

## PENGARUH BERBAGAI KONDISI OKSIDASI TERHADAP KANDUNGAN KOLESTEROL DAN STEROL LAIN DALAM LEMAK COKLAT

Sumi Hudiyo PWS

Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

E-mail: [hudiyo@makara.cso.ui.ac.id](mailto:hudiyo@makara.cso.ui.ac.id)

### Abstrak

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap penurunan kandungan sterol dari lemak coklat (BC) murni dan yang ditambah dengan 100 ppm (RTc), 750 ppm (RTm)  $\alpha$ -tokoferol, 5,00 ppm Cu(II) atau Fe(III). Oksidasi dilakukan pada temperatur 45, 60 atau 90 °C tanpa sinar atau pada temperatur kamar dengan adanya sinar (L). Hasil analisis menunjukkan bahwa kenaikan temperatur lebih meningkatkan laju oksidasi dibanding sinar. Laju penurunan kandungan sterol sedikit berbeda antar jenis sterol. Secara umum penambahan  $\alpha$ -tokoferol akan menghambat laju oksidasi, namun penambahan sangat berlebih malah bertindak sebagai prooksidan. Penambahan Cu(II) dan Fe(III) mempercepat laju oksidasi, dimana sifat katalis Cu(II) sedikit lebih kuat dibanding Fe(III). Analisis dengan ANOVA dua arah menunjukkan bahwa perbedaan kondisi dan lama oksidasi berpengaruh terhadap kandungan sterol secara signifikan, kecuali pengaruh lama oksidasi untuk kondisi Tm-L.

### Abstract

**The influence of different oxidation condition to the sterolic content of cocoa butter.** The influence of different oxidation conditions to the variation of sterolic compound of refined cacao butter (BC) was observed. BC was also treated by addition of 100 ppm (RTc), 750 ppm (RTm)  $\alpha$ -tocopherol, 5.00 ppm Cu (II) or Fe(III). Oxidation was carried out at 45, 60 or 90°C in the dark or in day light at room temperature (L). The analysis showed that the temperature is more accelerate oxidation rate than light at room temperature. The disappearance rate of sterol is slight difference among each other. In general, addition of  $\alpha$ -tocopherol inhibited the degradation of sterol, but in excess it was seem to be a prooxidant. The other hand Cu (II) or Fe (III) was a catalyst where the influence of Cu (II) was stronger than Fe (II). Two ways ANOVA shown that the condition and time of oxidation influenced sterol content significantly, except for time oxidation of Tm-L condition.

*Keywords: cacao butter, sterols, oxidation,  $\alpha$ -tocopherol, Cu (II), Fe (III).*

### 1. Pendahuluan

Fraksi sterol merupakan komponen minor dalam minyak dan lemak pangan. Salah satu komponen ini, kolesterol, sampai saat ini tetap merupakan objek penelitian yang menarik terutama pengaruhnya terhadap kesehatan, baik dalam bentuk senyawa asal maupun hasil oksidasinya.

Fraksi sterol alami terkandung dalam minyak atau lemak nabati dan disebut sebagai fitosterol. Fitosterol merupakan kelompok steroid dengan gugus alkohol pada posisi C3, yang antara lain terdiri dari kolesterol, kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ 5-avenasterol dan  $\Delta$ 7-stigmasterol. Perbedaan struktur masing-masing sterol tersebut terletak pada posisi dan jumlah ikatan rangkap serta struktur dan jumlah rantai karbon yang terikat pada C17-nya.

Kolesterol, dalam jumlah tertentu, dibutuhkan oleh tubuh manusia terutama sebagai prekursor pembentukan hormon steroid dan asam empedu. Namun demikian dalam jumlah berlebih dapat memberikan pengaruh yang kurang menguntungkan untuk kesehatan, antara lain dikatakan sebagai penanggung jawab arterosklerosis (penyempitan pembuluh darah), penyakit jantung koroner maupun darah tinggi [1]. Sedangkan kelompok sterol lain sampai saat ini masih belum jelas pengaruhnya terhadap kesehatan [2].

