

## PENGARUH PENAMBAHAN FRAKSI ETIL ASETAT KLUWEK TERHADAP OKSIDASI ASAM LINOLEAT YANG DIKATALISIS OLEH LIPOKSIGENASE

Sumi Hudyono; Susilowati dan Sofian Manahara

Jurusan Kimia FMIPA  
Universitas Indonesia

Diterima : 7 Mei 2002

: Disetujui : 21 Juni 2002

### ABSTRAK

Oksidasi merupakan fenomena yang selalu terjadi pada bahan yang mengandung lipid, namun demikian laju oksidasi tersebut dapat dihambat dengan adanya bahan antioksidan baik alami maupun sintetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sampai sejauh mana komponen yang terkandung dalam fraksi etil asetat kluwek (*Pangium edule* Reinw.) mampu menghambat reaksi oksidasi enzimatik asam lemak poliena, linoleat (C18:2, ω6), yang dikatalisis oleh lipoksigenase (E.C. 1.13.11.12). Tingkat oksidasi sampel selama perlakuan diamati berdasarkan perubahan harga bilangan oksidasi (PV) dan bilangan tiobarbiturat (TBA). Hasil analisis ke-dua parameter tersebut menunjukkan bahwa urutan kekuatan sifat antioksidatif fraksi kluwek tersebut adalah fraksi B > fraksi C > fraksi A > kontrol. Studi inhibisi reaksi enzimatik oleh fraksi B menunjukkan bahwa mengikuti mekanisme kinetika unkompetitif dengan  $K_i = 1.1294\%$  v/v. Berdasarkan data PV dan TBA-nya ditunjukkan bahwa penambahan fraksi kluwek dapat menghambat laju oksidasi secara nyata.

INHIBITION ACTIVITY OF ETHYL ACETATE OF KLUWEK FRACTION ON THE LINOLEIC ACID OXIDATION CATALYSED BY LIPOXYGENASE : Study was carried out to observe the inhibition activity of ethyl acetate kluwek (fermented *Pangium edule* Reinw.) fractions on the enzymatic oxidation of linoleic acid. The degree oxidation of sample was determined according to the PV and TBA methods. The most active fraction then was treated as the inhibitor for enzymatic oxidation of linoleic acid catalyzed by lipoxigenase (E.C. 1.13.11.12). Data analysis shown that the antioxidant activity of kluwek fraction was: fraction B > fraction C > fraction A > control. Enzymatic assay of fraction B gave a kinetic inhibition as an uncompetitive inhibitor with  $K_i = 1.1294\%$  v/v. Physico-chemical analysis of its effect to the enzymatic oxidation rate was significantly different according to the PV and TBA values and compared to the control.

Keywords: oxidation, lipoxigenase, antioxidant, inhibitor, kluwek fraction.

### I. PENDAHULUAN

Oksidasi lipid, baik secara enzimatik maupun non-enzimatik, merupakan fenomena yang selalu terjadi terutama pada asam lemak tidak jenuh ganda (poly unsaturated fatty acid, PUFA) seperti asam linoleat (C18:2, ω6). (Gunston et al., 1986; Allen & Hamilton, 1989). Oksidasi enzimatik umumnya dikatalisis oleh lipoksigenase, menghasilkan produk primer oksidasi berupa hidroperoksida yang tidak stabil dan akan segera teroksidasi lebih lanjut menghasilkan produk sekunder baik volatil maupun nonvolatil. (Gunston et al., 1986; Allen & Hamilton, 1989; Porter et al., 1995). Produk oksidasi tersebut bila terdapat dalam makanan akan berkontribusi terhadap sifat sensorial makanan, baik yang diinginkan maupun tidak diinginkan, serta menyebabkan penurunan kualitas nutrisinya.

