

## EFEK PENSTABIL OKSIGEN SINGLET EKSTRAK PEWARNA DARI DAUN BAYAM TERHADAP FOTOOKSIDASI ASAM LINOLEAT, PROTEIN DAN VITAMIN C

Dewa G. Katja<sup>1</sup> dan Edi Suryanto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado

Diterima 09-10-2009; Diterima setelah direvisi 21-10-2009; Disetujui 25-10-2009

### ABSTRACT

**Katja D. G. and E. Suryanto**, 2009. Singlet Oxygen Quenching Effect of Dye Extract from Spinach Leaf on Photooxidation of Linoleic Acid, Protein and Vitamin C.

The objective of this research was to determine singlet oxygen quenching (SOQ) effects of colorant extracts of spinach leave on erythrosine-sensitized photooxidation of linoleic acid, protein and vitamin C. Spinach leave was extracted with water, ethanol 40%, 60% and 80% for 30 minutes. Analyses of antioxidant phytochemicals were based on total phenolic and flavonoid contents. The extracts of spinach leaf evaluated singlet oxygen quenching effect using linoleic acid, protein and vitamin C as substrates each containing 5 ppm erythrosine was exposed under fluorescent light (4000 lux). Extraction with ethanol 40% showed the highest yield of extract, followed with ethanol 60%, water and ethanol 80%. The result showed that solvent was significantly have an effect on total phenolic content, which ethanol 60% extract was the highest, followed with 80 and 40% ethanol extracts and water extract. Contrary, ethanol 40%, extract possessed highest total flavonoid content than water extract, ethanol 60% and ethanol 80% extract. Furthermore, the result determined SOQ, water extract possessed highest SOQ compared with ethanol 40%, 60% and 80% in photooxidation of linoleic acid system. However, ethanol extract 40% and ethanol extract 60% showed that highest activity than ethanol extract 80% and water extract in photooxidation of protein system whereas in photooxidation of vitamin C system, ethanol extract 60% showed highest activity compared with ethanol extract 80, ethanol extract 40% and water. It is concluded that colorant extract of spinach leave showing singlet oxygen quenching effect was a component having phenolic group. .

**Keywords :** color, phenolic extract, spinach leaves, singlet oxygen quenching

### PENDAHULUAN

Keberadaan asam lemak tak jenuh, asam amino, protein, vitamin C dan D, kolesterol dan limonen yang terdapat dalam berbagai bahan pangan sangat peka terhadap oksidasi. Oksidasi yang terjadi pada makanan dapat mengakibatkan hilangnya kandungan nutrisi dan menimbulkan aroma yang tidak diinginkan, kemungkinan membentuk senyawa toksik, dan perubahan warna yang menyebabkan makanan tersebut rusak mutunya atau bahkan menjadi tidak aman untuk dikonsumsi. Reaksi oksidasi dapat terjadi baik oleh adanya oksigen triplet diradikal atau oksigen singlet non-radikal. Pada makanan, oksigen singlet dapat terbentuk dari oksigen triplet melalui reaksi fotosintesa. Oksidasi oksigen singlet pada makanan sangat signifikan karena laju oksidasi oksigen singlet lebih besar dibandingkan oksidasi oksigen triplet. Oksigen singlet mampu meningkatkan laju oksidasi makanan bahkan pada suhu yang rendah (Rawls and Van Santen, 1970). Oksidasi oksigen singlet dapat menghasilkan komponen-komponen baru, yang komponen

tersebut tidak ditemukan pada oksidasi oksigen triplet dalam makanan (Frankel., 2005; Bradley dan Min, 1992).

Sejumlah produk makanan seperti minyak nabati, susu, minuman bervitamin dan berbagai produk olahan daging diberi pencahayaan agar menarik perhatian konsumen serta memungkinkan konsumen menilai kualitas bahan makanan tersebut secara langsung. Padahal produk bahan makanan tersebut mengandung sensitiser seperti riboflavin, klorofil, mioglobin dan pewarna sintetik yang diizinkan dalam makanan seperti eritrosin, banyak terdapat pada produk makanan atau sengaja ditambahkan agar kelihatan lebih menarik. Senyawa-senyawa tersebut dilaporkan dapat berperan sebagai fotosensitizer seperti klorofil dalam minyak kedele (Jung dan Min, 1991), riboflavin di dalam susu, vitamin C dan D (Satter dan de Man, 1975; Sahbaz, 1993; Jung *et al.*, 1995; King dan Min, 2002), mioglobin dalam daging (Whang dan Peng, 1988). Fotosensitizer mampu menyerap