Oksidasi lipid tidak jenuh, termasuk kelompok sterol, berlangsung melalui pembentukan radikal bebas dalam bentuk alil peroksil yang akan mengalami penyusunan ulang membentuk beberapa produk peroksida [3]. Senyawa antara hasil oksidasi pada kolesterol tersebut dapat membentuk lebih dari 30 produk sekunder yang disebut sebagai COPS (cholesterol oxidation products), [4]. Banyak publikasi yang menyatakan bahwa COPS dapat menyebabkan alterasi sel membran, inhibisi biosintesis kolesterol, dan aterosgenesis, [5,6]. COPS dilaporkan juga bersifat sitotoksik, angiotoksik, mutagen dan karsinogen, [7,8]. Studi oksidasi terhadap fitosterol lain hampir tidak ada terutama analisis produk oksidasinya. Namun karena kelompok sterol ini mempunyai rangka yang sama maka proses pembentukan produk oksidasinya pun diperkirakan akan mirip.

Analisis keberadaan COPS dalam produk makanan juga dapat digunakan sebagai parameter kualitas produk tersebut [6,9]. Metode analisis yang digunakan terutama adalah kromatografi gas [8], HPLC [9,10], serta penentuan piknomol kolesterol dengan alat tandem antara nanoelektrospray ionization MS [11].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui laju pengurangan fraksi sterol dalam lemak coklat yang mengalami berbagai kondisi oksidasi. Analisis dilakukan tidak terhadap produk oksidasinya tetapi pada masing-masing sterol yang tersisa. Metode analisis yang digunakan adalah kromatografi gas senyawa sterol dalam bentuk turunan trimetil-sililnya.

Hambatan utama studi mengenai komposisi non-trigliserida dalam minyak atau lemak adalah karena kadarnya yang terlalu rendah dibandingkan dengan matriksnya. Oleh karena itu untuk mendapatkan hasil analisis yang memuaskan maka perlu dilakukan pemisahan komponen tersebut dari matriksnya terlebih dahulu dengan proses penyabunan (saponifikasi).

## 2. Metode Penelitian

Studi pengaruh oksidasi lemak coklat ini dilakukan pada berbagai kondisi percobaan, selanjutnya perubahan kandungan sterolnya diamati secara periodik dengan GC. Bahan dan metode umum yang digunakan adalah seperti yang dilaporkan sebelumnya, [12,13].

Studi ini dilakukan dalam dua bagian, yaitu terhadap lemak coklat rafinasi (Cacao Butter, CB) dan yang diberi tambahan perlakuan sebagai berikut :

- CB + 100 ppm  $\alpha$ -Tokoferol (CBTc, atau Tc)
- CB + 750 ppm  $\alpha$ -Tokoferol (CBTm atau Tm)
- CB + 5,0 ppm Cu(II) (CBCu atau Cu)
- CB + 5,0 ppm Fe(III) (CBFe atau Fe)

Preparat kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca terbuka, selanjutnya dioksidasi dengan dua kondisi yaitu

1. Studi oksidasi pertama dilakukan dengan kondisi:
  - Temperatur 45, 60 atau 90°C tanpa adanya sinar.
  - Temperatur kamar dengan adanya sinar (L).
2. Studi kedua dilakukan terhadap CB yang telah ditambah dengan  $\alpha$ -Tokoferol, Cu(II) atau Fe(III), selanjutnya dioksidasi dengan dua kondisi yaitu pada temperatur 90°C tanpa sinar atau pada temperatur kamar dengan adanya sinar (L).

Sampel dipisahkan dari matriksnya dengan proses saponifikasi, berdasarkan prosedur gabungan dari metode ISO 34/SC 11 N 390 dan IUPAC 2.432, prosedur lengkap seperti dilaporkan sebelumnya [13].

