkatkan aktivitas SOD hati, yaitu masing-masing 25% dan 66% lebih besar dibandingkan kelompok kontrol. Peningkatan status antioksidatif tikus