Reaksi oksidasi secara umum dapat dihambat oleh antioksidan tertentu, baik alami maupun sintetik. Sebagian besar antioksidan alami berasal dari tanaman, antara lain berupa senyawaan tokoferol, karotenoid, asam askorbat, fenol, flavonoid. (Wang et al., 1996; Cao et al., 1997; Huang & Frankel, 1997; Miyake & Shibamoto, 1997; Miyake et al., 1997; Gow, et al, 1997). Kluwek (*Pangium edule* Reinw terfermentasi) merupakan bumbu yang banyak digunakan pada penyiapan makanan terutama di Jawa Timur, maupun sebagai pengawet ikan di daerah Banten. Komponen utama kluwek antara lain adalah asam kaulmorgrat, asam hipnokrat dan asam gorlat serta kelompok senyawa polifenol (Brill, 1977; Heyne, 1987).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas inhibisi fraksi etil asetat dari kluwek terhadap oksidasi asam linoleat yang dikatalisis dengan lipoksigenase (EC. 1.13.11.12).

## II. BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Kluwek diperoleh dari pasar di daerah Jakarta. Lipoksigenase (E.C.1.13.11.12) berasal dari Sigma, asam linoleat dari Kansei Kogyo Ltd. Bahan kimia lain mempunyai spesifikasi sesuai dengan penggunaannya. Larutan 0,2 mg/l dibuat dengan cara mengencerkan 2,0 ml larutan lipoksigenase dengan 8,0 ml buffer borat 0,2 M pH 9,0. Larutan fraksi A, B dan C sebesar 1% dibuat dengan melarutkan 1 ml fraksi dalam 100 ml etanol.

**Fraksionasi.** Sejumlah 0,7 kg daging buah biji kluwek dimaserasi dengan 2,1 l metanol selama 3x7 hari. Ekstrak metanol yang diperoleh dikisatkan, kemudian diekstraksi kembali dengan etil asetat dan diperoleh ekstrak etil asetat. Ekstrak tersebut kemudian difraksionasi dengan larutan  $\text{NaHCO}_3$  5% dan  $\text{NaOH}$  5% sehingga diperoleh fraksi etil asetat netral (A), fraksi etil asetat dari  $\text{NaOH}$  (B), serta fraksi etil asetat dari  $\text{NaHCO}_3$  (C).

**Aktivitas Antioksidatif.** Masing-masing fraksi diuji aktivitas antioksidatifnya terhadap oksidasi asam linoleat yang dikatalisis oleh lipoksigenase (E.C. 1.13.11.12). Pengamatan aktivitas dilakukan berdasarkan perubahan derajat oksidasi sampel yang diamati berdasarkan harga PV (Peroxide Value, bilangan peroksida) untuk mengetahui jumlah peroksida (produk oksidasi primer) serta TBA (Thio Barbituric Acid, Bilangan Tiobarbiturat) untuk mengetahui berapa banyak produk oksidasi sekunder (dinyatakan sebagai malonaldehid) yang terdapat dalam sampel akibat oksidasi. Analisis PV dan TBA dilakukan berdasarkan prosedur AOAC (AOAC, 1995).

**Reaksi enzimatis.** Reaksi enzimatis dilakukan berdasarkan modifikasi metode Geem (Mc. Geem, 1965). Sejumlah 0,06 ml asam linoleat yang telah dilarutkan dengan 5,2 ml buffer borat pH 9,0, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah dengan 1 ml etanol dan 0,4 ml larutan enzim. Larutan tersebut selanjutnya diinkubasi dengan variasi waktu antara 2 sampai 30 menit pada kondisi reaksi optimal yang telah didapatkan sebelumnya yaitu pada pH 9,0 dan temperatur 30°C (Hudiyo, 2000, 2001). Guna mengetahui pengaruh penambahan fraksi A, B atau C terhadap laju oksidasi, maka dilakukan pengamatan reaksi dengan cara yang sama tetapi mengganti penambahan 1,0 ml etanol dengan 1,0 ml larutan fraksi tersebut. Setelah reaksi dihentikan, selanjutnya ditentukan derajat oksidasi sampel dengan mengukur harga PV dan TBA-nya. Pengamatan dilakukan secara triplo.

