

## MEKANISME DAN KINETIKA KUENSTING KUERSETIN TERHADAP EFEK FOTOSENSITISASI PEWARNA MAKANAN SINTETIK ERITROSIN DALAM OKSIDASI MINYAK SAWIT

[Mechanisms and Kinetics of Quenching of Quercetin on the Photosensitizing Effect of Synthetic Food Colorant Erythrosine in Palm Oil Oxidation]

Posman Sibuea<sup>1)</sup>, Sri Raharjo<sup>2)</sup>, Umar Santoso<sup>2)</sup> dan Zuheid Noor<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dosen di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Unika St. Thomas Medan.

<sup>2)</sup> Dosen di Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Diterima 20 Mei 2005 / Disetujui 29 Agustus 2005

### ABSTRACT

The effect of 0, 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm (wt/vol) quercetin on the singlet oxygen oxidation of palm oil in methylene chloride containing 100 ppm erythrosine, were studied during storage under 4000 lux fluorescent light for 5 h by measuring peroxide value. Steady-state kinetic approximation was used to determine the quenching mechanism and quenching rate constant of quercetin in the erythrosine-sensitized photooxidation of palm oil. Erythrosine greatly increased the photooxidation of palm oil, as was expected. Quercetin was extremely effective at minimizing erythrosine-sensitized photooxidation of palm oil. As the concentration of quercetin increased from 0 to 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm, the peroxide value of palm oils decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The steady-state kinetic studies indicated that quercetin quenched singlet oxygen only to minimize the erythrosine-sensitized photooxidation of palm oils. The calculated total quenching rate of quercetin was  $3,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

**Keywords :** Quercetin, erythrosine, photosensitized oxidation, singlet oxygen, palm oils and quenching mechanism and kinetics.

### PENDAHULUAN

Oksidasi lemak oleh oksigen triplet ( $^3\text{O}_2$ ) telah dipelajari secara ekstensif sejak 70 puluh tahun lampau dalam upaya perbaikan stabilitas oksidatif pada makanan. Rawls dan VanSanten (1970) mengatakan oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) termasuk di dalam tahap permulaan oksidasi oleh oksigen triplet karena oksigen singlet dapat secara langsung bereaksi dengan ikatan rangkap tanpa pembentukan radikal bebas. Reaksi oksidasi mempengaruhi citarasa (*flavor*), kualitas gizi dan bahkan bisa menghasilkan senyawa beracun yang mengakibatkan bahan makanan tersebut tak bisa lagi digunakan.

Oksigen singlet adalah molekul yang amat reaktif, elektrofilik, nonradikal dan ribuan kali lebih reaktif dibanding oksigen triplet. Perbedaannya dengan oksigen triplet digambarkan pada susunan elektronnya. Oksigen triplet mempunyai dua elektron terluar pada dua orbital terpisah. Sementara oksigen singlet, elektron terluarnya mempunyai spin berlawanan dan berpasangan (Kolakowska, 2002; Raharjo, 2004).

Mekanisme kimia pembentukan oksigen singlet dalam makanan sangat tergantung pada sensitizer, cahaya dan oksigen triplet. Asam lemak tak jenuh, vitamin larut minyak, kolesterol, dan terpen terkonjugasi amat rentan terhadap fotooksidasi selama

penyimpanan, khususnya jika terdapat fotosensitizer (Lee et al., 1997; Min dan Boff, 2002a). Fotosensitizer akan menyerap ultraviolet atau energi radiasi visible secara cepat dan menjadi tidak stabil, tereksitasi dan molekul tingkat singlet ( $^1\text{sen}^*$ ).

Pewarna makanan sintetik, yang kerap digunakan untuk memperbaiki penampilan makanan, dapat berperan sebagai fotosensitizer karena ikatan rangkap terkonjugasi yang dimiliki. Menurut Yang et al., (2002) dan Chung et al., (1997), eritrosin telah dilaporkan sebagai fotosensitizer utama pada oksidasi produk daging, minyak kedelai dan kolesterol.

Alfa-tokoferol dan  $\beta$ -karoten adalah antioksidan alami yang kerap digunakan untuk mencegah oksidasi pada makanan. Keduanya telah dilaporkan dapat menstabilkan oksigen singlet pada produk makanan olahan. Sejumlah senyawa flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang menghambat oksidasi lemak pada makanan. Kuersetin dari kelompok flavonol, dapat menekan peroksidasi lemak di dalam sistem model dan beberapa sistem biologi seperti mitokondria, mikrosom, kloroplas dan eritrosit. Sejumlah penelitian melaporkan pengaruh kuersetin terhadap peroksidasi lemak secara *in vitro* dan pengurangan pembentukan *thiobarbituric acid-reactive substances* (Shahidi dan Nacz, 1995; Kandaswami dan Middleton, 1997; Rohn et al., 2004).

Sementara itu, Penman dan Gordon (1998); Hopia dan Heinonen (1999); Reische et al., (2002) menyebutkan sebagai antioksidan, kuersetin selain menunjukkan aktivitas antioksidan primer – berperan sebagai penerima radikal bebas dan *chain-breakers* – juga sebagai penkuensing oksigen singlet. Bors et al., (1990) mengatakan aktivitas antioksidan kuersetin diperankan lewat tiga ciri berikut: 1). Struktur 3',4'-dihidroksi pada cincin B; 2). Adanya 2,3-ikatan rangkap pada cincin C dan 3). Adanya sebuah gugus 3-hidroksil pada cincin C dan sebuah gugus 5-hidroksil pada cincin A. Sejauh ini, penelitian tentang mekanisme dan kinetika kuensing kuersetin terhadap efek fotosensitisasi pewarna makanan sintetik eritrosin dalam minyak sawit, belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ada dua yakni (1) mempelajari pengaruh kuersetin terhadap fotooksidasi minyak sawit dengan sensitiser eritrosin; (2) mempelajari mekanisme dan kinetika kuensing kuersetin dalam oksidasi oksigen singlet minyak sawit.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak kelapa sawit yang diperoleh dari PT Astra Agro Lestari Medan. Bahan-bahan kimia yang digunakan berkualitas PA seperti kuersetin, metilen klorida, etanol, kloroform, asam asetat glasial, heksan, beta-karoten, alfa-tokoferol, asam silisik 100 mesh, karbon aktif, selite, kalium iodida, dan natrium tiosulfat. Eritrosin, merk Inti, diperoleh dari pasar lokal Yogyakarta. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebuah generator yang dilengkapi dengan sumber cahaya fluoresent 4000 lux guna menstimulasi pembentukan oksigen singlet.

