

MEKANISME DAN KINETIKA ANTIFOTOOKSIDASI BIKSIN PADA SISTEM METIL LINOLEAT

[Mechanism and Kinetic of Antiphotooxidation of Bixin in Metil Linoleat System]

Ardiyanto Pranata¹⁾, Umar Santoso²⁾, Sri Raharjo²⁾, dan Haryadi²⁾

¹⁾Mahasiswa S3 Ilmu Pangan

²⁾Dosen Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Diterima September 2006/ Disetujui 25 Mei 2007

ABSTRACT

Bixin belongs to the carotenoid group, present in Bixa orellana tree. It has conjugated double bonds which plays a role as an antiphotooxidant. The objectives of this study were to analyze the quenching mechanisms and kinetics of bixin in photosensitized oxidation of methyl linoleate. The quenching mechanism and kinetic of bixin were studied by the steady-state kinetic method. Samples of 0, 0.25 x 10⁻⁵, 0.5 x 10⁻⁵, 0.75 x 10⁻⁵, 1.0 x 10⁻⁵, 2.0 x 10⁻⁵ and 3.0 x 10⁻⁵ M bixin were prepared in ethanol that also contained 0.03, 0.06, 0.09 and 0.12 M methyl linoleate and 11.36 x 10⁻⁶ M of erythrosine stored under fluorescent light (4000 lux) at room temperature for 2 hours. The extent of photosensitized oxidation of methyl linoleate was expressed as peroxide value.

The steady-state kinetic study indicated that bixin quenched singlet oxygen and exhibited triplet sensitizer quenching mechanism (to minimize the erythrosine photosensitized oxidation of methyl linoleate). The total quenching rate constant of bixin was 7.7 x 10⁹ M⁻¹s⁻¹.

Key words: bixin, quencher, erythrosine, singlet oxygen

PENDAHULUAN

Asam lemak tak jenuh, asam amino, vitamin dan terpena mudah mengalami fotooksidasi dengan adanya cahaya dan sensitiser. Klorofil, riboflavin dan mioglobin dapat berperan sebagai sensitiser pada bahan pangan. Frankel (1998) menyatakan bahwa oksigen singlet dapat dihasilkan dari oksigen triplet dengan adanya sensitiser dan cahaya.

Oksidasi oleh oksigen singlet dapat dihambat dengan penambahan senyawa-senyawa penstabil seperti tokoferol, β -karoten, likopen, lutein, asam askorbat dan bixin. Yang et al., (2002) menyatakan bahwa α -tokoferol, β -karoten berperan sebagai penstabil oksigen singlet dalam minyak kedelai. Sedangkan Lee dkk. (1997) menyatakan bahwa askorbil palmitat dapat berperan sebagai penstabil oksigen singlet pada oksidasi asam linoleat. Peneliti lain Huang et al., (2004) melaporkan bahwa asam askorbat dan sodium azide dapat berfungsi sebagai penstabil oksigen singlet yang disensitasi oleh riboflavin.

Bixin merupakan kelompok karotenoid yang memiliki 9 ikatan rangkap terkonjugasi (Di Mascio dkk, 1989; Krinsky, 1994). Bixin dilaporkan memiliki kemampuan sebagai antioksidan pada autooksidasi triasil gliserol (Haila et al., 1996; Haila, 1999). Bixin dapat pula berperan sebagai penstabil oksigen singlet dalam sistem naptilena dipropionat (Di Mascio dkk, 1989). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui mekanisme penstabilan bixin terhadap fotooksidasi metil

linoleat yang diinduksi oleh cahaya *fluorescent* dengan eritrosin sebagai sensitiser.

Pembentukan metil linoleat teroksidasi berkurang oleh penstabilan oksigen singlet atau eritrosin triplet (Lee et al., 1997). Persamaan kinetika *steady-state* untuk penstabilan oksigen singlet dapat ditulis dengan persamaan:

$$\left\{ \frac{d[MLO_2]}{dt} \right\}^{-1} = K^{-1} \left\{ \frac{(1 + K_q[Q] + K_{ox-Q}[Q] + K_d)}{K_t[ML]} \right\}$$

Dalam hal ini :

K = laju pembentukan oksigen singlet

MLO₂ = metil linoleat teroksidasi

K_t = konstanta laju reaksi metil linoleat dengan oksigen singlet

ML = metil linoleat

K_q = konstanta laju reaksi penstabilan oksigen singlet secara fisika

K_{ox-Q} = konstanta laju reaksi penstabilan oksigen singlet secara kimia oleh bixin

K_d = laju berkurangnya oksigen singlet dalam pelarut.