Fraksi sterol yang didapat kemudian dianalisis dengan GC dalam bentuk derivat sililnya dengan BSTFA. Analisis dilakukan dengan menggunakan kolom kapiler Chrompack, WCOT fused silica CP-sil-19 CB, panjang 25 m dan diameter dalam 0,32 mm. Temperatur yang digunakan adalah: kolom pada 265°C dan detektor FID pada 285°C.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Komposisi baik kualitatif maupun kuantitatif fraksi tidak tersabunkan dalam suatu minyak atau lemak sangat bergantung pada asal, musim panen dan proses fabrikasinya [14,15]. Kandungan fraksi sterol dalam lemak coklatpun bervariasi. Rangkuman laporan hasil analisis fraksi sterol dalam lemak coklat oleh beberapa peneliti sebelumnya serta hasil penelitian ini ditampilkan pada Tabel 1. Kromatogram fraksi sterol sampel lemak coklat ditampilkan pada Gambar 1.

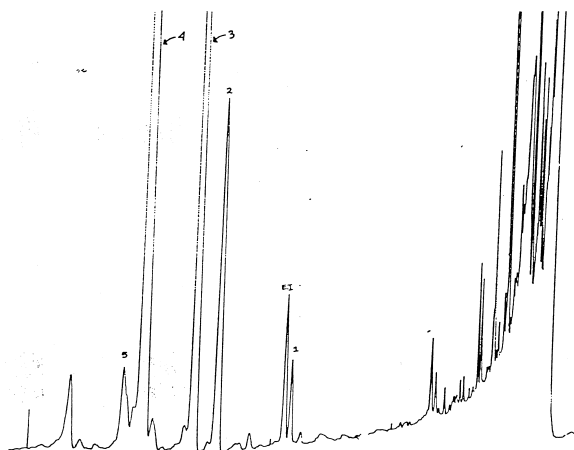
Kolesterol sebelumnya dinyatakan hanya terdapat pada lemak hewani sehingga dikelompokkan sebagai zoosterol. Keberadaannya dalam lemak coklat (fitosterol) diindikasikan pertama kali oleh Chaveron pada tahun 1967, [16], dan dipastikan keberadaannya setelah berkembangnya metode analisis kromatografi gas terutama setelah digunakannya kolom kapiler [17]. Hasil analisis yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa prosen distribusi masing-masing sterol yang didapat sesuai dengan hasil peneliti lain, hasil juga ditampilkan dalam kadarnya (ppm). Hasil analisis hubungan antara berbagai kondisi oksidasi terhadap perubahan kandungan masing-masing sterol ditampilkan pada Gambar 2-6.

Berdasarkan data hasil analisis kromatografi gas fraksi sterol, terlihat bahwa terdapat pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap variasi kandungan sterol seperti terangkum pada Tabel 2.

**Tabel 1. Kandungan spesi sterol dalam lemak coklat**

Acuan	Kadar (% fraksi sterol, w/w)					
	Ko	Ka	St	Si	Av	$\Delta 7$
Chaveron [16]	?	9	24	67	-	-
Itoh [17]	2	9,1	26,3	59,6	3	1
Braco [18]	1,3 - 1,8	8,8 - 10,5	23,7 - 29,3	58,5 - 64,9	-	-
Lecker [19]	1,9	9,4	26,1	59,5	1,8	0,4
Lecerf [20]	0,6 - 1,3	8,9 - 10,6	24,5 - 29,3	58,9 - 59,5	0,6 - 2,7	-
<b>Hasil analisis</b> (ppm)	1,4 (27)	9,4 (178)	28,3 (534)	58,7 (1108)	2,2 (42)	-

Catatan: Ko = kolesterol, Ka = Kampesterol, St = Stigmasterol, Si =  $\beta$ -Sitosterol, Av =  $\Delta 5$ -Avenasterol dan  $\Delta 7$  =  $\Delta 7$ -Stigmasterol