### Metode

#### Pemurnian minyak kelapa sawit

Minyak sawit (*refined-bleached-deodorized palm oil*, RBDPO) dilewatkan melalui kolom kromatografi berukuran 60 cm x 4 cm, yang berisi asam silisik (100 mesh, Mallinkrodt) yang telah diaktivasi, campuran arang aktif dan celite (2:1) (Sigma Chemical Co.), serbuk gula dan celite (2:1), dan asam silisik yang telah diaktivasi. Kolom ini dibungkus dengan aluminium foil guna menghindari pengaruh cahaya terhadap minyak yang dimurnikan. Hasil yang diperoleh disebut sebagai minyak yang telah dimurnikan.

#### Pengujian terhadap minyak yang dimurnikan

Kadar tokoferol dianalisis menggunakan metoda HPLC (Carpenter, 1979) dan kadar karotenoid ditera dengan metoda spektrofotometri (Proctor and Snyder, 1987). Angka peroksida dan asam lemak

bebas diuji dengan cara titrasi (Shahidi dan Wanasundra, 2002). Pengujian dimaksudkan untuk memastikan kadar antioksidan alami karoten dan tokoferol yang terdapat pada minyak yang sudah dimurnikan. Sementara itu, dilakukan penentuan komposisi asam lemak minyak kelapa sawit (RBDPO) dengan gas chromatografi (Jung dan Min, 1991) untuk perhitungan berat molekul minyak sawit.

#### Efek eritrosin terhadap fotooksidasi minyak sawit yang dimurnikan

Efek eritrosin sebagai sensitiser terhadap fotooksidasi dipelajari pada konsentrasi: 0, 50, 100, 150 dan 200 ppm dalam minyak sawit yang sudah dimurnikan 10% yang dipersiapkan dalam metilen klorida. Sampel dari campuran tersebut sebanyak 15 mL diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 25 mL yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya 4.000 lux. Angka peroksida diukur setiap interval waktu 1 jam selama 4 jam dengan metoda AOCS (1998). Percobaan dilakukan dengan tiga ulangan.

#### Efek kuersetin terhadap fotooksidasi minyak sawit yang dimurnikan

Guna mempelajari pengaruh kuersetin terhadap fotooksidasi minyak sawit dilakukan percobaan sebagai berikut. Larutan kuersetin dengan konsentrasi 0; 200; 400; 600; 800 dan 1000 ppm (berat/volume) dipersiapkan dalam pelarut metilen klorida yang sudah mengandung eritrosin 100 ppm (berat/volume) sebagai sensitiser. Ke dalam masing-masing larutan kuersetin ditambahkan 10,0 persen (berat/volume) minyak kelapa sawit yang sudah dimurnikan. Alpatokoferol 400 ppm digunakan sebagai kontrol positif dalam sistem. Sebanyak 15 mL sampel minyak diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum berukuran 25 mL yang dilengkapi dengan penutup karet yang dibungkus aluminium foil. Sampel tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak yang telah dilengkapi dengan lampu dengan intensitas cahaya 4.000 lux (Lee dan Min, 1988). Angka peroksida diukur setiap 1 jam selama 5 jam dengan metoda titrasi. Percobaan dilakukan dengan tiga ulangan.

#### Penyiapan media reaksi mekanisme dan kinetika kuensing oleh kuersetin

Mekanisme dan kinetika kuensing oksigen singlet (*singlet oxygen quenching*) oleh kuersetin di dalam model fotooksidasi minyak sawit yang telah dimurnikan ditentukan dengan menggunakan metoda kinetika stedy-state dari Foote (1979). Sampel minyak sawit sebanyak 0,01; 0,02; 0,03 dan 0,04 M dalam pelarut metilen klorida yang mengandung eritrosin 100

ppm dicampur dengan kuersetin pada konsentrasi 0,0;  $0,25 \times 10^{-5}$ ;  $0,50 \times 10^{-5}$ ;  $0,75 \times 10^{-5}$  dan  $10^{-5}$  M.

Sampel sebanyak 15 mL diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum 25 mL. Sampel dipersiapkan sedemikian rupa dan ditutup rapat dengan penutup karet yang dibungkus aluminium foil sehingga tidak ada udara masuk, dan diletakkan dalam kotak dengan sumber cahaya 4.000 lux selama 2 jam (Lee and Min, 1988). Mekanisme dan kinetika quenching oksigen singlet ditetapkan berdasarkan pengukuran oksidasi minyak sawit dengan penentuan angka peroksida (Lee et al., 1997). Percobaan ini dilakukan dengan tiga ulangan.

**Rancangan percobaan**

Rancangan percobaan adalah rancangan acak kelompok yang disusun secara faktorial. Guna mengetahui pengaruh setiap perlakuan maka dilakukan analisis data dengan menggunakan daftar sidik ragam (DSR). Perlakuan yang berpengaruh nyata dan sangat nyata dilakukan uji beda rata-rata dengan menggunakan uji Duncan pada taraf 5% dan 1% (Gomez dan Gomez, 1984).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Pemurnian minyak kelapa sawit**

Minyak kelapa sawit sebanyak 300 mL dimurnikan lewat kolom kromatografi. Minyak yang diperoleh disebut minyak murni. Dari hasil analisis, kandungan tokoferol menurun dari 112,35 ppm menjadi 4,67 ppm, kadar karoten menurun dari 14,65 ppm menjadi 4,21 ppm; angka peroksida menurun dari 1,40 meq/kg minyak menjadi 0,73 meq/kg minyak dan asam lemak bebas menurun dari 0,15 menjadi 0,08 % dan tidak terdeteksi pembentukan diena terkonjugasi.