Dari persamaan tersebut dapat dibuat grafik hubungan [MLO₂]⁻¹ dan [ML]⁻¹ pada berbagai konsentrasi bixin untuk menentukan persamaan regresi linier untuk masing-masing konsentrasi bixin sehingga diperoleh slop dan intersepnya. Slop adalah K⁻¹ dan intersepnya adalah K⁻¹ {K_d + K_q[Q] + K_{ox-Q}[Q]/K_t} sehingga diperoleh grafik hubungan [MLO₂]⁻¹ dan [ML]⁻¹,

slop dari persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik ini digunakan untuk menghitung konstanta laju penstabilan oksigen singlet oleh biksin atau β -karoten.

METODOLOGI

Alat dan bahan

Metil linoleat dari Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Biksin diperoleh dari ChromaDex (USA), β -karoten diperoleh dari Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Kalium iodida, asam asetat, kloroform, etanol, natrium tiosulfat, eritrosin dan amilum dari Merck (Darmstadt, Germany). Alat-alat gelas, kotak generator oksigen singlet berukuran 70 x 50 x 60 cm yang dilengkapi motor *synchronous* 5 rpm dan 4 buah lampu *fluorescent* 15 watt (Sylvania) dan 4 buah lampu *incandescent* 40 watt (Philips), propipet, mikrobiuret, timbangan analitik, *water bath* dan termometer.

Pengaruh biksin dan β -karoten pada fotooksidasi metil linoleat

Prosedur untuk mengetahui pengaruh biksin terhadap fotooksidasi 0,03 M metil linoleat digunakan metode Lee dan Min (1988) yang dimodifikasi. Konsentrasi biksin masing-masing: 0; 0,25; 0,5; 0,75 dan $1,0 \times 10^{-5}$ M didalam etanol mengandung $11,36 \times 10^{-6}$ M eritrosin. Pada penelitian ini, β -karoten digunakan pada konsentrasi yang sama sebagai pembanding. Sampel diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam botol serum berkapasitas 25 mL (25 mL, 60 mm x 30 mm, kondisi botol sama), yang dilengkapi dengan sumbat karet. Sampel tersebut diletakkan di dalam kotak yang

dikenai cahaya *fluorescent* dengan intensitas 4000 lux. Angka peroksida diukur setiap selang waktu 1 jam selama 5 jam dengan metode lodometri (Anonim, 1980).

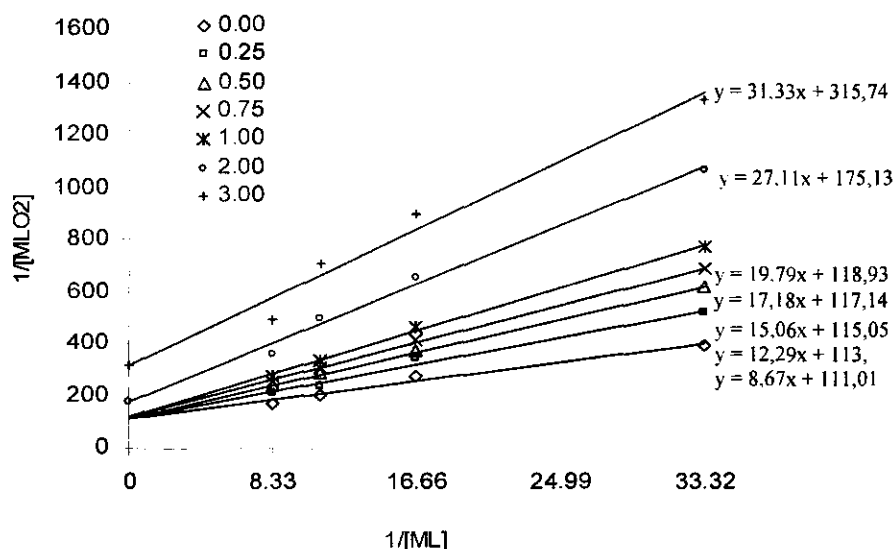
Penentuan mekanisme dan kinetika antifotooksidasi biksin pada sistem metil linoleat

