

Penelitian/Research

Oksidasi Vitamin A II.

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Laju Oksidasi Vitamin A dengan *t*-Butil hidroperoksida.

Oxidation of Vitamin A II.

Factors affecting the Rate of Oxidation of Vitamin A with t-Butyl hydroperoxide.

Muhammad Slamet Pardijanto

Balai Penelitian Kemurgi dan Aneka Industri
Balai Besar Litbang Industri Hasil Pertanian
Jl.Ir.H.Juanda 11, Bogor 16122.

Abstract-This report deals with studies on factors affecting the rates of autoxidation and hydroperoxide oxidation of vitamin A. It is shown that the latter process is much more rapid than autoxidation and the significance of this fact is assessed in relation to oxidative losses of vitamin A in fatty foods.

PENDAHULUAN.

Vitamin A merupakan salah satu vitamin yang bersifat dapat larut di dalam lemak disamping vitamin D,E dan K.

Vitamin ini penting peranannya pada tubuh manusia terutama pada kesehatan mata, fungsi-fungsi alat reproduksi, perbaikan lapisan kulit, untuk pertumbuhan tubuh dan kesehatan pada umumnya (BONDI dan SKLAN,1984).

Karena sifatnya yang tidak stabil disebabkan adanya ikatan rangkap di dalam struktur molekulnya, maka vitamin A ini sangat mudah teroksidasi. Laju reaksi oksidasi dipengaruhi oleh sinar atau panas, terutama dengan adanya ion-ion logam dan air (BONDI dan SKLAN,1984).

Pada waktu vitamin A mengalami oksidasi di dalam makanan yang berlemak ada kemungkinan terjadi dua macam oksidasi yaitu: pertama kemungkinan bahwa vitamin A dapat dioksidasikan langsung oleh oksigen dari udara, kedua kemungkinan bahwa vitamin

A dioksidasikan oleh produk-produk oksidasi lemak.

Produk awal dari oksidasi lemak adalah hidroperoksida-hidroperoksida asam lemak. Kemungkinan besar hidroperoksida-hidroperoksida asam lemak ini yang menyerang vitamin A sehingga vitamin A tersebut mengalami kerusakan.

Percobaan ini mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi oksidasi vitamin A oleh hidroperoksida-hidroperoksida asam lemak (sebagai model pengoksid dipergunakan *t*-butil hidroperoksida) dan merupakan percobaan lanjutan setelah terlebih dahulu dilakukan

percobaan oksidasi vitamin A oleh oksigen dari udara (PARDIJANTO,1988).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Pelarut-pelarut yang dipergunakan bermutu Analytical Reagent Grade atau disuling ulang dan light petroleum dari fraksi yang mendidih pada suhu sekitar 60-80° C.

Vitamin A yang dipergunakan berasal dari dua sumber yaitu vitamin A alkohol kristal (Roche) dan vitamin A palmitat (Roche dan Merck). Kemurnian vitamin A alkohol dan vitamin A palmitat diuji dengan NMR spektrometer.

Absorpsi ultra violet vitamin A diukur dengan menggunakan Perkin Elmer 124 Double Beam spektrophotometer dengan sel kwarsa 1 cm.

Khromatografi lapisan tipis (thin layer chromatography) dilakukan dengan 2,5x7,5 cm gelas mikroslide yang dilapisi suspensi silika gel GF 254 (type 60), (30 g) di dalam air (60 ml) atau dengan menggunakan silika gel "precoated plate" ukuran 5x10 cm. Sebagai "developing solvent" dipakai campuran 12% aseton di dalam petroleum ether.

Pengamatan spot dilakukan dengan menggunakan sinar ultra violet dan bila perlu dengan uap iodium.

TLC preparative dilakukakan dengan plate kaca ukuran 20x20cm yang dilapisi silika gel PF 254 (type 60), (50 g) di dalam air (100 ml) dan ketebalannya 1 mm.

Metode.

Pengamatan terhadap faktor yang mempengaruhi laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

a) Ratio t-butyl hidroperoksida:Vitamin A.