energi cahaya serta mentransfer energinya kepada oksigen triplet sehingga akan terbentuk oksigen singlet. Oksigen singlet mudah bereaksi dengan senyawa yang kaya elektron seperti lipida (asam lemak tak jenuh), protein, vitamin C ataupun vitamin D yang banyak terdapat dalam bahan makanan. Selain itu, pengaruh cahaya terhadap aktivitas antifotooksidatif dari pewarna alami juga sangat jarang diselidiki dalam produk makanan (Delgado-Vargas dan Parades-Lopez, 2003; Matsufuji *et al.*, 2004). Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk menentukan efek penstabil oksigen singlet ekstrak pewarna dari daun bayam terhadap fotooksidasi asam linoleat, protein dan vitamin C yang fotosensitasi dengan eritrosin sebagai sensitiser.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Sampel yang akan digunakan adalah daun bayam yang diperoleh dari kebun petani di Tomohon. Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, etanol, kloroform, asam asetat, aseton, etil asetat, asam trifluoroasetat, asam metafosfat, kalium iodida, natrium tiosulfat, eritrosin, natrium karbonat, riboflavin, vitamin C, protein (bovine serum albumin, BSA), Folin-Ciocalteu, aluminum klorida, amilum diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany). Asam linoleat diperoleh dari Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO). Asam galat, kaempferol, rutin, myricetin 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) dan kuersetin dari Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin). Amonium molibdat diperoleh dari Fluka AG, Buchs. Alat yang digunakan adalah *water bath*, desikator, alat-alat gelas, mikropipet, *vortex mixer*, pengaduk magnet, timbangan analitik, oven, botol serum, gelas Erlenmeyer, mikro buret, mikro pipet, rotari evaporator, pengukur intensitas cahaya (light meter, Leybold-Heraeus), 4 buah lampu *flourescent* 15 Watt (Silvania), kotak cahaya terbuat berukuran (70 x 100 x 50 cm) dan spektrofotometer UV-Vis.

### Ekstraksi pewarna dari daun bayam

Ekstraksi daun bayam dilakukan dengan masing-masing pelarut air, etanol 40%, etanol 60% dan etanol 80%. Metode ekstraksi ini menggunakan cara maserasi selama 30 menit. Sebanyak 50 g daun bayam merah segar dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer yang

berkapasitas 500 mL, kemudian ditambahkan pelarut etanol 40% sebanyak 250 mL. Ekstraksi dilakukan dalam ruangan tanpa cahaya selama 30 menit. Selanjutnya dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya dengan rotari evaporator sehingga diperoleh ekstrak etanol daun bayam. Dengan cara yang sama dilakukan dengan pelarut etanol 60%, etanol 80% dan pelarut air panas. Keempat ekstrak kemudian ditimbang dan disimpan pada  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  sebelum digunakan untuk analisis dan pengujian.

### Penentuan kandungan total fenolik

Kandungan total fenolik dalam ekstrak pewarna daun bayam ditentukan dengan metode Jeong *et al.* (2005). Sampel ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (50%) dalam tabung reaksi dan kemudian campuran ini divortex selama 3 menit. Setelah interval waktu 3 menit, 1 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% ditambahkan. Selanjutnya campuran disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi ekstrak dibaca dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  750 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan asam galat sebagai standar.

### Penentuan kandungan total flavonoid

Prosedur penentuan kandungan flavonoid menggunakan metode Meda *et al.* (2005). Lima mililiter ekstrak pewarna daun bayam ditambahkan dengan 5 mL aluminium klorida 2% yang telah dilarutkan dalam metanol, kemudian divortex dan ditera pada  $\lambda$  415 nm. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan kuersetin sebagai standar.

### Penentuan aktivitas ekstrak pewarna terhadap fotooksidasi asam linoleat

Penentuan kemampuan penstabil oksigen singlet (SOQ) dari ekstrak pewarna daun bayam terhadap asam linoleat menggunakan metode Lee *et al.* (1997) dengan sedikit dimodifikasi. Pengaruh keempat ekstrak pewarna terhadap oksidasi oksigen singlet asam linoleat 0,03 M menggunakan konsentrasi 500 ppm yang dipersiapkan dalam etanol dan mengandung eritrosin 5 ppm sebagai sensitiser. Sampel dari campuran tersebut sebanyak 10 mL diambil dan

dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 30 mL yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya fluoresen 4.000 lux selama 5 jam dengan pengamatan setiap 1 jam. Angka peroksida diukur dengan metoda AOCS (1990). Penelitian yang sama dilakukan pada kondisi tanpa cahaya.