**Gambar 1. Kromatogram GC hasil analisis fraksi sterol lemak coklat. (1) Kolesterol, Kolestanol (EI : standar dalam), (2) Kampesterol, (3) Stigmasterol, (4)  $\beta$ -Sitosterol, dan (5)  $\Delta 5$ -Avenasterol.**

**Tabel 2. Rangkuman pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap pengurangan kadar masing-masing sterol.**

Jenis Sterol	Pengaruh lama dan kondisi oksidasi (minggu)					
	LO	KOA	LO	KOL	LO	KO90
Kolesterol	1-6 >6	90>60>45>L 90>L>60>45	1-3 >3	Cu>Fe>Tc,Tm,L L>Cu>Fe>tc,Tm	1-4 >4	Cu>Fe>90>tm,Tc Fe>Cu,90>Tm,Tc

Kampesterol	1-12	90>60>40>L	1-12	Cu>Fe>L>Tc,Tm	1-12	Cu,Fe>90>Tc>Tm
Stigmasterol	1-12	90>60>40>L	1-12	Cu>Fe>Tm>L>Tc	1-2 >2	Cu>Fe>90>Tm>Tc Fe>Cu>90>Tm>Tc
$\beta$ -Sitosterol	1-12	90>60>L>45	1-12	Cu>Fe> Tm>L>Tc		Cu>Fe>90>Tc,Tm Fe>Cu>90>Tm>Tc
$\Delta$ 5-Avenasterol	1-12	90>60>40>L	1-12	Cu>Fe> L>Tm>Tc		Cu>Fe>90>Tm>Tc

Catatan: LO = lama oksidasi dalam minggu; KOA = oksidasi tanpa penambahan logam berat ataupun antioksidan; KOL = oksidasi pada temperatur kamar dengan adanya sinar (L) dengan penambahan 5,0 ppm Cu(II), Fe(II), 100ppm (Tc), atau 750 ppm (Tm)  $\alpha$ -tokoferol; KO90 = oksidasi pada 90<sup>0</sup>C tanpa sinar dengan penambahan 5,0 ppm Cu(II), Fe(II), 100ppm (Tc), atau 750 ppm (Tm)  $\alpha$ -tokoferol.

Berdasarkan Tabel 2 untuk kondisi KOA (oksidasi tanpa penambahan logam berat ataupun antioksidan) dan Gambar 2a–6a, terlihat secara umum bahwa temperatur mempunyai pengaruh terhadap proses oksidasi yang lebih dominan dari pada sinar, meskipun oksidasi dilakukan pada 45<sup>0</sup>C. Sehingga urutan laju oksidasinya adalah 90 °C >60 °C >45 °C >L, kecuali untuk kolesterol dengan waktu oksidasi > 6 minggu dan proses oksidasi  $\beta$ -sitosterol yang menunjukkan bahwa kondisi oksidasi L (temperatur kamar dengan adanya sinar) lebih kuat dari oksidasi pada 45<sup>0</sup>C tanpa sinar. Pengaruh kondisi oksidasi untuk sterol secara umum ini sangat berbeda dengan perlakuan yang sama dengan fokus pengamatan pada perubahan tokoferol lemak coklat menunjukkan bahwa pengaruh kondisi oksidasi tersebut adalah 90<sup>0</sup>C>L>60<sup>0</sup>C>45<sup>0</sup>C [21].