Mekanisme dan kinetika biksin dengan eritrosin sebagai sensitiser terhadap fotooksidasi metil linoleat dipelajari melalui pendekatan metode kinetika *steady-state* (Foote et al., 1970), dengan menggunakan konsentrasi 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 dan $3,0 \times 10^{-5}$ M. Konsentrasi metil linoleat yang digunakan adalah 0,03; 0,06; 0,09 dan 0,1 M didalam etanol yang mengandung eritrosin ($11,36 \times 10^{-6}$ M) pada suhu kamar (Pranata dkk., 2006). Sampel diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam botol serum berkapasitas 25 mL, yang dilengkapi dengan sumbat karet. Sampel tersebut diletakkan di dalam kotak yang dikenai cahaya *fluorescent* (4000 lux). Angka peroksida diukur pada 2 jam pencahayaan dengan metode lodometri (Anonim 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mekanisme dan kinetika penstabilan oksigen singlet oleh biksin

Biksin mampu menghambat fotooksidasi metil linoleat (0,03 M) (Pranata et al., 2006), untuk menentukan mekanisme dan kinetika biksin dalam menghambat laju fotooksidasi metil linoleat digunakan pendekatan kinetika *steady-state* dari Foote (1979).



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi biksin terhadap pembentukan hidroperoksida metil linoleat dalam etanol yang mengandung eritrosin ($11,36 \times 10^{-6}$ M), pada pencahayaan *fluorescent* (4000 lux) selama 2 jam pada suhu kamar.

Tabel 1. Nilai slop dan intersep dari persamaan regresi linier Gambar 1

Konsentrasi biksin (M)	0,00000	0,0000025	0,0000050	0,0000075	0,00001	0,00002	0,00003
Slop	8,67	12,29	15,06	17,18	19,79	27,11	31,33
Intersep	111,01	113,61	115,05	117,14	118,93	175,13	315,74
Slop/Intersep	0,078	0,108	0,131	0,147	0,161	0,155	0,099

Nilai koefisien korelasi regresi linier dari konsentrasi peroksida dan konsentrasi biksin pada metil linoleat menunjukkan hubungan erat antara angka peroksida yang terbentuk dan konsentrasi biksin yang ditambahkan. Angka peroksida metil linoleat menurun dengan meningkatnya konsentrasi biksin dari 0 sampai $1,0 \times 10^{-5}$ M. Untuk intersep yang saling berdekatan pada konsentrasi yang rendah $0,25 \times 10^{-5}$ M sampai $1,0 \times 10^{-5}$ M menunjukkan bahwa biksin memiliki mekanisme penstabilan oksigen singlet. Sedangkan pada konsentrasi biksin yang tinggi: $2,0 \times 10^{-5}$ M dan $3,0 \times 10^{-5}$ M memperlihatkan intersep yang berbeda. Intersep-intersep pada konsentrasi yang tinggi tersebut membuktikan bahwa biksin juga memiliki kemampuan sebagai penstabil eritrosin triplet.

Konstanta laju reaksi penstabilan oksigen singlet oleh biksin pada metil linoleat dihitung dengan rasio slop/intersep dari persamaan garis regresi linier $(MLO_2)^{-1}$ dan $(ML)^{-1}$ tanpa biksin sebagai penstabil (Gambar 1.). Persamaan regresi liniernya adalah $y = 8,67x + 111,01$ ($r = 0,9933$), sehingga rasio slop/intersepnnya adalah $8,67/111,01 = 0,078$. Selanjutnya untuk konsentrasi biksin $0,25$ sampai $1,0 \times 10^{-5}$ M, rasio slop/intersepnnya terlihat pada Tabel 1. Rasio slop/intersep dari persamaan garis linier tanpa adanya penstabil (biksin) digunakan untuk menghitung nilai K_r ;

$$\text{Rasio (slop/intersep)} = \frac{K_d}{K_r} \text{ (Foote, 1979)}$$

K_d dalam pelarut etanol adalah $7,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Yamauchi dan Matsuhita, 1977). Laju oksidasi oksigen singlet (K_r) dengan metil linoleat adalah:

$$K_r = \frac{K_d}{\text{rasio (slop/int)}}$$

$$K_r = \frac{7,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}}{0,078} = 9,36 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

ata penghitungan rasio slop/intersep yang terdapat pada Tabel 1. digunakan untuk menghitung laju penstabilan biksin. Laju penstabilan biksin terhadap oksigen singlet ($K_q + K_{ox-q}$) digambarkan dengan hubungan slop/intersep

dan konsentrasi biksin, didapatkan persamaan garis adalah $y = 8199,7x + 0,084$ dan koefisien korelasi (r) 0,9876.