Kedalam 1 ml larutan baku vitamin A (10 mg vitamin A di dalam 50 ml khloroform) ditambahkan 0,5 ml larutan baku t-butylhidroperoksida (90 mg t-butylhidroperoksida di dalam 500 ml khloroform), dan volume ditepatkan menjadi 25 ml dengan khloroform. Ratio vitamin A:t-butylhidroperoksida=1:0,45 (b/b). Selanjutnya dibuat satu seri campuran reaksi vitamin A dengan t-butylhidroperoksida (sejumlah tetap vitamin A dengan jumlah t-butyl hidroperoksida yang berbeda-beda) di dalam khloroform. Perbandingan vitamin A dengan t-butylhidroperoksida adalah berturut-turut sebagai berikut:1:0,45 , 1:0,9 ,1:1,8 ,1:4,5 ,1:9, 1:18, 1:22,5 (b/b). Campuran reaksi ini ditempatkan di dalam labu Erlenmeyer yang tertutup dan ditiupkan gas nitrogen lalu ditutup rapat-rapat,dan disimpan di dalam gelap pada suhu kamar.Absorpsi dari masing-masing larutan diukur pada 325 nm, setiap jam selama 6 jam. Kemudian dibuat grafik laju oksidasi vitamin A dengan t-butylhidroperoksida (% vitamin A yang hilang diplot terhadap waktu). Percobaan dilakukan dengan 3 kali ulangan, untuk mendapatkan hasil yang reproducibile. Dari percobaan ini dipilihlah standar ratio vitamin A:t-butylhidroperoksida=1:20 (b/b) untuk melakukan percobaan selanjutnya.

b). Pengaruh suhu.

Larutan vitamin A (400 mikrogram,0,0014 mgrol) dalam khloroform direaksikan dengan t-butylhidroperoksida (8 mg,0,09 mgrol) (Ratio vitamin A:t-butylhidroperoksida=1:20 b/b) di dalam khloroform.Volume larutan kemudian dijadikan 50 ml dengan khloroform.

Oksidasi dilakukan di dalam gelap pada suhu 25,40 dan 60°C. Absorpsi diukur pada 325 nm setiap jam selama 6 jam.

Percobaan diulang 3 kali untuk mendapatkan data yang reproducibile.

c) Pengaruh pelarut.

Larutan vitamin A (400 mikrogram) dalam khloroform direaksikan dengan t-butylhidroperoksida (8 mg) di dalam khloroform dan volume dijadikan 50 ml dengan penambahan khloroform. Oksidasi-Oksidasi dilakukan di dalam pelarut khloroform yang mengandung 1% ethanol dan di dalam pelarut khloroform yang mengandung 10% ethanol.

Absorpsi diukur pada panjang gelombang 325 nm setiap jam selama jangka waktu 6 jam.

d) Pengaruh asam.

Larutan vitamin A (400 mikrogram) di dalam khloroform direaksikan dengan t-butylhidroperoksida (8 mg) di dalam khloroform. Oksidasi dilakukan dalam suasana asam lemah (dengan penambahan asam stearat sehingga kepekatan asam stearat=400 ppm di dalam

larutan oksidasi), dan dalam suasana asam kuat (dengan penambahan asam trikloroasetat sehingga kepekatan asam=400 ppm di dalam larutan oksidasi). Volume akhir larutan adalah 50 ml (dengan penambahan khloroform). Absorpsi diukur pada panjang gelombang 325 nm setiap selang waktu 1 jam selama 6 jam.

e). Pengaruh ion logam.

Larutan vitamin A (400 mikrogram) di dalam khloroform direaksikan dengan t-butylhidroperoksida (8 mg),di dalam khloroform yang diberi tembaga stearat (40 ppm) dan volume dijadikan 50 ml dengan khloroform. Absorpsi diukur pada panjang gelombang 325 nm, setiap selang waktu satu jam selama 6 jam.

Percobaan yang sama juga dilakukan di dalam khloroform yang mengandung besi stearat (40 ppm).

f) Pengaruh antioksidan.

Larutan vitamin A (400 mikrogram) di dalam khloroform direaksikan dengan t-butylhidroperoksida (8 mg) di dalam khloroform yang mengandung butylated hydroxy anisole (BHA) (20 ppm). Volume larutan dijadikan 50 ml dengan penambahan khloroform. Campuran reaksi disimpan di dalam gelap pada suhu kamar dan absorpsi diukur pada panjang gelombang 325 nm setiap jam selama 6 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dimaksudkan untuk melihat kemungkinan terjadinya oksidasi dengan mengamati laju oksidasi vitamin A (dihitung sebagai kehilangan vitamin A) di dalam berbagai proses.