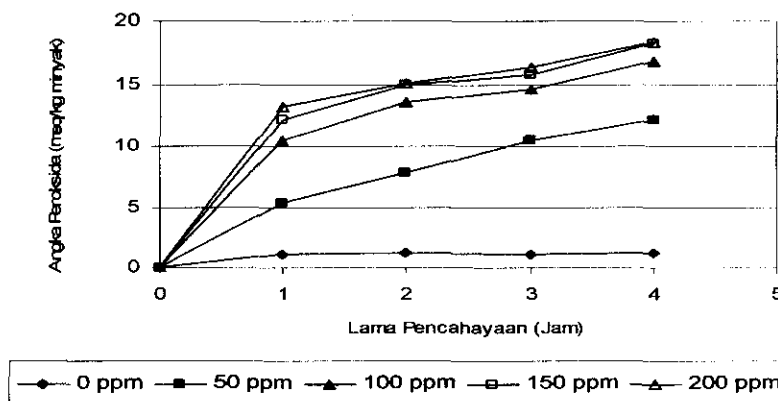
Komposisi asam lemak minyak sawit yang

telah dimurnikan adalah sebagai berikut: asam laurat 0,21%, asam miristat 1,03%, asam palmitat 43,33%, asam stearat 4,41%, asam oleat 39,10% dan asam linoleat 10,83%. Berat molekul rata-rata minyak sawit adalah  $(0,21\% \times 200,32) \times 3 + (1,03\% \times 230,36) \times 3 + (43,33\% \times 256,43) \times 3 + (4,41 \times 287,51) \times 3 + (39,10\% \times 282,47) \times 3 + (10,83\% \times 280,46) \times 3 = 802,1$ . Konsentrasi minyak sawit 0,01, 0,02, 0,03 dan 0,04 M dalam metilen klorida dihitung berdasarkan rata-rata berat molekul minyak sawit sebagai trigliserida. Konsentrasi minyak sawit ini digunakan untuk menentukan mekanisme dan kinetika kuensing.

**Efek eritrosin terhadap foto oksidasi minyak sawit**

Efek eritrosin 0, 50, 100, 150 dan 200 ppm terhadap angka peroksida minyak sawit 10% dalam pelarut metilen klorida yang diberi cahaya 4000 lux selama 4 jam disajikan pada Gambar 1.

Eritrosin pada konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm memberi efek signifikan terhadap kenaikan angka peroksida minyak sawit selama penyimpanan 4 jam ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan eritrosin). Akan tetapi angka peroksida minyak sawit pada konsentrasi 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm menunjukkan berbeda tidak nyata. Sementara itu, angka peroksida minyak sawit pada kontrol (tanpa eritrosin) tidak menunjukkan peningkatan. Ini membuktikan bahwa sampel yang tidak diberi eritrosin tidak dapat menghasilkan oksigen singlet dari oksigen triplet meski sampel diberi cahaya yang sama. Min dan Boff (2002) menyatakan oksigen singlet dihasilkan dari oksigen triplet dengan hadirnya sensitiser dan cahaya. Adanya eritrosin sebagai sensitiser dapat meningkatkan reaksi oksidasi, karena sensitiser mampu menyerap energi cahaya dan selanjutnya membentuk hidroperoksida.

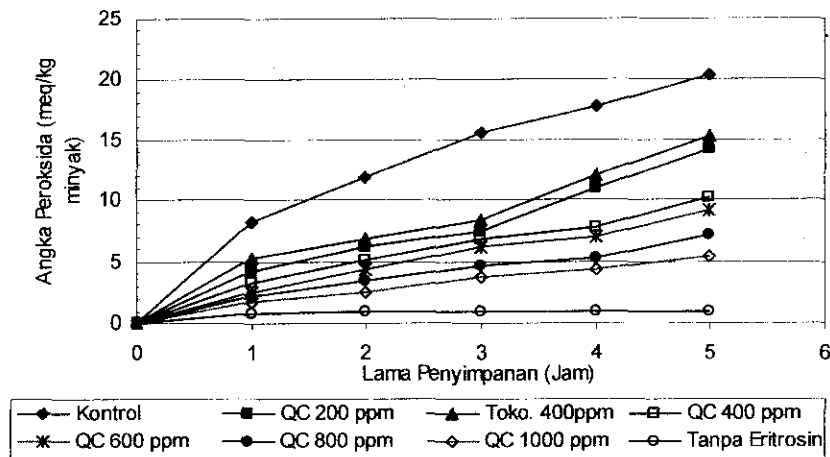


Gambar 1. Efek eritrosin pada berbagai konsentrasi terhadap fotooksidasi minyak sawit 10% dalam metilen klorida selama 4 jam di bawah cahaya fluorescen 4.000 lux.

**Efek kuersetin terhadap oksidasi oksigen singlet minyak sawit**

Efek kuersetin 0, 200, 400, 600, 800 dan 1.000 ppm terhadap fotooksidasi minyak sawit dengan sensitiser eritrosin di dalam pelarut metilen klorida ditunjukkan pada Gambar 2. Percobaan ini disimpan dalam kotak yang diberi pencahayaan fluoresen 4.000 lux. Perubahan angka peroksida yang diukur dalam selang waktu setiap satu jam selama lima jam penyimpanan ditunjukkan seperti Tabel 1 berikut.

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa tingkat konsentrasi kuersetin memberi pengaruh terhadap angka peroksida minyak sawit. Kontrol atau tanpa pemberian kuersetin memberikan pengaruh yang lebih besar terhadap angka peroksida. Bila dibandingkan dengan alpa tokoferol 400 ppm sebagai kontrol positif menunjukkan bahwa kuersetin pada konsentrasi yang sama menghasilkan angka peroksida yang lebih rendah, yaitu 7,94 dan 7,14 meq/kg minyak secara berturut-turut



(Keterangan: QC = Kuersetin; Toko. = Alpa tokoferol)

Gambar 2. Efek kuersetin terhadap angka peroksida minyak sawit dalam pelarut metilen klorida yang mengandung 100 ppm eritrosin di bawah cahaya fluorensen 4.000 lux.