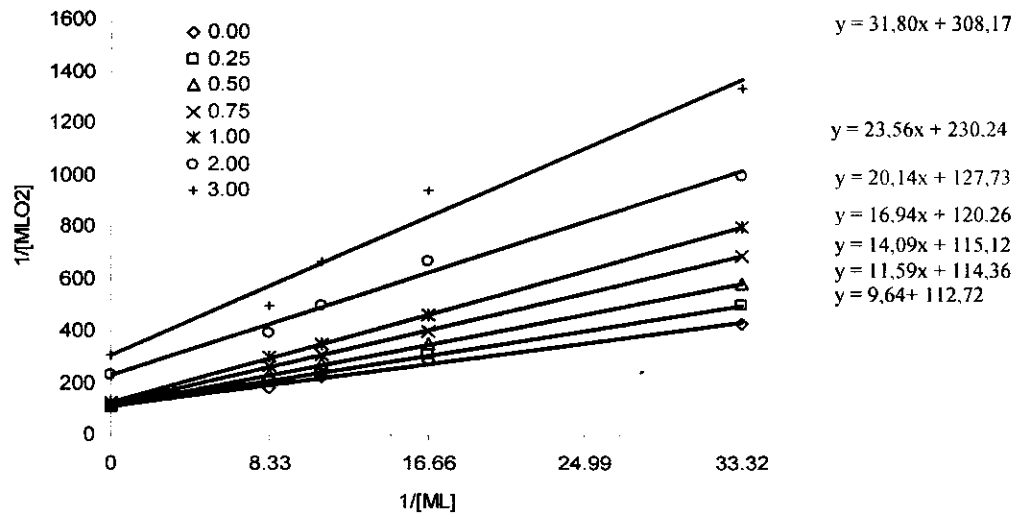
Foote (1979) menyatakan bahwa hubungan slop dari rasio slop/intersep dan konsentrasi biksin $[Q]$ adalah $K_q + K_{ox-q}/K_r$ sehingga konstanta laju penstabilan oksigen singlet total oleh biksin ($K_q + K_{ox-q}$) adalah $8199,7 \times 9,36 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} = 7,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Mekanisme dan kinetika penstabilan oksigen singlet oleh β -karoten

Pengaruh konsentrasi β -karoten 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 dan $3,0 \times 10^{-5}$ M terhadap fotooksidasi 0,03; 0,06; 0,09 dan 0,12 M metil linoleat dengan eritrosin ($11,36 \times 10^{-6}$ M) sebagai sensitiser dapat dilihat pada Gambar 2.

Nilai koefisien korelasi regresi linier dari konsentrasi peroksida dan konsentrasi β -karoten pada metil linoleat menunjukkan hubungan erat antara penghambatan angka peroksida yang terbentuk dan konsentrasi β -karoten yang ditambahkan. Angka peroksida metil linoleat menurun dengan semakin meningkatnya konsentrasi β -karoten. Intersep untuk masing-masing konsentrasi β -karoten seperti terlihat pada Tabel 2. Intersep yang saling berdekatan mulai konsentrasi rendah $0,25 \times 10^{-5}$ M sampai $1,0 \times 10^{-5}$ M menunjukkan bahwa β -karoten memiliki mekanisme penstabil oksigen singlet. Sedangkan intersep pada konsentrasi tinggi (2,0 dan $3,0 \times 10^{-5}$ M) berbeda dibandingkan kelompok konsentrasi rendah, hasil ini menunjukkan bahwa β -karoten pada konsentrasi tinggi memiliki mekanisme penstabilan eritrosin triplet.

Menurut Lee dan Min (1988), β -karoten (0, 5, 10 dan 20 ppm) yang disensitasi klorofil dalam minyak kedele memiliki mekanisme penstabilan oksigen singlet. Sedangkan Yang et al., (2002) melaporkan bahwa β -karoten dengan sensitiser eritrosin dalam minyak kedele memiliki mekanisme penstabilan oksigen singlet dan eritrosin triplet.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi β -karoten terhadap pembentukan hidroperoksida dengan metil linoleat dalam etanol yang mengandung eritrosin ($11,36 \times 10^{-6}$ M), pada pencahayaan *fluorescent* (4000 lux) selama 2 jam pada suhu kamar.