Diharapkan bahwa dari hasil ini dapat diperoleh informasi yang akan dapat membantu menentukan macam oksidasi yang terjadi pada waktu vitamin A mengalami kerusakan di dalam makanan yang mengandung lemak. Percobaan dilakukan untuk mendapatkan penjelasan dari studi perbandingan oksidasi langsung vitamin A oleh oksigen dari udara terhadap oksidasi vitamin A oleh hidroperoksida-hidroperoksida asam lemak.

Pada tahap awal hidroperoksidayang dipakai adalah t-butyl hidroperoksida, dimana zat tersebut dapat dengan mudah diperoleh dipasaran dan dapat dimurnikan di laboratorium.

Berbagai reaksi dilakukan menggunakan sample vitamin A yang telah dimurnikan dan konsentrasinya dibuat sama, lalu dibandingkan laju reaksi oksidasi dengan oksigen dari udara dan reaksi dengan t-butyl hidroperoksida. Khloroform dipilih sebagai pelarut karena merupakan pelarut yang nonpolar dan spesifik dimana vitamin A dan oksidan, keduanya dengan mudah dapat larut di dalamnya.

Pengamatan laju reaksi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

a). Ratio hidroperoksia : vitamin A.

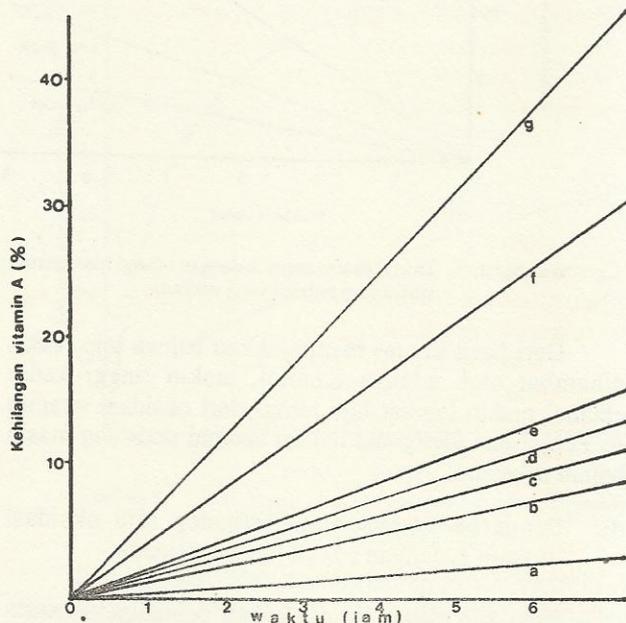
Percobaan laju reaksi vitamin A dengan t-butylhidroperoksida dilakukan dengan jalan mereaksikan

sejumlah tertentu vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida yang jumlahnya bervariasi. Laju reaksi diamati dengan mengukur absorpsi ultra violet dari campuran reaksi pada 325 nm setiap jam selama 6 jam.

Hasilnya dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1 yang merupakan kehilangan vitamin A (%) selama reaksi berlangsung.

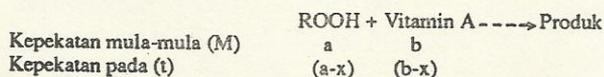
Tabel 1. Kehilangan Vitamin A (%) pada reaksi dengan t-butyl hidroperoksida

Waktu reaksi (jam)	Ratio of vitamin A. tert-butyl hydroperoxide (b/b) :						
	1:0.45 (a)	1:0.9 (b)	1:1.8 (c)	1:4.5 (d)	1:9 (e)	1:18 (f)	1:22.5 (g)
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.8	0.8	2.0	2.4	1.6	4.8	8.3
2	1.3	2.0	4.0	4.8	4.1	10.0	15.7
3	1.7	3.2	5.6	7.1	7.4	14.9	23.1
4	2.5	3.2	6.4	7.9	9.8	19.7	29.8
5	2.5	4.0	9.5	11.9	13.1	25.3	36.8
6	2.5	4.8	11.1	13.5	15.6	29.7	42.2



Gambar 1. Laju reaksi vitamin A dengan t-butylhydroperoksida pada suhu yang berbeda.