Penentuan sifat inhibisi hanya dilakukan untuk fraksi B, dengan cara memvariasi konsentrasi asam linoleat [S] yang ditambahkan, yaitu  $1,00 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,50 \cdot 10^{-2}$ ;  $2,00 \cdot 10^{-2}$ ; dan  $2,50 \cdot 10^{-2}$  M, serta variasi fraksi B, yaitu 0,0, 0,5 dan 1,0%.

Skema lengkap penelitian seperti terlihat pada Gambar 1.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Aktivitas Antioksidatif

Studi aktivitas antioksidatif fraksi kluwek A, B, C dilakukan dengan mengamati perubahan harga PV dan TBA, hasil pengamatan tersebut ditampilkan pada Gambar 2. Berdasarkan grafik yang diperoleh terlihat bahwa fraksi yang mempunyai aktifitas paling tinggi adalah B, dengan urutan aktivitasnya adalah Fraksi B > fraksi C > fraksi A > kontrol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa fraksi B mengandung paling banyak senyawa antioksidan, yang diperkirakan sebagai kelompok polifenol sesuai dengan arah metode fraksionasi yang digunakan.

Grafik PV memperlihatkan peningkatan yang tajam pada permulaan oksidasi, dilanjutkan dengan peningkatan kemiringan kurva yang mendekati landai. Fenomena ini menunjukkan bahwa pembentukan produk hidroperoksida (produk primer oksidasi yang tidak stabil) segera diubah menjadi produk sekunder yang lebih stabil.

Fenomena yang sama juga ditunjukkan oleh grafik TBA. Penambahan fraksi kluwek menyebabkan penurunan harga PV maupun TBA. Hal ini berarti bahwa penambahan fraksi kluwek menyebabkan terhambatnya pembentukan hidroperoksida (PV) maupun pembentukan aldehid, terutama malonaldehid (TBA).

### 2. Reaksi Enzimatis

Studi mekanisme oksidasi enzimatis hanya dilakukan pada kluwek B yang mempunyai aktivitas antioksidatif paling tinggi. Kondisi optimum reaksi yang digunakan adalah seperti yang dilaporkan sebelumnya, yaitu pH 9,5, temperatur 28°C, waktu inkubasi 30 menit,  $[S] = 9,0 \times 10^{-4}$  M, (Hudiyo et al., 2000, 2001).

Kinetik dan Mekanisme Inhibisi. Plot Lineweaver-Burk yang diperoleh ditampilkan pada Gambar 3a, sedangkan plot turunan keduanya ditampilkan pada Gambar 3b. Data studi kinetika ini dirangkum pada Tabel 1. Analisis data tersebut menunjukkan bahwa penambahan fraksi B menyebabkan penurunan harga  $V_{max}$  dan  $K_m$ nya, dengan plot yang diperoleh sejajar satu dengan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi B kluwek tersebut menginhibisi reaksi dengan mekanisme *Unkompetitif*, dengan harga konstanta inhibisi,  $K_i = \left( \frac{[ES][I]}{[ESI]} \right) = 1,1294 \% v/v$ .

## IV. KESIMPULAN

Fraksi etil asetat kluwek mengandung senyawa antioksidan dengan urutan aktivitas relatifnya adalah fraksi B > fraksi C > fraksi A > kontrol. Pengamatan aktivitas enzimatis menunjukkan bahwa fraksi B mempunyai aktivitas sebagai inhibitor reaksi oksidasi asam linoleat yang