Tabel 1. Pengaruh kuersetin terhadap angka peroksida minyak sawit

KUERSETIN (PPM)	ANGKA PEROKSIDA * (MEQ/KG MINYAK)						
	0 jam	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	Rerata**
Kontrol	0	8,16	11,83	15,59	17,68	20,39	12,28 a
200	0	4,14	6,18	7,41	10,91	14,21	7,14 b
400	0	3,19	5,03	6,73	7,70	10,20	5,48 c
600	0	2,54	4,39	6,20	6,94	9,15	4,87 c
800	0	2,21	3,34	4,66	5,19	7,14	3,76 cd
1000	0	1,76	2,40	3,74	4,35	5,42	2,94 d
Tanpa eritrosin	0	0,80	0,90	0,90	0,90	0,90	0,73 e
Tokoferol 400 ppm	0	5,18	6,81	8,29	12,05	15,31	7,94 b

Keterangan:

\* Angka peroksida merupakan rata-rata dari dua ulangan

\*\* rata-rata angka peroksida dari penyimpanan sampel 0,1,2,3,4,dan 5 jam dan angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada P <0.05

Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa kuersetin memiliki kekuatan yang lebih besar menkuensing kation radikal larut air dibandingkan alpa tokoferol. Aktifitas relatif flavonoid menkuensing kation radikal larut air ABTS + (ABTS= 2,2'-azinobis (3-etyl benzothiazoline-6-sulfonate) menurun secara berturut-turut sebagai berikut: kuersetin > myricetin > rutin > alpatokoferol (Rice-Evan *et al* 1995). Di dalam sistem lemak yang digunakan untuk uji penghambatan oksidasi LDL, flavonol aglycone secara umum dilaporkan lebih aktif dibandingkan dalam bentuk glikosidanya, dalam artian kuersetin lebih aktif dibandingkan kuersitrin dan rutin.

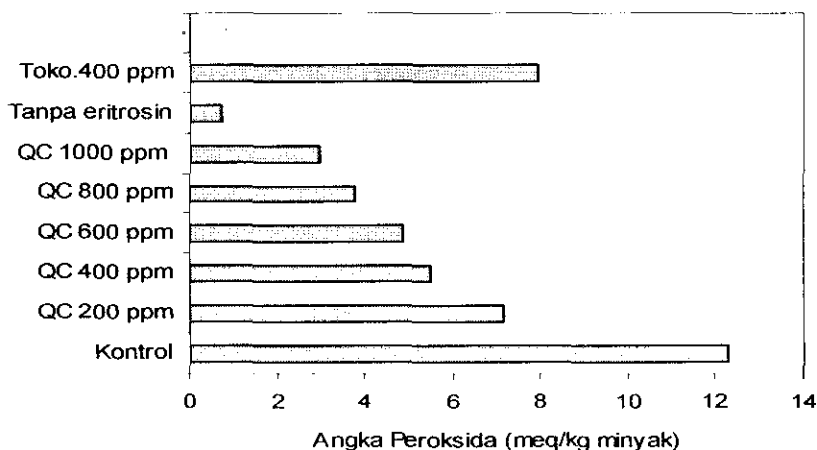
Kuersetin (3',4'-dihidroksiflavanol) merupakan senyawa flavanoid dari kelompok flavonol dan terdapat terutama pada tanaman teh, jeruk, tomat, apel, kakao, anggur dan bawang. Kuersetin-3-glukosida (isokuersetin), kuersetin-3-rhamnoside (kuersitrin), dan kuersetin-3-rutinoside (rutin) adalah glikosida kuersetin. Flavonol kuersetin, mirisetin, robinitin dan gossipetin memiliki sifat antioksidan yang amat potensil (Decker, 2002). Sementara itu, struktur flavonoid, menurut Cuppett (1998) didasarkan pada posisi 2-fenil-benzo-7-piran atau inti flavan. Inti ini dibagi oleh sebuah sistem yang mempunyai dua cincin benzena (A dan B) yang dihubungkan oleh satu oksigen yang mempunyai cincin piran, yaitu cincin C.

Amic *et al.*, (2003); Szymusiak dan Zielinski (2003) dan Cuppett *et al.*, (1997) melaporkan hubungan aktivitas antioksidan flavonoid dengan struktur kimianya. Dikatakan bahwa potensi flavonoid berkaitan dengan substitusi polihidroksilasi yang dipengaruhi oleh lokasi substitusi hidroksil pada cincin B. Substitusi hidroksil pada posisi orto pada cincin B memberikan aktivitas antioksidan yang melemah. Namun, substitusi

hidroksil pada posisi orto yang disertai dengan penambahan gugus hidroksil pada posisi para dapat meningkatkan aktivitas. Aktivitas antioksidan yang kuat diperoleh dari senyawa yang memiliki hidroksilasi pada posisi para dalam cincin B. Selain itu, ditemukan juga bahwa ikatan rangkap antara posisi 2 dan 3 pada cincin B berkontribusi untuk meningkatkan aktivitas antioksidan.

Gambar 3 menunjukkan rata-rata penurunan angka peroksida dengan makin meningkatnya penambahan konsentrasi kuersetin. Yakni 12,28; 7,14; 5,48; 4,87; 3,76; dan 2,94 meq/kg minyak berurut-turut pada kontrol, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm kuersetin.

Hasil penelitian menunjukkan tanpa penambahan eritrosin angka peroksida minyak sangat rendah, yaitu 0,73 meq/kg minyak. Penurunan ini berbeda sangat nyata ( $P < 0.01$ ) dengan penambahan eritrosin tanpa kuersetin (kontrol). Rata-rata angka peroksida yang bergerak sangat cepat pada kontrol yaitu 12,28 meq/kg minyak, menunjukkan bahwa eritrosin merupakan sensitiser yang amat efektif dalam pembentukan oksigen singlet. Menurut Min dan Boff (2002a) komponen fotosintesa seperti klorofil, feofitin, riboflavin dan pewarna makanan sintetik (*synthetic food colorant*) seperti eritrosin dapat menyerap energi cahaya dan memindahkannya ke oksigen triplet untuk membentuk oksigen singlet. Fotosensitiser dapat menghasilkan oksigen singlet dari oksigen triplet bila terpapar cahaya. Oksigen singlet dapat mempercepat proses oksidasi lemak dan konsentrasi oksigen dalam *headspace* menurun per satuan waktu (Yang, *et al.*, 2002).