Analisa kinetik dibuat berdasarkan data di atas. Meskipun reaksi oksidasi ini merupakan reaksi yang rumit (complex reaction) melibatkan beberapa bagian yang rawan (labil) dari vitamin, dapat disimpulkan bahwa reaksi bersifat sebagai suatu "pseudo second order process"



Laju reaksi mengikuti persamaan: $K_2t = \frac{1}{(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$

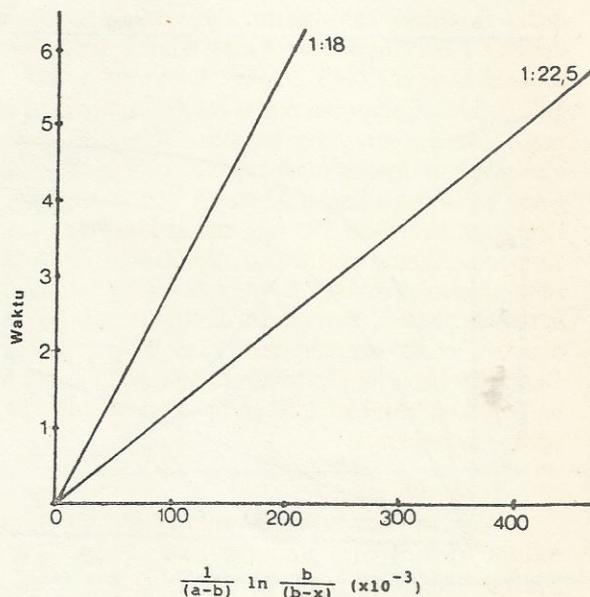
Dimana $a > b$, misalnya perbandingan 22,5:1 maka $(a-x) = a$ (karena x sangat kecil dibandingkan dengan a), maka persamaan diatas berubah menjadi:

$$K_2t = \frac{1}{(a-b)} \ln \frac{ba}{a(b-x)}$$

$$= \frac{1}{(a-b)} \ln \frac{b}{(b-x)}$$

Grafik dari t (waktu) terhadap $\frac{1}{(a-b)} \ln \frac{b}{(b-x)}$ untuk

perbandingan vitamin A: t-butylhydroperoksida= 1:18 dan 1:22,5 dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik hubungan antara waktu reaksi dengan $\frac{1}{(a-b)} \ln \frac{b}{(b-x)}$

Dari gambar di atas terlihat bahwa oksidasi semakin cepat dengan kelebihan t-butyl hidroperoksida yang lebih banyak. Sifat ini sesuai dengan teori kinetik dasar dan laju reaksi sebanding dengan konsentrasi vitamin A, dimana pada keadaan kelebihan t-butyl hidroperoksida yang banyak, tampak bahwa tidak terjadi waktu induksi (induction period) pada oksidasi.

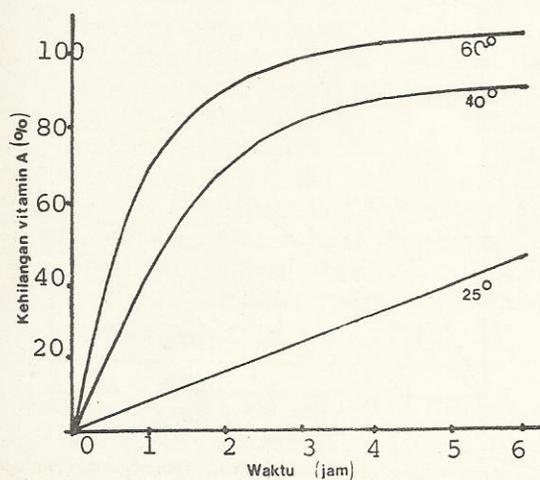
Dari percobaan ini untuk percobaan selanjutnya dipakai perbandingan vitamin A : t-butyl hidroperoksida = 1:20 (b/b).

b). Pengaruh suhu terhadap laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

Dalam percobaan ini dipakai perbandingan vitamin A:t-butyl hidroperoksida=1:20 (b/b) dan percobaan dilakukan pada suhu 25,40 dan 60°C. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 3.

Tabel 2. Kehilangan vitamin A (%) pada reaksi dengan t-butyl hidroperoksida pada suhu yang berbeda.

Waktu reaksi (jam)	Suhu (°C)		
	25	40	60
0	0	0	0
1	7.4	33.5	76.3
2	14.8	68.4	89.7
3	22.1	80.5	96.1
4	28.7	84.5	98.4
5	35.3	86.8	98.8
6	41.0	89.0	98.8



Gambar 3. Laju reaksi vitamin A dengan t-butylhidroperoksida pada suhu yang berbeda.