Penambahan logam berat dan  $\alpha$ -tokoferol pada sampel menunjukkan bahwa secara umum kedua logam berat merupakan katalisator sedangkan  $\alpha$ -tokoferol merupakan penghambat proses oksidasi. Berdasarkan Tabel 2 untuk kondisi oksidasi L (KOL) dan Gambar 2b–6b, terlihat secara umum bahwa urutan kekuatan oksidasinya adalah Cu>Fe>L>Tm>Tc, kecuali untuk stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol yang menunjukkan bahwa kondisi oksidasi Tm lebih kuat dari oksidasi pada L dan Tc. Secara umum ditunjukkan bahwa perubahan sterol pada kondisi Tm > Tc, dengan demikian dapat dikatakan bahwa penambahan  $\alpha$ -tokoferol dalam jumlah yang berlebih tidak bersifat sebagai antioksidan lagi tetapi lebih bersifat sebagai prooksidan yang mempercepat laju oksidasi. Hasil ini sedikit berbeda dengan pengamatan terhadap tokoferol lemak coklat yang menunjukkan bahwa pengaruh kondisi oksidasi terhadap laju oksidasi adalah Cu>Fe>L>Tc>Tm. Atau dengan perkataan lain penambahan Tm masih bersifat sebagai antioksidan bahkan lebih efektif dibanding Tc [21].

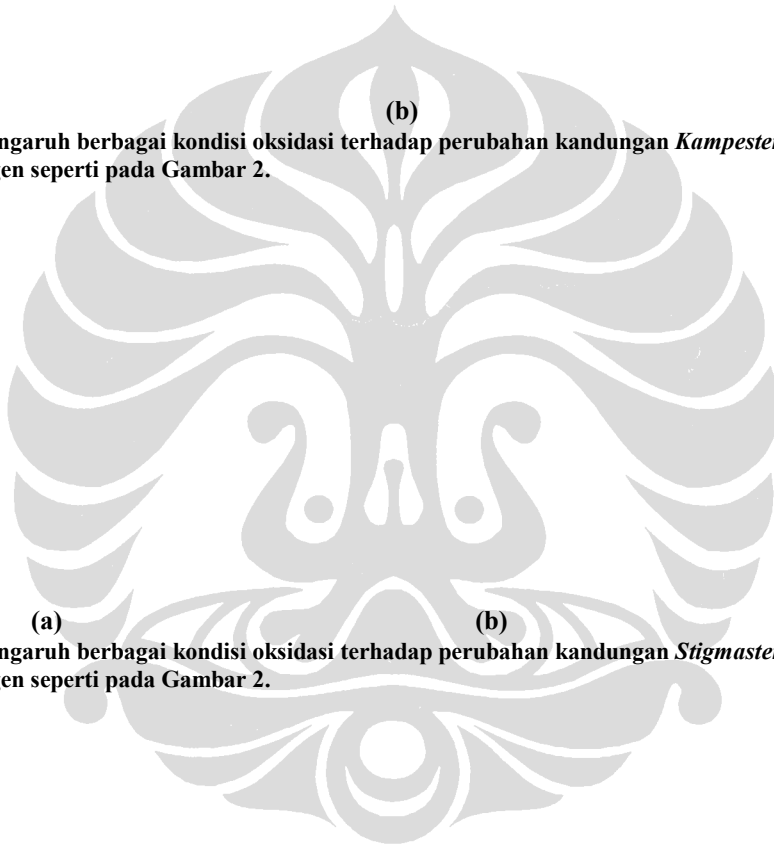
(a)

(b)

(c)

**Gambar 2.** Pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap perubahan kandungan *Kolesterol* lemak coklat (CB). Oksidasi dilakukan: (a) pada temperatur kamar dengan adanya sinar L (CB-L), tanpa sinar pada temperatur tertentu 45 (CB-45),60 (CB-60), atau 90<sup>0</sup>C(CB-90), (b) pada kondisi CB-L serta dengan penambahan 5 ppm Cu(II) (Cu-L), Fe(III), (Fe-L), 100 ppm (Tc-L) atau 750 ppm (Tm-L)  $\alpha$ -tokoferol, (c) kondisi 90<sup>0</sup>C (CB-90) serta dengan penambahan 5 ppm Cu(II) (Cu-90), Fe(III) (Fe-90), 100 ppm (Tc-90) atau 750 ppm (Tm-90)  $\alpha$ -tokoferol.