Gambar 3. Pengaruh kuersetin terhadap penurunan angka peroksida minyak sawit (Keterangan: QC = Kuersetin; Toko. = Alpa Tokoferol)

Reaksi oksigen singlet sangat cepat dalam makanan. Kecepatan oksigen singlet dan oksigen triplet dengan asam linoleat adalah  $1,3 \times 10^9/\text{Ms}$  dan  $8,9 \times 10^1/\text{Ms}$  secara berturut-turut. Sementara kecepatan reaksi oksigen singlet dengan asam oleat, linolenat dan arakidonat adalah 0,74; 1,9 dan  $2,4 \times 10^6/\text{Ms}$ . Peningkatan kecepatan ini, secara relatif proporsional dengan jumlah ikatan rangkap yang dimiliki setiap asam lemak, seperti ikatan rangkap terkonjugasi atau tidak terkonjugasi. Reaksi langsung antara oksigen singlet dengan ikatan rangkap dapat membentuk hidroperoksida pada posisi 10 dan 12 pada asam linoleat dan 10 dan 15 pada asam linolenat (Min dan Boff, 2002b).

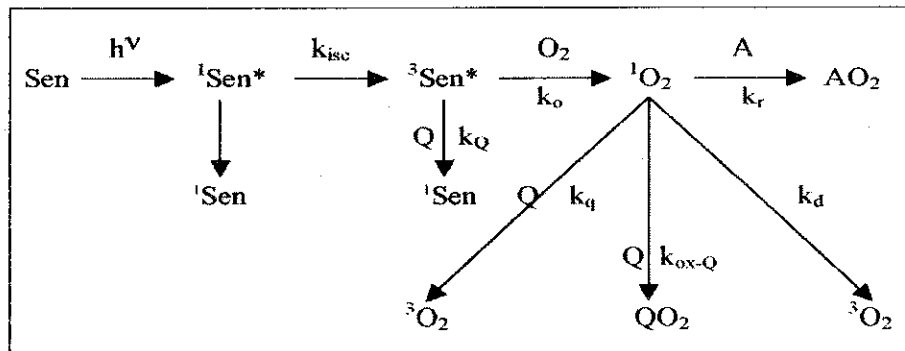
**Mekanisme dan kinetika kuensing oleh kuersetin**

Penambahan kuersetin pada minyak sawit 10% dalam pelarut metilen klorida dengan sensitiser eritrosin 100 ppm dan diberi cahaya 4.000 lux, sangat efektif menurunkan angka peroksida (Gambar 2). Seiring dengan itu, sangat relevan mempelajari mekanisme dan kinetika kuensing kuersetin guna menetapkan kecepatan kuersetin menstabilkan oksigen singlet atau sensitiser triplet tereksitasi pada fotooksidasi minyak sawit dengan menggunakan metode *steady-state kinetic approximation* (Foote, 1979). Senyawa kuensing dapat mengurangi aktifitas oksigen singlet pada beberapa tahap di dalam oksidasi lemak pada makanan (Cuppett, et al., 1997; Min and Boff 2002b).

Skema pembentukan oksigen singlet dan keberadaannya dalam makanan ditunjukkan seperti pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan aktivitas oksigen singlet dan reaksinya dengan senyawa (A) untuk membentuk hasil oksidasi (AO<sub>2</sub>). Pada setiap tahap reaksi, paling tidak terdapat satu jalur alternatif untuk mengurangi oksidasi senyawa (A). Tahap pertama mewakili kembalinya sensitizer singlet tereksitasi (<sup>1</sup>Sen\*) ke keadaan dasar (<sup>1</sup>Sen). Kedua, mewakili reaksi dengan sebuah agensia penstabil (Q) dengan kecepatan k<sub>Q</sub>, mengembalikan sensitizer triplet tereksitasi (<sup>3</sup>Sen\*) ke keadaan dasar (<sup>1</sup>Sen) sebelum bereaksi dengan oksigen triplet (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>). Sensitizer triplet tereksitasi (<sup>3</sup>Sen\*) dapat bereaksi dengan <sup>3</sup>O<sub>2</sub> membentuk oksigen singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Min dan Boff, 2002a).

Dengan penggambaran tersebut, dapat dikatakan ada tiga kemungkinan nasib dari oksigen singlet dalam makanan: (1) secara alami dapat berubah menjadi ke keadaan dasar (*ground state*) di mana laju perubahan disimbolkan dengan k<sub>d</sub>; (2) dapat bereaksi dengan komponen *singlet-state* (A) untuk membentuk produk oksidasi (AO<sub>2</sub>) dengan laju yang digambarkan dengan k<sub>r</sub>; dan (3) dapat dihilangkan oleh agensia penstabil baik dengan cara mengkombinasikan dengan penstabil, dengan laju yang diwakili oleh k<sub>ox-Q</sub> untuk membentuk produk QO<sub>2</sub>, atau dengan cara memindahkan energinya ke agensia penstabil dan mengembalikan menjadi oksigen triplet bebas, dengan laju yang diwakili oleh k<sub>4</sub>.



Gambar 4. Pembentukan oksigen singlet dan reaksinya dengan substrat A untuk menghasilkan produk teroksidasi AO<sub>2</sub>. Pembentukan AO<sub>2</sub> dapat dicegah dengan reaksi <sup>3</sup>Sen\* atau <sup>1</sup>O<sub>2</sub> dengan senyawa quencher (Sumber: Min dan Boff, 2002a)

Di mana:

- hν = Energi cahaya
- k<sub>isc</sub> = Konstanta kecepatan persilangan antar-sistem
- Q = Quencher
- k<sub>Q</sub> = Konstanta kecepatan reaksi kuensing oksigen singlet secara fisik
- k<sub>ox-Q</sub> = Konstanta kecepatan reaksi kuensing oksigen singlet secara kimia
- k<sub>r</sub> = Konstanta kecepatan reaksi minyak dengan oksigen singlet
- k<sub>d</sub> = Konstanta kecepatan penghancuran oksigen singlet
- K = Kecepatan pembentukan oksigen singlet