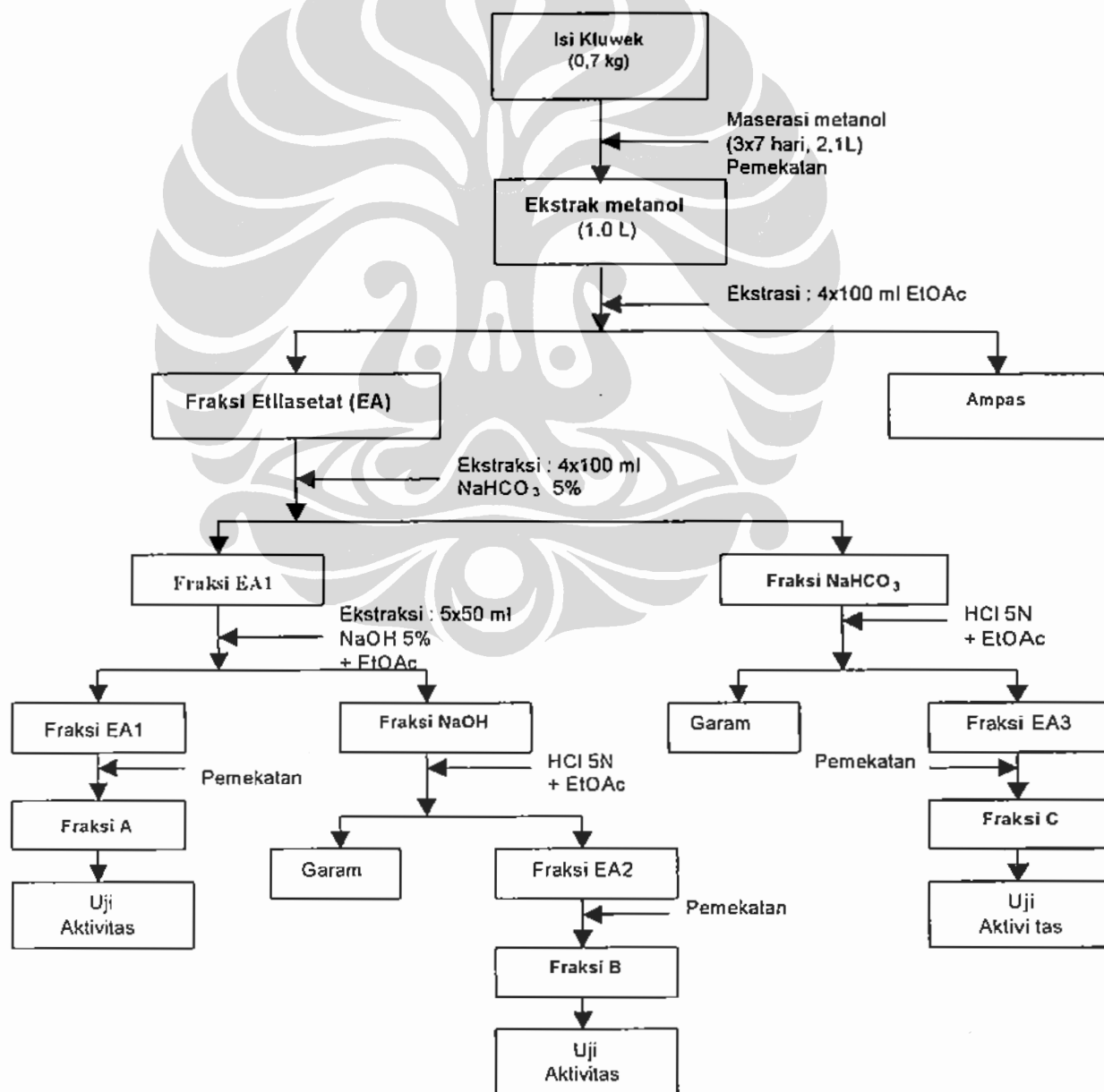
dikatalisis oleh lipoksigenase dengan mekanisme unkompetitif dan mempunyai harga  $K_i = ([ES][I]/[ESI]) = 1,1294 \% v/v$ .