(a) (b) (c)  
Gambar 3. Pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap perubahan kandungan *Kampesterol* lemak coklat (CB). Keterangan legen seperti pada Gambar 2.



(a) (b) (c)  
Gambar 4. Pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap perubahan kandungan *Stigmasterol* lemak coklat (CB). Keterangan legen seperti pada Gambar 2.

(a) (b) (c)  
Gambar 5. Pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap perubahan kandungan  $\beta$ -*Sitosterol* lemak coklat (CB). Keterangan legen seperti pada Gambar 2.

(a) (b) (c)

**Gambar 6. Pengaruh berbagai kondisi oksidasi terhadap perubahan kandungan  $\Delta 5$ -Avenasterol lemak coklat (CB). Keterangan legen seperti pada Gambar 2.**

Pengamatan pada kondisi KO90°C dan Gambar 2c–6c menunjukkan bahwa urutan kekuatan oksidasi sterol adalah Cu>Fe>90>Tm>Tc, kecuali untuk kolesterol dan  $\beta$ -sitosterol setelah oksidasi > 4 minggu yang menunjukkan bahwa pengaruh Fe > Cu. Secara umum ditunjukkan bahwa perubahan sterol pada kondisi Tm > Tc dengan demikian penambahan  $\alpha$ -tokoferol berlebih tidak bersifat lagi sebagai antioksidan tetapi lebih bersifat sebagai prooksidan. Pengaruh kondisi oksidasi untuk sterol secara umum ini sedikit berbeda dengan pengamatan pada perubahan tokoferol lemak coklat. Hasil penelitian terhadap tokoferol menunjukkan bahwa laju pengurangannya adalah sebagai Fe>Cu>90>Tc>Tm. Atau dengan perkataan lain pengamatan oksidasi tokoferol lemak coklat menunjukkan bahwa penambahan Tm masih bersifat sebagai antioksidan bahkan lebih efektif dibanding Tc. Sedangkan Fe(III) merupakan akselerator oksidasi yang lebih efektif dibanding Cu(II), [21].

Analisis data secara statistika dilakukan dengan bantuan program SPSS 10.0. Hasil analisis ANOVA dua arah dengan faktor kepercayaan 95% atau  $\alpha = 0,05$  menunjukkan bahwa secara umum perbedaan kondisi dan lama oksidasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan kadar masing-masing sterol. Pengamatan antar kondisi oksidasi (KOA : L, 45, 60 atau 90 °C) memberikan perbedaan yang signifikan, kecuali antara kondisi oksidasi L dengan 45 °C dan antara 45 °C dengan 60 °C. Sedangkan pengamatan antar lama oksidasi tidak memberikan perbedaan yang signifikan untuk awal dan akhir oksidasi serta perbedaan waktu oksidasi yang tidak terlalu besar. Pengaruh masing-masing kondisi dan lama oksidasi terhadap seluruh sterol menunjukkan bahwa masing-masing kondisi oksidasi memberikan perbedaan yang signifikan terhadap perubahan kandungan sterol, kecuali lama oksidasi untuk kondisi oksidasi Tm-L. Pengamatan antar jenis sterol memberikan beda signifikan untuk semua kondisi oksidasi, kecuali antara kolesterol dengan  $\Delta 5$ -avenasterol (Ko-Av), serta beberapa kondisi oksidasi untuk kolesterol dengan kampesterol (Ko-Ka) dan kampesterol dengan  $\Delta 5$ -avenasterol (Ka-Av). Sedangkan antar lama oksidasi tidak memberikan beda yang signifikan untuk awal dan akhir oksidasi serta perbedaan waktu oksidasi yang tidak terlalu besar.