Sementara itu persamaan kinetika quenching dapat dituliskan dalam bentuk matematik sebagai berikut:

$$d[AO_2]/dt)^{-1} = K^{-1} \{1 + (k_q[Q] + k_{OX-Q}[Q] + k_d) / k_r[A] \}$$

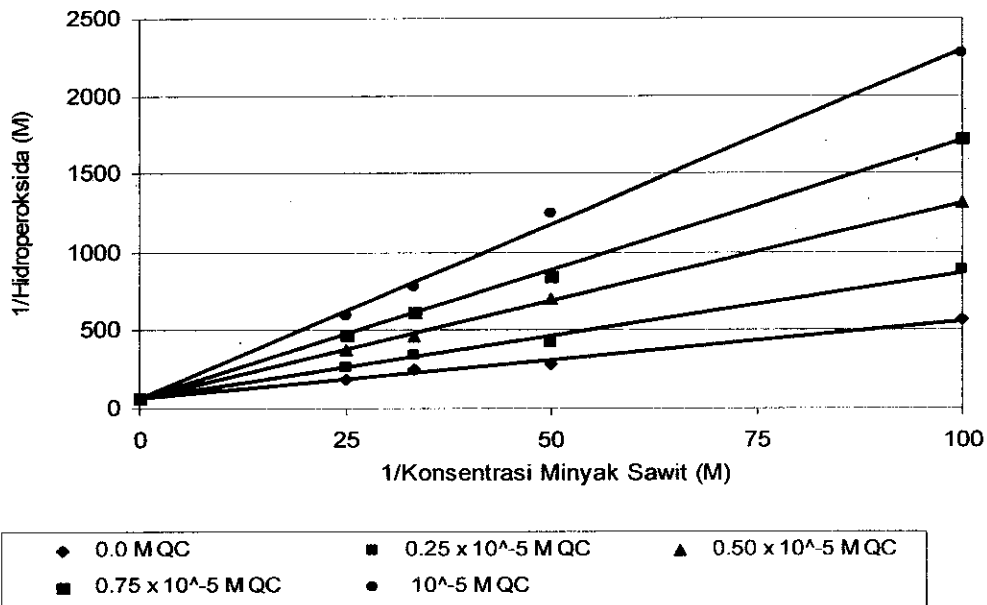
.....1

Intersep dan Slop  $[AO_2]^{-1}$  vs  $[A]^{-1}$  pada konsentrasi quencher (Q) yang berbeda adalah  $K^{-1}$  dan  $K^{-1} \{k_q[Q] + k_{OX-Q}[Q] + k_d / k_r\}$ . Perbandingan slope/intersep dari persamaan regresi pada minyak tanpa kuenser adalah  $k_d/k_r$ . Dari persamaan ini nilai  $k_r$  dapat dihitung, jika harga  $k_d$  pelarut sudah diketahui. Dengan menentukan persamaan regresi linier dari  $[AO_2]^{-1}$  vs  $[A]^{-1}$  di mana  $[AO_2]^{-1} = Y$  dan  $[A]^{-1} = X$ , maka dapat diperoleh perbandingan slope/intersep. Kemiringan dari perbandingan slope/intersep vs.  $[Q]$  adalah total kecepatan quenching/ $k_r$  atau  $k_q + k_{OX-Q} / k_r$ . Maka nilai konstanta kecepatan penstabil kuersetin ( $k_q + k_{OX-Q}$ ) terhadap oksigen singlet adalah slope x  $k_r$ . Dengan demikian dapat dihitung kecepatan reaksi kompoen penstabil masih linier.

Plot dari  $[AO_2]^{-1}$  vs.  $[A]^{-1}$  untuk konsentrasi kuersetin yang berbeda-beda ditunjukkan pada Gambar 5.

Gambar 5 menunjukkan intersep dari konsentrasi kuersetin yang berbeda-beda adalah sama, tetapi slop dari plot meningkat seiring dengan makin meningkatnya konsentrasi kuersetin dari 0,0 hingga  $1,0 \times 10^{-5}$  M. Hal ini menunjukkan bahwa kuersetin hanya menstabilkan oksigen singlet untuk mereduksi fotooksidasi pada minyak sawit. Oleh karena itu, kuersetin dapat mereduksi fotooksidasi pada minyak sawit oleh mekanisme penstabilan oksigen singlet tetapi tidak oleh mekanisme penstabilan sensitiser triplet tereksitasi.

Garis regresi linear dari plot  $[AO_2]^{-1}$  vs.  $[A]^{-1}$  tanpa penambahan (kontrol) kuersetin adalah  $Y = 4,98 X + 65$  di mana  $Y = [AO_2]^{-1}$  dan  $X = [A]^{-1}$ . Rasio slop/intersep dari persamaan garis regresi tersebut adalah 0,08. Menurut Foote (1979) bahwa rasio slop/intersep dari garis regresi pada minyak tanpa penstabil (*quencher*) adalah  $k_d/k_r$ . Nilai  $k_d$  di dalam metilen klorida adalah  $1,1 \times 10^4$  /detik (Salokhiddinov et al., 1981). Di sisi lain kecepatan oksidasi oksigen singlet ( $k_r$ ) di dalam minyak sawit (pendekatan dari minyak kedelai menurut Jung dan Min, 1991) adalah  $k_d/slope$



Gambar 5. Pengaruh kuersetin terhadap pembentukan angka peroksida minyak kelapa sawit di dalam pelarut metilen klorida dengan sensitiser eritrosin 100 ppm dan diberi cahaya 4.000 lux selama 2 jam.

Dengan demikian,  $k_r = 1,1 \times 10^4 / 0,08 = 1,4 \times 10^5$  /M/detik di dalam metilen klorida. Menurut Doleiden et al., (1974) dalam Lee et al., (1997) kecepatan oksidasi oksigen singlet metil oleat, metil linoleat dan metil linoleat dalam piridin adalah  $0,67 \times 10^5$ ,  $1,3 \times 10^5$  dan  $1,9 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> secara berturut-turut.