### **Penentuan aktivitas ekstrak pewarna terhadap fotooksidasi protein**

Penentuan kemampuan SOQ dari ekstrak pewarna daun bayam terhadap protein (bovine serum albumin, BSA) menggunakan metode Oh *et al.* (2006). Sebanyak 500  $\mu$ L ekstrak pewarna daun bayam (500 ppm), 10 mg bovine serum albumin (BSA) dan eritrosin 5 ppm dan dilarutkan dengan 2 mL buffer fosfat 0,15 M (pH 7,4). Sampel dari campuran tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 10 mL yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya *fluorescent* 4.000 lux selama 4 jam. Setelah 4 jam pencahayaan, 0,5 mL sampel ditambah dengan 2 mL 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) 2,5 M, divortex dan diinkubasi selama 45 menit dan divortex tiap 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 2 mL TCA 20% dan disentrifus selama 5 menit, supernatan dibuang dan endapan yang terjadi ditambahkan dengan TCA 10%, disentrifus selama 5 menit dan supernatan dibuang. Endapan yang terjadi ditambahkan 3 x 2 mL etanol-etil asetat (1:1) dan disentrifusi selama 5 menit dan supernatan dibuang. Selanjutnya endapan yang terjadi ditambahkan 3 mL urea 9 M yang telah dilarutkan dalam NaOH 0,4 M, divortex sampai homogen dan dibaca kandungan protein karbonil dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  390 nm. Penelitian yang sama dilakukan pada kondisi tanpa cahaya.

### **Penentuan ekstrak pewarna terhadap fotooksidasi vitamin C**

Pengaruh ekstrak pewarna daun bayam terhadap fotooksidasi vitamin C, diteliti menggunakan metode Jung *et al.* (1998) yang dimodifikasi. Ketiga ekstrak pewarna daun bayam (500 ppm) ditambahkan ke dalam larutan buffer fosfat yang mengandung 5 ppm eritrosin dan 100 ppm vitamin C. Sampel diambil sebanyak 5 mL

dan dimasukkan ke dalam botol serum berukuran 25 mL serta botol ditutup dengan sumbat karet. Sampel tersebut diletakkan di dalam kotak cahaya fluoresen (4000 lux) selama 20 menit dengan pengamatan setiap 5 menit pada suhu kamar. Konsentrasi vitamin C dianalisis dengan cara 1 mL sampel ditambahkan dengan 1 mL reagen HPO<sub>3</sub>-asam asetat dan 2 mL ammonium molibdat 1% dalam asam sulfat 0.3 M kemudian diinkubasi selama 30 menit dan dibaca absorbannya dengan menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  760 nm. Eksperimen yang sama dilakukan pada kondisi tanpa cahaya.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Ekstraksi Pewarna Merah Daun Bayam**

Ekstraksi warna merah daun bayam yang dilakukan dengan menggunakan pelarut air panas 90°C dan etanol dengan konsentrasi 40, 60 dan 80%, masing-masing menghasilkan rendemen berturut-turut adalah 9,66; 11,98; 11,66 dan 6,08 Rendemen paling tinggi diperoleh dari pelarut etanol 40% (E40) diikuti etanol 60% (E60) air panas (A) dan yang paling sedikit dihasilkan oleh etanol 80% (E80). Adapun tujuan penggunaan air dan etanol dengan berbagai konsentrasi sebagai pelarut pada proses ekstraksi adalah untuk mendapatkan komponen fenolik yang paling banyak. Dainith (1994) menyatakan bahwa penambahan pelarut pada suatu bahan harus didasarkan pada sifat kelarutan dari pelarut yang digunakan dan sifat dari komponen yang akan dilarutkan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar, cenderung larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar cenderung larut pada pelarut non polar.