#### DAFTAR ACUAN

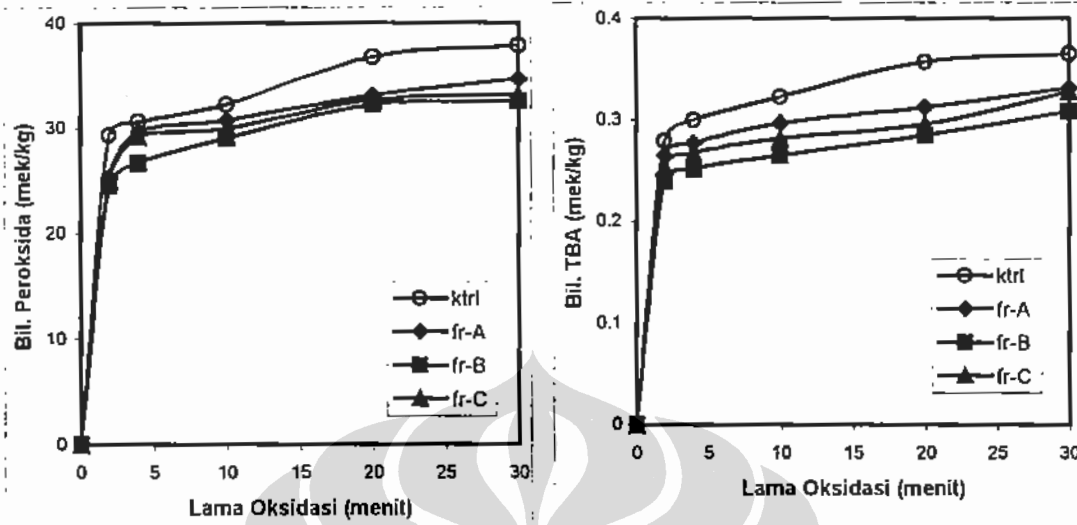
- Allen, J.C. & R.J. Hamilton. 1989. *Rancidity in Food*. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier Applied Science Publ., London.
- AOAC 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th. ed., vol. 1, edited by P. Cunniff, Virginia.
- Brill, H.C. 1977. A chemical investigation of the seed of *Pongium edule* and *Hydrocarpus alcala*. In Cox, A.J. (ed). *The Philippine Journal of Science*: section A, Chemical, Geological Science and Industries. Vol. xii, Bureau of Science, Manila, 37-46.
- Cao, G.; E. Sofic & R.L. Prior. 1997. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 3426-3431.
- Gow, C.H., Y.C. Hui, & H.P. Hui. 1997. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Various Tea Extracts. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 30-34.
- Gunston, F.B.; J.L. Harwood and F.B. Padley. 1986. *The Lipid Handbook*. Chapman and Hall, London.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan berguna Indonesia*. 3<sup>rd</sup> ed. Balitbang Kehutanan, yayasan Sarana Wanajaya, 1448-1451.
- Hudiyono, S.; H. Susilowati, D. Ambarwati & D. Liliana, 2000. Study on inhibitor activity of  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid and lemon grass oil to the enzymatic oxidation of linolenic acid. *Proceeding of Sixth Eurasia Conference on Chemical Sciences (EuAsC<sub>2</sub>S-6)*, Brunei Darussalam, Brunei, February 27- March 2, 2000.
- Hudiyono, S., H. Susilowati, S. Nurulita, L. Komalasari & S. Kosela. 2001. Inhibition activity of fermented *Pongium edule* Reinw fractions to the enzymatic oxidation of linoleic acid. *Proceeding of International Seminar on Natural Product Chemistry and Utilization of Natural Resources*, Depok, June 5-7 2001.
- Mc. Geem, Joseph 1965. Methods of Enzymatic Analysis. H.U. Bergmeyer Ed., 411-414.
- Miyake, T. & T. Shibamoto. 1997. Antioxidative activities of natural compounds found in plants. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 1819-1822.
- Miyake, Y.; K. Yamamoto; Y. Morimitsu & T. Osawa. 1997. Isolation of C-Glucosylflavone from Lemon Peel and Antioxidative Activity of Flavonoid Compounds in Lemon Fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 4619-4623.
- Namiki, Mitsuo. 1990. Antioxidant/Antimutagens in Food. *Critical Rev. in Fd. Sci. and Nutrition*, 29(4), 273-300.
- Porter, N.A.; S.E. Cadwell & K.A. Mills. 1995. Mechanisme of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 10(12), 1904-1907.
- Shu, W.H. & E.N. Frankel. 1997. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 3033-3038.
- Wang, H.; G. Cao & R.L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 44, 701-705.