Persamaan garis regresi linear dari plot  $[AO_2]^{-1}$  vs.  $[A]^{-1}$  dengan penambahan kuersetin pada konsentrasi  $0,25 \times 10^{-5}$  M;  $0,50 \times 10^{-5}$  M;  $0,75 \times 10^{-5}$  M dan  $10^{-5}$  M berturut-turut adalah  $Y = 8,03 X + 65$  dengan  $R^2 = 0,98$ ;  $Y = 12,52 X + 65$  dengan  $R^2 = 0,98$ ;  $Y = 16,41 X + 65$  dengan  $R^2 = 0,99$  dan  $Y = 22,24 X + 65$  dengan  $R^2 = 0,99$ . Dengan demikian rasio slop/intersep dari masing-masing persamaan tersebut adalah 0,12; 0,19; 0,25 dan 0,34.

Untuk menentukan konstanta laju penstabilan total oksigen singlet ( $k_q + k_{ox-q}$ ), slop/intersep vs. konsentrasi kuersetin diplotkan seperti Gambar 6. Dari hasil plotting diperoleh persamaan garis regresi  $Y = 26800 X + 0,07$ , dengan  $R^2 = 0,98$ . Foote (1979) melaporkan bahwa slop dari plot slop/intersep vs. [kuersetin] adalah  $(k_q + k_{ox-q})/k_r$ .

Maka nilai  $(k_q + k_{ox-q})$  adalah slop x  $k_r$ . Dari persamaan  $Y = 26800 X + 0,07$  diperoleh nilai slop sebesar 26800/M, sementara itu nilai  $k_r$  adalah  $1,4 \times 10^5$  /M/detik. Dengan demikian nilai  $(k_q + k_{ox-q}) = (26800)(1,4 \times 10^5) = 3,8 \times 10^9$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

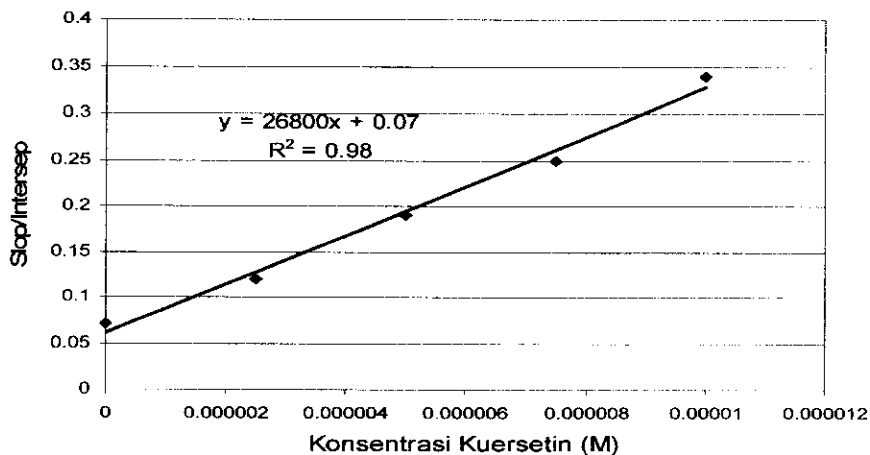
Nilai konstanta kecepatan penstabil total ( $k_q + k_{ox-q}$ ) oleh kuersetin terhadap oksigen singlet yang diperoleh bila dibandingkan dengan  $\alpha$ -tokoferol masih lebih besar. Menurut Yang et al., (2002) nilai konstanta kecepatan penstabil total oleh  $\alpha$ -tokoferol terhadap oksigen singlet adalah sebesar  $4,1 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Kecepatan ini diperoleh pada media minyak kedelai

dalam pelarut aseton dengan sensitiser eritrosin. Sementara itu, dengan menggunakan  $\beta$ -karoten, diperoleh nilai konstanta kecepatan penstabil totalnya sebesar  $7,3 \times 10^9$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

Penelitian Lee, et al., (1997) menggunakan kuenser askorbil palmitat, diperoleh nilai konstanta kecepatan penstabil total pada media metil linoleat sebesar  $1,0 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Nilai ini diperoleh dengan menggunakan pelarut benzen/methanol 4:1 dengan sensitiser klorofil pada pencahayaan 3300 lux. Menurut Min dan Boff (2002a) konstanta kecepatan penstabilan total oksigen singlet oleh agensia penstabil tertentu sangat tergantung pada jumlah ikatan rangkap konjugasi, jenis dan jumlah gugus fungsional pada bagian cincin dari molekul. Selain itu, kemampuan agensia kuenser untuk menstabilkan oksigen singlet sangat dipengaruhi jenis fotosensitiser, jenis pelarut dan konsentrasi oksigen dalam sistem (Edge et al., 1997).

## KESIMPULAN

Dari hasil dan pembahasan dapat diperoleh kesimpulan bahwa kuersetin memiliki kemampuan menstabilkan oksigen singlet. Ini ditunjukkan angka peroksida minyak sawit yang makin rendah pada penambahan kuersetin pada konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1.000 ppm bila dibandingkan dengan kontrol atau tanpa penambahan kuersetin. Di sisi lain, eritrosin memiliki kemampuan yang sangat efektif sebagai fotosensitiser. Bila dibandingkan dengan tanpa eritrosin, angka peroksida minyak sawit lebih rendah daripada angka peroksida minyak sawit pada penambahan eritrosin 100 ppm.