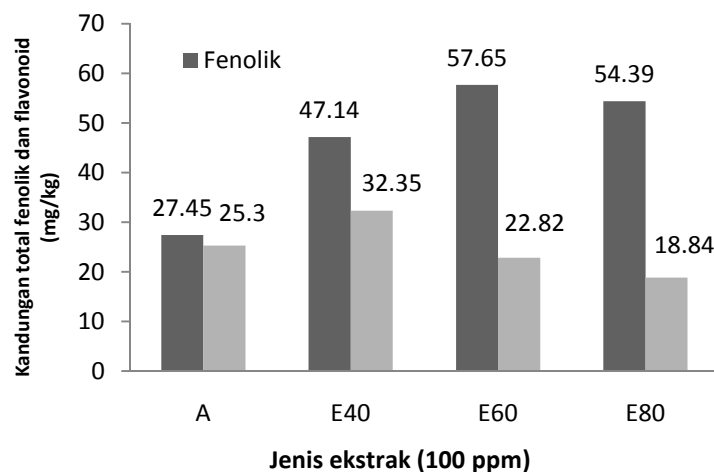
Komponen kimia yang diduga paling banyak berkontribusi pada rendemen berbagai pelarut adalah senyawa berwarna merah dari daun bayam merah itu sendiri dan senyawa fenolik. Menurut Dey dan Harbone (1989), komponen fenolik dapat diekstraksi dari bahan tumbuhan dengan menggunakan pelarut polar seperti air, metanol, etanol, aseton atau etil asetat, selanjutnya dinyatakan pula bahwa hampir semua pigmen yang berwarna merah pada tumbuhan larut dalam air atau pelarut polar lainnya.

### **Kandungan total fenolik dan flavonoid ekstrak daun bayam**

Analisis kandungan total fenolik dan flavonoid dilakukan untuk mengetahui potensi dari ekstrak pewarna alami daun bayam merah

sebagai penangkal radikal bebas dan penstabil oksigen singlet. Analisis total kandungan fenolik dan flavonoid dapat dilihat pada gambar 1. Kandungan total fenolik meningkat dari pelarut air sampai pelarut etanol 60% dan menurun pada pelarut etanol 80%. Tingginya kandungan fenolik yang terekstraksi disebabkan karena tingkat

kepolaran pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Menurut Shahidi (1997) bahwa pelarut polar seperti metanol dan etanol merupakan pelarut yang sangat luas digunakan dan efektif untuk ekstraksi komponen-komponen fenolik dari bahan alam.



**Gambar 1.** Kandungan total fenolik dan flavonoid ekstrak daun bayam (A: air, E40: ekstrak etanol 40%, E60: ekstrak etanol 60%, E80: ekstrak etanol 80%)

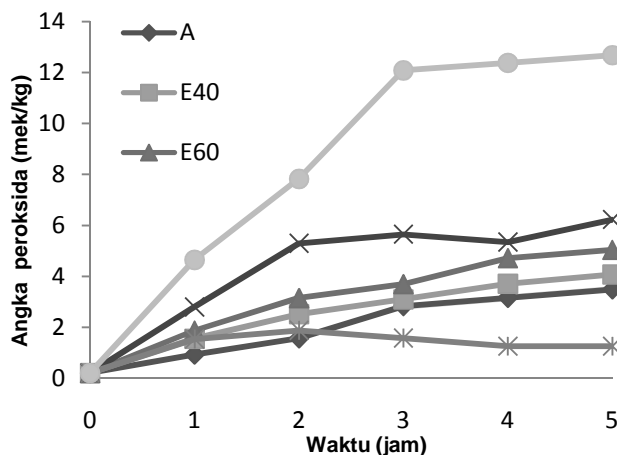
Penggunaan etanol 60% sebagai pelarut memberikan nilai tertinggi sedangkan nilai terendah dihasilkan oleh ekstrak dengan pelarut air. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa-senyawa fenolik pada warna merah daun bayam lebih mudah larut pada pelarut etanol dengan konsentrasi 60%, sebaliknya kurang larut pada pelarut air. Menurut Peri dan Pompei (1971), kandungan total fenolik dapat dihasilkan dari sejumlah senyawa seperti fenolik sederhana (termasuk derivat asam hidroksibenzoat, asam hidroksi sinamat dan flavonoid), non tanin flavan (termasuk antosianin, katekin dan leukoantosianin), tanin terhidrolisis (termasuk asam galat dan asam elagat) dan tanin terkondensasi (termasuk polimer dan kopolimer katekin dan leukoantosianin).