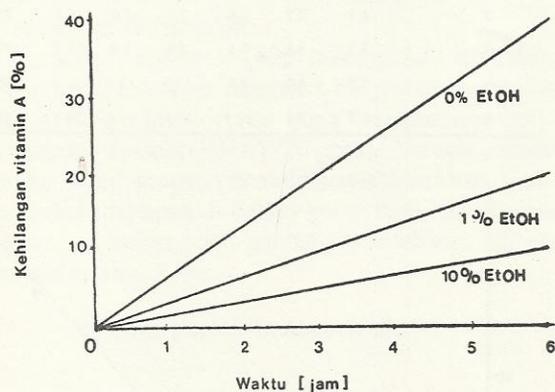
Dari hasil di atas terlihat bahwa laju reaksi bergantung kepada suhu, seperti diduga bahwa oksidasi berlangsung lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi. Sudah umum diketahui bahwa kerusakan vitamin A dalam makanan jauh lebih besar apabila makanan tersebut disimpan pada suhu yang lebih tinggi, tetapi pada umumnya makanan disimpan pada suhu dingin. Jadi percobaan ini sesuai dengan kenyataan sehari-hari.

c). Pengaruh pelarut terhadap laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

Percobaan ini dilakukan di dalam khloroform, di dalam larutan 1% ethanol dalam khloroform dan di dalam larutan 10% ethanol dalam khloroform. Hasilnya dapat dilihat di dalam tabel 3 gambar 4.

Tabel 3. Kehilangan vitamin A (%) pada reaksi dengan t-butyl hidroperoksida dalam pelarut yang berbeda

Waktu reaksi (jam)	Ethanol dalam chloroform		
	0	1	10
0	0	0	0
1	7.4	3.2	2.5
2	14.8	5.8	3.3
3	22.1	9.3	6.6
4	28.7	12.5	7.3
5	35.3	15.4	7.8
6	41.0	18.6	8.4



Gambar 4. Laju reaksi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida dalam pelarut yang berbeda

Dari hasil di atas menunjukkan bahwa laju reaksi dihambat oleh adanya ethanol, makin tinggi kadar ethanol makin lambat laju reaksi dari oksidasi vitamin A. Penjelasan mengenai hal ini sampai sekarang masih belum diketahui.

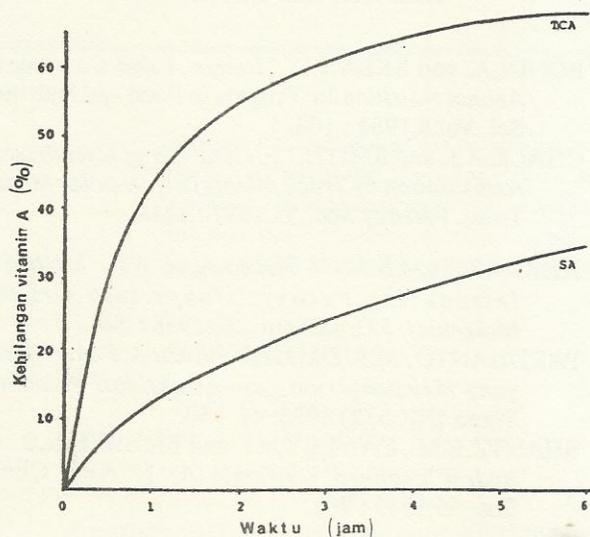
d). Pengaruh katalis asam terhadap laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

Pada percobaan ini dilakukan penambahan asam stearat (400 ppm) dan asam trikloro asetat (400 ppm) pada campuran reaksi. Percobaan ini menunjukkan bahwa penambahan asam trikloro asetat ternyata lebih mempercepat laju reaksi dibandingkan dengan laju reaksi dengan penambahan asam stearat (dapat dilihat pada tabel 4 dan gb.5). Hal ini diduga bahwa asam kuat meng-dehidrasi vitamin A menjadi anhydro vitamin A yang merupakan produk vitamin A yang lebih sensitif terhadap oksidasi seperti ditunjukkan pada reaksi di bawah ini.

e). Pengaruh katalis logam terhadap laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

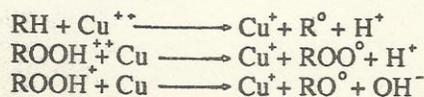
Tabel 4. Kehilangan vitamin A pada reaksi dengan t-butyl hidroperoksida dengan penambahan asam.