#### 4. Kesimpulan

Secara umum terlihat terdapat sedikit perbedaan pola oksidasi dari masing-masing sterol. Namun demikian dapat dikatakan bahwa oksidasi tanpa penambahan antioksidan atau logam berat menunjukkan bahwa pengaruh temperatur tanpa sinar (45°C) lebih kuat dari oksidasi pada temperatur kamar dengan adanya sinar (L). Sehingga urutan pengaruh kondisi oksidasinya adalah 90 °C > 60 °C > 45 °C > L.

Laju oksidasi dipercepat oleh logam berat, sebaliknya untuk penambahan  $\alpha$ -tokoferol. Pada kedua kondisi oksidasi, L dan 90°C, memperlihatkan bahwa efek Cu(II) sedikit lebih kuat dari Fe(III), sedangkan penambahan  $\alpha$ -Tokoferol yang berlebih (Tm) lebih bersifat sebagai prooksidan.

Analisis statistika dengan ANOVA dua arah menunjukkan baik perbedaan kondisi oksidasi maupun lama oksidasi memberikan pengaruh terhadap perubahan kandungan sterol secara signifikan., baik untuk masing-masing jenis sterol maupun keseluruhannya, kecuali pengaruh lama oksidasi untuk kondisi oksidasi Tm-L.

**Daftar Acuan**

- [1] L. Fremont, *Rev. Franc. Corps Gras*. 37 (1990) 355.
- [2] M. Law, *British Medical Journal* 32 (2000) 861.
- [3] N.A. Porter, S.E. Caldwell, K.A. Mills, *Lipids* 10 (1995) 277.
- [4] L.L. Smith. In: S.K. Peng, J.M. Morin (Eds.), *Biological Effects of Cholesterol oxides*, CRC Press, Boca Raton, 1992, p.7.
- [5] L.L. Smith, B.H. Johnson, *Free Radicals Biol. Med.* 7 (1989) 285.
- [6] F. Guardiola, R. Codony, M. Rafecas, A. Grau, A. Jordan, J. Boatella, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2229.
- [7] G. Maerker, *Journal of the American Oil Chemists Society* 64 (1987) 388.
- [8] A.J. Angulo, J.M. Romera, M. Ramirez, dan A. Gil. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4318.
- [9] R.A. Ferrari, W. Esteves, K.D. Mukherjee, dan E. Schulte. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4753.
- [10] K. Warner, dan T.L. Mounts. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67 (1990) 827.
- [11] R. Sandhoff, B. Bruger, D. Jeckel, W.D. Lehmann, F.T. Wieland, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 126.
- [12] L. Hashim, S. Hudiyono, H. Chaveron, *Food Research International* 30 (1997) 163.
- [13] S. Hudiyono, *Sains Indonesia* 3 (1998) 15.
- [14] Y.M. Choo, S.C. Yap, C.K. Ooi, S.H. Ma, *Journal of the American Oil Chemists Society* 73 (1996) 599.
- [15] H.T. Slover, R.H. Thompson Jr., G.V. Merola, *Journal of the American Oil Chemists Society* 60 (1983) 1524.
- [16] H. Chaveron. *Disertasi*, Univ. Compiègne, France, 1967.
- [17] T. Itoh, T. Tamura, T. Matsumoto *Journal of the American Oil Chemists Society* 50 (1973) 300.
- [18] U. Bracco, I. Horman, R. Viani, *Riv. Ital. Delle Sos. Grasse*. Vol. LIII (1976) 167
- [19] G. Lercker, N. Frega, L.S. Coute, P. Capella, *Riv. Ital. Delle Sos. Grasse*. Vol. VLIII (1981) 324.
- [20] J.C. Lecerf, *Doctoral Thesis*, Toulouse (1990)
- [21] S. Hudiyono, *Simposium Kimia Analisis Malaysia ke XIV and Regional Analytical Science Symposium (SKAMM-XIV/RASS)*, Melaka, Malaysia, 2001.