Gambar 1 menunjukkan bahwa total kandungan flavonoid paling tinggi ada pada E40 sebanyak 32,30 mg/kg, diikuti oleh ekstrak air sebanyak 25,80 mg/kg, E60 sebanyak 22,80 mg/kg dan E80 sebanyak 18,80 mg/kg. Tingginya kandungan flavonoid pada ekstrak dengan E40 mungkin disebabkan oleh sifat kepolaran flavonoid dibandingkan dengan senyawa-senyawa fenolik yang lain. Hal ini sejalan dengan

pernyataan Larson (1988) bahwa komponen fenolik seperti flavonoid pada tanaman bersifat polar. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan jenis pelarut berpengaruh nyata terhadap kandungan total flavonoid, dimana E40 memberikan nilai paling tinggi, diantara jenis pelarut, sedangkan nilai paling rendah ditunjukkan oleh E60 dan E80. Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal bebas termasuk anion super oksida radikal peroksida lemak dan radikal hidroksil (Shahidi, 1997), akan tetapi flavonoid juga dapat bertindak sebagai penstabil oksigen singlet (Tournaire *et al.*, 1993).

#### Aktivitas penstabil oksigen singlet terhadap fotooksidasi asam linoleat

Pengujian aktivitas penstabil oksigen singlet ekstrak pewarna daun bayam terhadap asam linoleat dilakukan setelah fotooksidasi pada asam linoleat menggunakan eritrosin sebagai fotosensitizer dengan ekstrak daun bayam konsentrasi 500 ppm. Aktivitas penstabil oksigen singlet terhadap asam linoleat dapat dilihat pada gambar 2.



**Gambar 2.** Efek 500 ppm ekstrak pewarna daun bayam terhadap pembentukan hidroperoksida dalam fotooksidasi asam linoleat yang diinduksi oleh eritrosin selama 5 jam. (A: air, E40: ekstrak etanol 40%, E60: ekstrak etanol 60%, E80: ekstrak etanol 80 dan TC: tanpa cahaya)

Hasil pengujian menunjukkan bahwa angka peroksida yang terbentuk dari asam linoleat menurun dibandingkan dengan kontrol (dengan pemaparan cahaya). Efek penstabil oksigen singlet terhadap asam linoleat pada konsentrasi ekstrak 500 ppm terhadap ekstrak air, E40, E60 dan E80 memberikan efek penstabil oksigen singlet yang berbeda-beda. Hal ini dapat dilihat dari besarnya angka peroksida yang diperoleh masing-masing sampel uji berbeda-beda. Semakin tinggi nilai peroksida menunjukkan semakin tinggi terjadinya oksidasi pada asam linoleat.

Dari gambar 2 dapat dilihat bahwa potensi penstabil oksigen singlet paling besar ditunjukkan oleh ekstrak dengan pelarut air, dimana nilai peroksida yang didapat lebih rendah dibandingkan dengan sampel uji yang lain, bahkan mendekati nilai peroksida yang dihasilkan kontrol tanpa cahaya. Hasil analisis menunjukkan bahwa lamanya pencahayaan dan jenis ekstrak berpengaruh nyata terhadap aktivitas penstabil oksigen singlet. Aktivitas paling tinggi ditunjukkan oleh ekstrak air dimana hal ini dapat dilihat dari nilai peroksida yang lebih rendah dengan nilai 2,39%, dibandingkan dengan prosentase sampel uji yang lain.

Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak dengan pelarut air mampu berfungsi sebagai penstabil oksigen singlet lebih kuat dibanding dengan ekstrak yang lain. Dari gambar 3 juga dapat dilihat bahwa potensi penstabil oksigen singlet yang paling besar dimulai dari ekstrak dengan pelarut air, etanol 40%, etanol 60% dan yang terkecil potensinya adalah ekstrak dengan pelarut etanol 80%. Hal ini terjadi karena

kandungan senyawa aktif sebagai penstabil oksigen singlet lebih banyak terdapat di dalam ekstrak daun bayam merah dengan pelarut air, mengingat pelarut polar seperti air, methanol dan etanol merupakan pelarut yang banyak melarutkan senyawa-senyawa yang berperan sebagai antioksidan.

Penstabilan oksigen singlet bisa terjadi secara fisik maupun kimiawi. Penstabilan secara fisik jika senyawa yang berinteraksi dengan oksigen singlet tidak mengalami perubahan yang permanen. Sedangkan secara kimiawi berarti terjadi pembentukan produk oksidasi. Pada fotooksidasi asam linoleat penstabilan oksigen singlet terjadi secara kimiawi dimana pada proses fotooksidasi terbentuk produk oksidasi yaitu senyawa hidroperoksida.