Gambar 6. Plot dari slop/intersep vs. konsentrasi kuersetin



Kuersetin memiliki kemampuan yang lebih efektif sebagai agensia penstabil dibandingkan dengan  $\alpha$ -tokoferol. Ini ditunjukkan dengan angka peroksida minyak sawit yang lebih rendah pada penambahan kuersetin 200 ppm dibandingkan dengan  $\alpha$ -tokoferol 400 ppm. Dari perhitungan kinetika kuensing diperoleh nilai konstanta kecepatan penstabil total ( $k_q + k_{ox-Q}$ ) oleh kuersetin terhadap oksigen singlet sebesar  $3,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Sementara itu, dari mekanisme kuensing didapatkan intersep yang sama dari konsentrasi kuersetin yang berbeda-beda, tetapi slop dari plot meningkat seiring dengan makin meningkatnya konsentrasi kuersetin dari 0,0 hingga  $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Hal ini menunjukkan bahwa kuersetin hanya menstabilkan oksigen singlet untuk mereduksi fotooksidasi pada minyak sawit. Oleh karena itu, kuersetin dapat mereduksi efek fotosensitisasi eritrosin pada oksidasi minyak sawit dengan mekanisme penstabilan oksigen singlet tetapi tidak oleh mekanisme penstabilan sensitiser triplet tereksitasi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah membiayai sebagian penelitian ini melalui Hibah Penelitian Tim Pascasarjana-HPTP (Hibah Pasca) Tahun Anggaran 2004 dan kepada Yayasan Santo Thomas Medan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Amic, D., D. Amic., D. Beslo, and N. Trinajstic. 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta CCACAA* 76 (1) 55-61
- Bors, W., W. Heller, C. Michel and M. Sara. 1990. Flavonoids as Antioxidants: Determination on Radical Scavenging. *Methods Enzymol* 1986: 343-355.
- Carpenter, A.P.Jr. 1979. Determination of Tokopherols in Vegetable Oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (56): 668 - 672.
- Chung, M.G., J.S Kim, H.S Shin. 1997. Effects of Eritrosine on the Chlosterol Oxidative Stability in an Aqueous Model System. *Korean J. Food Sci. Tech.* 28 (4): 197 - 202.
- Cuppett, S. 1998. Plant Production of Biochemical Compunds. *Inform* (9): 548 - 595
- Cuppett, S., M.Schnepf, and C. Hall III. 1997. Natural Antioxidants - Are They a Reality?. In: Shahidi, F. Editor: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Decker, E.A. 2002. Antioxidant Mechanisms. In: Akoh and Min. Editor: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- Edge, R., M.C. Garvey., and T.G. Truscott. 1997. The Carotenoids as Antioxidants a Review. *J. Photochem. And Fotobiol. B: Biology* 41(3): 189-200
- Foote C.S. 1979. Quenching Singlet Oxygen. In: Wasserman and Murray. Editor: *Singlet Oxygen*. Academic Press, New York.
- Gomez, K.A., and A.A. Gomez. 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. Second Ed. An International Rice research Institute Book. John Wiley and Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Hopia, A., and M. Heinonen. 1999. Antioxidant Activity of Flavonol Aglycones and Their Glycosides in Methyl Linoleate. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (76): 139 - 144.
- Jung, M.Y and D.B. Min. 1991. Effect of Quenching Mechanisms of Carotenoids on the Photosensitized Oxidation of Soybean Oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (68): 9: 683- 658.
- Kandaswami, S and E. Middleton. 1997. Flavonoids as Antioxidants. In: Shahidi, F. Editor: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. AOCS PRESS, Champaign, Illinois.
- Kolakowska, A.2002. Lipid Oxidation in Food Systems. In: Sikorski, Z.E. and A. Kolakowsa, A. Editor: *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. CRC Pres, Boca, Raton, London, New York, Washington DC.
- Lee, E.C., and D.B. Min. 1988. A Research Note: Quenching Mechanism of B-Carotene on the Chlorophyll Sensitized Photooxidation of Soybean Oil. *J. Food. Sci.* (53): 1894
- Lee, K.H., M.Y. Jung and S.Y. Kim. 1997. Quenching Mechanism and Kinetics of Ascorbyl Palmitate for the Reduction of the Photosensitized Oxidation of Oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (74): 1053 - 1057.
- Min, D.B and J.M. Boff. 2002a. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Food Sci. and Food Safety.* (1): 58 - 72.
- Min, D.B and J.M. Boff. 2002b. Oxidation of Edible Oil. In: Akoh C.C., and Min, D.B. Editor: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and*

- Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- Nakagawa, K., M. Kawagoe., M.Yoshimura., H.Arata., T. Minamilanwa., M.Nakamura and A. Matsumoto. 2000.** Differential Effect of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice. *J. of Health Sci.* (46): 509 - 512
- Penman, A.R., and M.H. Gordon. 1998.** Antioxidant Properties of Myricetin and Quercetin in Oil and Emulsions. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (75): 169 – 180.
- Proctor A. and Snyder, H. 1987.** Adsorption of Lutein From Soybean Oil on Silicic Acid Isotherm. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (64): 1163 - 1167.
- Raharjo, S. 2004.** Kerusakan Oksidatif pada Makanan. Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rawls, H.R, and P.J. Van Santen. 1970.** A Possible Role for Singlet Oxygen in the Initiation of Fatty Acid Autooxidation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (47): 121 – 125.
- Reische, D. W., D.A. Lillard and R.R. Eitenmiller. 2002.** Antioxidants. In: Akoh C.C., and D.B. Min. Editor: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, PM. Bramley, and J.B. Pridham. 1995.** The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Rad. Res.* 22: 375-383.
- Rohn, S., H.M. Rawel, and J. Kroll. 2004.** Antioxidant Activity of Protein-Bound Quercetin. *J. Ag. Food Chem.* (52): 4725-4729
- Salokhiddinov, K.I., I.M. Byteva, and G.P. Gurinovick. 1981.** Lifetime of Singlet Oxygen in Different Solvents. *Zh. Prikl. Spektrosk.* 34: 892.
- Shahidi, F., and M. Naczk. 1995.** *Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing. Co.Inc.
- Shahidi, F. 1997.** *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. AOCS Press. Champaign, Illinois.
- Shahidi, F., and U.N. Wanasundara. 2002.** **Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fat and Oils.** . In: Akoh C.C., and Min, D.B. Editor: *Food Lemaks: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- Szymusiak, H., and R. Zielinski. 2003.** Structure and Binding Sites of Most Stable Chelates of Neutral, Mono- and Di-Deprotonated Forms of Quercetin with Divalent etal Cations. Department of Technology and Environmental Protection, Poznan University of Economics, Aleja Niepodleglosci, Poland.
- Yang, W.T., L.H. Lee., and D.B. Min. 2002.** Quenching Mechanisms and Kinetic of A- Tokoferol and B-Carotene on the Photosensitizing Effect of Synthetic Food Colorant FD&C red No.3. *J. Food. Sci.* (67): 507 – 510.