Tabel 2. Nilai slop dan intersep dari persamaan regresi linier Gambar 2.

Konsentrasi beta-karoten (M)	0,00	0,0000025	0,0000050	0,0000075	0,00001	0,00002	0,00003
Slop	9,64	11,59	14,09	16,94	20,14	23,56	31,80
Intersep	112,72	114,36	115,12	120,26	127,73	230,24	308,17
Slop/Intersep	0,086	0,101	0,122	0,141	0,158	0,102	0,103

Konstanta laju reaksi penstabilan oksigen singlet oleh biksin pada metil linoleat dihitung dengan rasio slop/intersep dari persamaan garis regresi linier $(\text{MLO}_2)^{-1}$ dan $(\text{ML})^{-1}$ tanpa β -karoten sebagai penstabil (Gambar 2.). Persamaan regresi liniernya adalah $y = 9,64x + 112,72$ ($r = 0,9962$), sehingga rasio slop/intersepanya adalah $9,64/112,73 = 0,086$. Selanjutnya untuk konsentrasi β -karoten 0,25 sampai $1,0 \times 10^{-5}$ M, rasio slop/intersepanya terlihat pada Tabel 2. Rasio slop/intersep dari persamaan garis linier tanpa adanya penstabil (β -karoten) digunakan untuk menghitung nilai K_r :

$$\text{Rasio (slop/intersep)} = \frac{K_d}{K_r} \text{ (Foote, 1979)}$$

Nilai K_d dalam pelarut etanol adalah $7,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Yamauchi dan Matsuhita, 1977). Laju oksidasi oksigen singlet (K_r) dengan metil linoleat adalah :

$$K_r = \frac{K_d}{\text{rasio (slop/intersep)}}$$

$$K_r = \frac{7,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}}{0,086} = 8,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Data penghitungan slop/intersep yang terdapat pada Tabel 2 digunakan untuk menghitung laju

penstabilan β -karoten. Laju penstabilan (β -karoten) oksigen singlet ($K_q + K_{ox-q}$) digambarkan dengan rasio slop/intersep terhadap konsentrasi β -karoten. Dari hasil *plotting* diperoleh persamaan garis regresi $y = 7353x + 0,0848$ dan koefisien korelasi (r) 0,9991. Foote (1979) menyatakan bahwa slop dari rasio slop/intersep lawan $[Q]$ adalah $K_q + K_{ox-q}/K_r$ sehingga konstanta laju penstabilan oksigen singlet total ($K_q + K_{ox-q}$) dari β -karoten adalah $7353 \times 8,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} = 6,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Dari hasil penelitian terlihat kecepatan penstabilan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) oleh biksin lebih cepat daripada β -karoten. Biksin dan β -karoten memiliki 9 ikatan rangkap terkonjugasi tetapi biksin memiliki dua gugus fungsional, yaitu karboksilat dan ester. Menurut Min dan Boff (2002) kecepatan penstabilan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) oleh karotenoid tergantung pada jumlah ikatan rangkap terkonjugasi yang dimilikinya serta jenis dan jumlah gugus fungsional. Foote, et al., (1970) melaporkan bahwa konstanta kecepatan penstabilan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) dari senyawa poliena dalam oksidasi yang terfotooksensitasi makin cepat, jika jumlah ikatan rangkap terkonjugasi makin banyak. Pelarut mempengaruhi kecepatan peluruhan (k_d) dari oksigen singlet ($^1\text{O}_2$). Kecepatan penstabilan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) dari penstabil mungkin berbeda di dalam sistem pelarut yang berbeda pula.

Tabel 3. Laju Penstabilan Oksigen Singlet

Penstabil	Media	Laju Penstabilan	Sumber
Likopen	Minyak Kedelai	$6,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Min dan Lee, 1999
β -karoten	Minyak Kedelai	$4,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Min dan Lee, 1999
β -karoten	Piridin	$6,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Fahrenholtz dkk., 1974
β -karoten	Metilen Klorida	$8,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Matherson dan Lee, 1972
β -karoten	Benzena	$1,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Farmilo dan Wilkinson, 1973
β -karoten	Minyak Kedelai	$4,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Jung dan Min, 1991
Kanthasantin	Minyak Kedelai	$1,12 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Jung dan Min, 1991