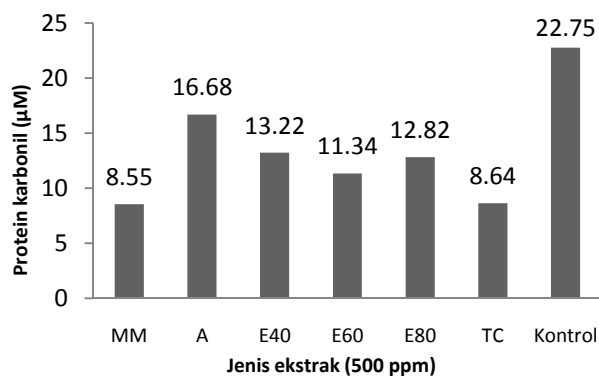
Eritrosin sebagai fotosensitizer dapat menyerap cahaya dan mentransformasikannya menjadi keadaan tereksitasi selanjutnya berubah menjadi sensitizer pada keadaan triplet ( $^3\text{Sen}^*$ ) yang kurang stabil. Sensitizer dapat mentransfer energinya terhadap oksigen pada keadaan triplet menjadi singlet. Selain adanya eritrosin sebagai fotosensitizer cahaya pun sangat berpengaruh pada pembentukan oksigen singlet. Hal ini dapat terlihat pada hasil penelitian dimana kontrol tanpa cahaya (TC) menghasilkan angka peroksida yang sangat kecil dibandingkan dengan kontrol dengan cahaya yang menunjukkan angka peroksida yang besar. Hal ini menunjukkan bahwa oksigen singlet yang terbentuk pada keadaan tanpa cahaya sangatlah kecil sehingga angka peroksida yang terbentuk pula kecil.

Asam lemak tidak jenuh dengan ikatan

rangkap lebih dari satu (atau yang dikenal dengan *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) lebih rentan terhadap oksidasi oksigen singlet yang dipicu oleh radikal dibandingkan asam lemak tak jenuh dengan ikatan rangkap tunggal. Hal ini disebabkan oleh karena lebih rendahnya energi aktivasi untuk awal pembentukan radikal bebas pada PUFA dibandingkan asam lemak jenuh ikatan rangkap tunggal (Raharjo, 2006).

### Aktivitas penstabil oksigen singlet terhadap fotooksidasi protein

Aktivitas penstabil oksigen singlet diukur setelah dilakukan fotooksidasi protein selama 4 jam, hasil pengujian dapat dilihat pada Gambar 3. Dari Gambar 3, fotooksidasi dilakukan dengan penambahan ekstrak dengan konsentrasi 500 ppm.



**Gambar 3.** Efek 500 ppm ekstrak pewarna daun bayam terhadap pembentukan protein karbonil dalam fotooksidasi bovin serum albumin (BSA) yang diinduksi oleh eritrosin selama 4 jam (MM: mula-mula, A: air, E40: ekstrak etanol 40%, E60: ekstrak etanol 60% dan E80: ekstrak etanol 80% dan TC: tanpa cahaya)

Laju reaksi dari protein dan oksigen singlet paling banyak dipengaruhi oleh jumlah dan jenis dari asam amino yang memiliki ikatan rangkap atau atom sulfur kaya elektron. Selain itu, laju reaksi oksidasi oksigen singlet ini juga dipengaruhi oleh sejumlah faktor diantaranya pH, suhu, konstanta dielektrik dari medium dan keberadaan dari 5 asam amino reaktif oksigen singlet yakni triptofan, histidin, tirosin, metionin dan sistein. Asam amino lain bereaksi dengan oksigen singlet mempunyai kecepatan 2 hingga 3 kali lebih rendah dibandingkan triptofan, histidin, tirosin, metionin dan sistein. Triptofan, histidin dan tirosin memiliki ikatan rangkap dan dapat bereaksi langsung dengan oksigen singlet elektrofilik. Metionin dan sistein memiliki atom sulfur dengan 4 elektron bebas yang dapat secara

Semua ekstrak menunjukkan kemampuan sebagai penstabil oksigen, karena kandungan protein karbonilnya lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Apabila dibandingkan diantara ekstrak pewarna, kandungan protein karbonil paling kecil terdapat pada E60, sedangkan yang paling tinggi terdapat pada A diikuti oleh E80 dan E40. Hal ini berarti bahwa pada ekstrak E60, aktivitas penstabil oksigen singletnya paling tinggi diantara ekstrak pewarna daun bayam dengan pelarut lainnya. Hasil ini juga berhubungan dengan jumlah kandungan fenolik yang dihasilkan dalam E60 lebih tinggi dari pada ekstrak yang lainnya. Senyawa fenolik yang terdapat dalam daun bayam diduga kuat mampu berperan sebagai penstabil oksigen singlet.