Tabel 1. Kinetika inhibisi fraksi B terhadap lipoksigenasi asam linoleat.

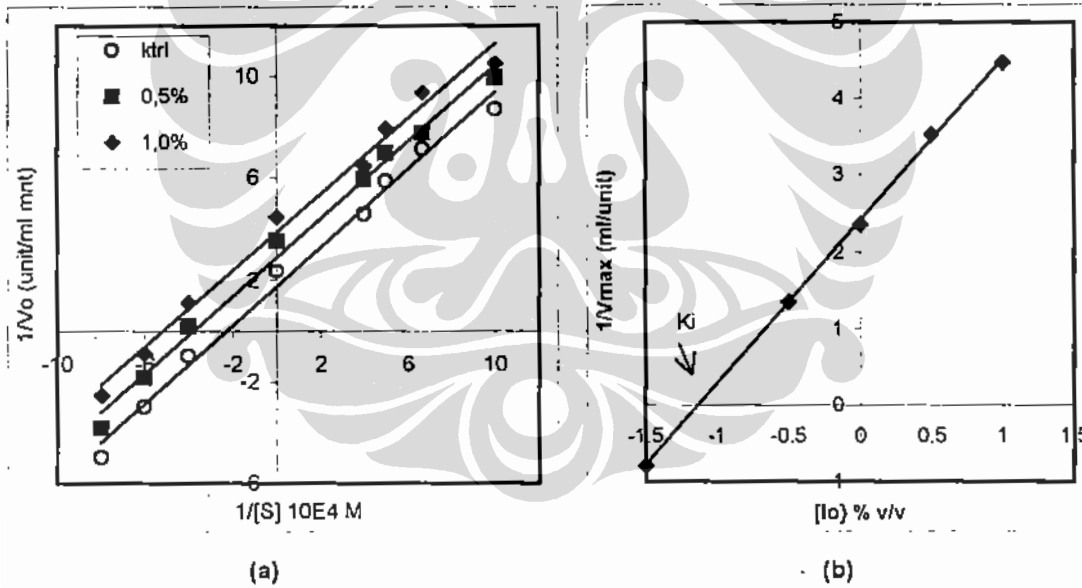
Fraksi B (% v/v)	Km ( $10^{-3}$ M)	Vmax. (unit/ ml)	K (% v/v)	Tipe Inhibisi dan Perpotongan garis (x,y)	Persamaan Regresi y =
$0,0 \times 10^{-1}$	4,450	58,19	K <sub>i</sub> = 1,1294	Inhibisi Uncompetitif (-x, -x) K <sub>i</sub> = ([ES][I])/([ESI])	0,7647 x + 1,7186 (R <sup>2</sup> = 0,9909)
$5,0 \times 10^{-1}$	2,664	35,09			0,7591 x + 2,85 (R <sup>2</sup> = 0,9921)
$10,0 \times 10^{-1}$	1,942	26,06			0,745 x + 3,8369 (R <sup>2</sup> = 0,9888)



Gambar 1. Skema penelitian



Gambar 2. Aktivitas antioksidatif fraksi A, B dan C kluwek diamati dengan perubahan harga PV dan TBA asam linoleat.



Gambar 3. (a) Plot Lineweaver-Burk reaksi oksidasi linoleat yang dikatalisis oleh lipoksigenase dengan penambahan variasi konsentrasi fraksi B. (b) Plot sekunder untuk menentukan  $K_i$  nya.