KESIMPULAN

Mekanisme penstabilan biksin terhadap fotooksidasi metil linoleat menunjukkan penstabilan oksigen singlet dan penstabilan triplet eritrosin tereksitasi. Konstanta laju penstabilan oksigen singlet total ($K_q + K_{ox-Q}$) dari biksin dalam etanol lebih besar dibandingkan β -karoten dengan nilai masing-masing adalah $7,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dan $6,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (1980). *Official And Tentative Methods*. American Oil Chemists Society, Champaign, IL.
- Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H. 1989. Lycopene as The Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Archives of Biochem. Biophys.* 274 : 532-538
- Fahrenholtz, S.R, Doleiden, F.H, Trozollo, A.M and Lamola, A.A. 1974. On The Quenching of Singlet Oxygen by a Tocopherol. *Photochem. Photobiol.* 20:505-509.
- Farmilo, A., Wilkinson, F., 1973. On the Mechanism of Quenching of Singlet Oxygen in Solution. *Photochem. Photobiol.* 18:447-450
- Frankel, E.N., 1998., *Antioxidants in Lipid Oxidation*, Frankel, E.N., Ed, The Oily Press Ltd: Dundee, Scotland ,129-166.
- Foote, C.S., Chang, Y.C., and Denny, R.W. 1970. Chemistry of Singlet Oxygen X Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection. *J. American Chemists Society.* (92): 5216-5219.
- Foote, C.S. 1979. Quenching of Singlet Oxygen. In Singlet Oxygen, Wasserman, H. H. Murray, R.W., Eds., Academic Press: New York. 139-171
- Haila, K. M., 1999. *Effects of Carotenoids and Carotenoids-tocopherol Interaction on Lipid oxidation in vitro.*, University of Helsinki, Departement of Applied Chemistry and Microbiology
- Haila, K.M., Lievonen, S.M. and Heinonen, M.I. 1996. Effect of Lutein, Lycopene, Annatto, and γ -tocopherol on oxidation of triglycerides. *JAOCS.* 58-62
- Huang, R., E, Choe and D, B. Min. 2004. Kinetics for singlet Oxygen Formation by Riboflavin Photosensitization and the Reaction Between Riboflavin and Singlet Oxygen. *J. Food.Sci.* 69:726-732.
- Jung, M.Y and D. B. Min. 1991. Effects of Quenching Mechanisms of Carotenoids on the Photosensitized Oxidation of Soybean Oil. *JAOCS.* 68.
- Krinsky, N. I. 1994. The Biological Properties of Carotenoids., *Pure and Appl. Chem.*, 66: 1003-1010.
- Lee, K.H., Yung, M.Y., and Kim, S.Y. 1997. Quenching Mechanisms and Kinetics of Ascorbyl Palmate for the Reduction of Photosensitized Oxidation Oils., *JAOCS.* 74: 1053-1057.
- Lee, K.H and Min, D.B. 1988. Quenching Mechanism of β -carotene on the Chlorophyll Sensitized Photooxidation of Soybean Oil. *J.Food Sci.* 53:1894-1895.
- Matherson, I. B. C and Lee, J. 1972. Life time of Singlet Oxygen in Solution. *Chem. Phys.Lett.* 1972.14:350-351
- Min, D.B. and Boff, J.M. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Rev in Food Sci and Food Safety.* 1:58-72
- Min, D.B. and Lee, H.O. 1999. Chemistry of Lipid Oxidation. In: Teranishi R, Wick E.L. and Hornstein I. Eds. *Flavor Chemistry: Thirty Years*

of Progress. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. P 175-187

Pranata, A., Santoso, U., Raharjo, S dan Haryadi. 2006. Pengaruh Biksin Terhadap Fotooksidasi Metil Linoleat Dengan Eritrosin Sebagai Sensitizer (Diterima untuk dipublikasikan pada majalah *Agritech* Volume 26 No. 1 tahun 2007).

Yamauchi, R and Matsushita, S.1977. Quenching Effect of Tocopherol on the Methyl Linoleate Photooxidation and Their Oxidation Product. *Agric.Biol.Chem.*41:1425-1430.

Yang, W.T., Lee, J.H. and Min, D.B. 2002. Quenching Mechanisms and Kinetics of Alpa Tocopherol and Beta Carotene on the Photosensitizing Effect of Synthetic Food Colorant FD& Red No.3. *J. Food Sci.*67507-510.