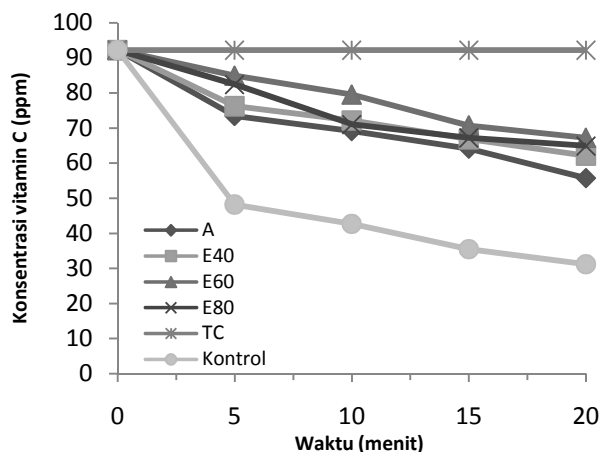
cepat bereaksi dengan oksigen singlet elektrofilik. Berubahnya asam amino oleh oksigen singlet, akan menyebabkan protein atau enzim akan terdenaturasi, kehilangan fungsinya dan dapat mengalami penggumpalan.

### Aktivitas penstabil oksigen singlet terhadap fotooksidasi vitamin C

Aktivitas penstabil oksigen singlet terhadap fotooksidasi vitamin C dengan ekstrak daun bayam merah konsentrasi 500 ppm dapat dilihat pada Gambar 4. Pada fotooksidasi vitamin C dengan ekstrak daun bayam merah 500 ppm dapat dilihat bahwa ekstrak dengan beberapa pelarut tersebut sudah dapat menstabilkan oksigen singlet. Hal ini terbukti dengan adanya penurunan konsentrasi vitamin C yang lebih sedikit

dibandingkan dengan kontrol. Pada ekstrak dengan pelarut etanol 60% menunjukkan potensi penstabil oksigen singlet yang lebih kuat dari pada ekstrak dengan pelarut air, etanol 40% dan etanol 80%. Hal ini dibuktikan pada ekstrak etanol 60%, konsentrasi vitamin C yang berkurang selama 20

menit hanya sekitar 32% sedangkan pada pelarut air, etanol 40% dan etanol 80% konsentrasi vitamin C yang berkurang berturut-turut adalah 44,3; 37,9 dan 35% sedangkan pada kontrol konsentrasi vitamin C yang berkurang pada pencahayaan sampai 20 menit adalah 68,8%.



**Gambar 4.** Efek 500 ppm ekstrak pewarna daun bayam terhadap fotooksidasi vitamin C yang diinduksi oleh eritrosin selama 20 menit. Simbol seperti dalam gambar 2

Perbandingan potensi penstabil oksigen singlet dari beberapa konsentrasi dan pelarut dapat dilihat pada gambar 4. Dimana melalui gambar tersebut dapat dilihat bahwa konsentrasi ekstrak daun bayam merah serta pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi sangat berpengaruh terhadap potensi penstabil oksigen singlet. Potensi penstabil oksigen singlet dikatakan tinggi jika konsentrasi vitamin C dalam sampel berkurang tidak terlalu signifikan. Seperti dapat dilihat pada gambar 16 semakin besar konsentrasi ekstrak daun bayam semakin besar pula potensi penstabil oksigen yang terjadi. Hal ini dibuktikan dengan semakin besar konsentrasi ekstrak daun bayam merah semakin kecil penurunan konsentrasi vitamin C pada sampel.

## KESIMPULAN

Keempat ekstrak pewarna memiliki kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, tetapi ekstrak etanol 60% memiliki senyawa fenolik yang lebih besar daripada ekstrak etanol 80%, ekstrak etanol 40 dan ekstrak air. Ekstrak pewarna daun bayam dengan beberapa pelarut seperti air, etanol 40%, etanol 60% dan etanol 80% mempunyai potensi dalam penstabil oksigen singlet dalam fotooksidasi asam linoleat, protein dan vitamin C. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak air memiliki kemampuan penstabil

oksigen singlet paling kuat daripada ekstrak etanol 40%, etanol 60% dan etanol 80% dalam fotooksidasi asam linoleat sedangkan ekstrak etanol 60% dan 80% menunjukkan aktivitas penstabil oksigen singlet paling kuat dalam sistem fotooksidasi protein dan vitamin C. Dari hasil penelitian juga diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak pewarna dari daun bayam memiliki efek sebagai penstabil oksigen singlet dan menindikasikan adanya kandungan senyawa fenolik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian Perguruan Tinggi: Penelitian Hibah Strategis Nasional Tahun 2009, Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan, Departemen Pendidikan Nasional.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bradley, D.G. dan D.B. Min. 1992. Singlet Oxygen Oxidation of Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31: 211-236.
- Delgado-Vargas, F. dan O. Parades-Lopez. 2003. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical.* CRC Press, New York.

- Dey, P.M. dan J.B. Harbone. 1989. *Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics*. Academic Press. New York.
- Frankel, E.N. 2005. *Lipid Oxidation*. The Oily Press. Dundee, Scotland.
- Jeong, S.M., S.Y. Kim, D.R. Kim, S.C. Jo, K.C. Nam, D.U. Ahn and S.C. Lee. 2004. "Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels". *J. Agric. Food Chem.* 52: 3389-3393.
- Jung, M.Y. E. Choe dan D.B. Min. 1991. Effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Tocopherol on Chlorophylls Photosensitized Oxidation of Soybean Oil. *J. Food. Sci.* 56: 807-515.
- Jung, M.Y., S.K. Kim dan S.Y. Kim. 1995. Riboflavin-Sensitized Photooxidation of Ascorbic Acid: Kinetics and Amino Acid Effects. *Food Chemistry.* 53:397-403.
- Larson, R.A. 1988. The Antioxidants of Highest Plants. *Phytochemistry.* 27: 969-977.
- Lee, K.H., M.Y. Jung dan S.Y. Kim. 1997. Quenching Mechanism and Kinetics of Ascorbyl Palmitate for the Reduction of the Photosensitized Oxidation of Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1053-1057.
- Matsufuji, H., M. Chino dan M. Takeda. 2004. Effects of Paprika Pigments on Oxidation of Linoleic Acid Stored in the Dark or Exposed to Light. *J. Agric. Food Chemistry.* 38: 3601-3605.
- Meda, A., C.E. Lamien, M. Romito, J. Miliogo dan O.G. Nacoulina. 2005. Determination of the Total Phenolic, Flavonoid, and Proline Contents in Burkina Faso Money, as well as their Radical Scavenging Activity. *Food Chemistry.* 91:571-577.
- Min, D.B. dan J.M. Boff. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Food Science and Food Safety.* 1: 58-72.
- Oh, Y.S., E.S. Jang, J.Y. Boce, S.H. Yoon dan M.Y. Jung. 2006. Singlet Oxygen Quenching Activities of Various Fruit and Vegetable Juices and Protective Effects of Apple and Pear Juices Against Hemolysis and Protein Oxidation Induced by Methylene Blue Photosensitization. *J. Food. Sci.* 4: 260-268.
- Peri, C. dan Pompei C. 1971. Estimation of Different Phenolic Groups in Vegetable Extracts. *Phytochemistry.* 10: 2187-2189.
- Raharjo, S. 2006. *Kerusakan Oksidatif Pada Makanan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Rawls, H.R. dan P.J. Van Santen. 1970. Possible Role of Singlet Oxidation in the Initiation of Fatty Acid Autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47: 121-125.
- Sattar, A. dan deMan J.M. 1975. Photooxidation of Milk and Milk Products. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 7:13-37.
- Sahbaz, F. 1993. Photosensitized Decomposition of Ascorbic Acid in the Presence of Riboflavin. *Food Chemistry.* 46: 177-182.
- Shahidi, F. 1997. Natural Antioxidants: An Overview. Dalam Shahidi (eds). *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Application*. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Tournaire, C., S. Croux dan M.T. Maurette. 1993. Antioxidant Activity of Flavonoids: Efficiency of Singlet Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) Quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19: 205-215.
- Whang, K. dan I.C. Peng. 1988. Photosensitized Lipid Peroxidation in Gr Tsuda, T., K. Ohshima, S. Kawakishi dan T. Osawa. 1994. Antioxidative Pigment Isolated from The seed of *Phaseolus vulgaris* L. Extract. *JAOCs.* 42: 248-251.