Waktu reaksi (jam)	Kehilangan vitamin A (%)	
	Asam stearat 400 ppm	Asam trikloro stearat 400 ppm
0	0	0
1	12,7	43,0
2	16,6	54,2
3	21,5	59,5
4	25,0	59,9
5	28,2	62,3
6	30,3	63,4



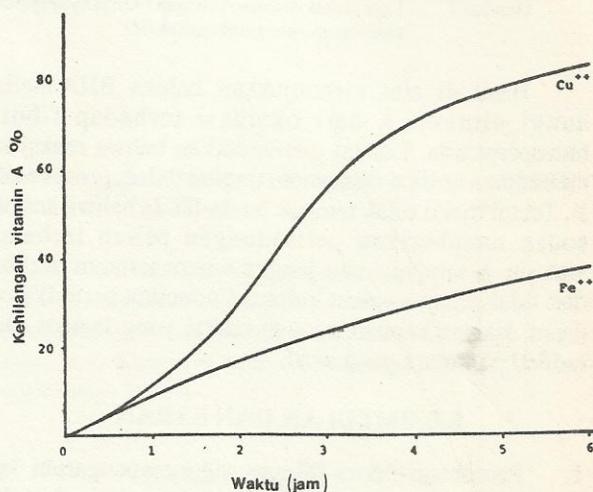
Gambar 5. Laju reaksi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida dengan penambahan asam.

Pengamatan dilakukan terhadap reaksi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida (1:20 b/b) di dalam khloroform dengan penambahan tembaga stearat (40 ppm) dan besi stearat (40 ppm). Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5 dan gb.6. Dibandingkan dengan oksidasi tanpa katalis (tabel 1) disini terlihat bahwa tembaga stearat mempercepat laju oksidasi tetapi besi stearat tidak tampak pengaruh yang nyata. Tembaga merupakan katalis yang umum dipakai pada reaksi oksidasi dan mempercepat laju pemecahan hidroperoksida (KHARASCH, dan FONO, 1958). Dalam percobaan ini sangat mungkin bahwa tembaga membantu pemecahan t-butyl hidroperoksida menjadi radikal perantara yang bereaksi dengan vitamin A. Selain itu tembaga juga dilaporkan dapat bereaksi langsung dengan olefin (CHALK, A.J. dan SMITH, J.F., 1957).



Tabel 5. Kehilangan vitamin A (%) pada reaksi dengan t-butyl hidroperoksida dengan pengaruh ion logam.

Waktu reaksi (jam)	Kehilangan vitamin A (%)	
	Tembaga stearat 40 ppm	Besi stearat 40 ppm
0	0	0
1	11,0	9,5
2	30,2	15,7
3	57,2	22,0
4	70,2	29,0
5	77,7	32,9
6	82,7	36,3



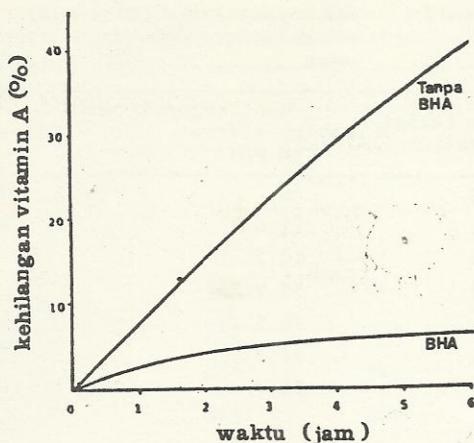
Gambar 6. Laju reaksi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida dengan pengaruh ion logam.

f) Pengaruh antioksidan terhadap laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida.

Percobaan laju oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida dalam khloroform dengan adanya antioksidan juga dilakukan. Butylated hydroksi anisole (BHA) (20 ppm) dipakai sebagai antioksidan, suatu antioksidan yang biasa dipakai di dalam makanan dan preparasi farmasi. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 6 dan gambar 7.

Tabel 6. Kehilangan vitamin A (%) pada reaksi dengan t-butyl hidroperoksida dengan pengaruh antioksidan.

Waktu reaksi (jam)	Kehilangan vitamin A %	
	BHA (20ppm)	Tanpa BHA
0	0	0
1	2.4	7.4
2	4.0	14.8
3	4.8	22.1
4	5.4	28.7
5	6.3	35.3
6	6.8	41.0



Gambar 7. Laju reaksi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida dengan pengaruh antioksidasi

Hasil di atas menunjukkan bahwa BHA melindungi vitamin A dari oksidasi terhadap t-butyl hidroperoksida. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi ini melibatkan radikal pada suatu tingkat dalam proses reaksi. Tetapi disini tidak tampak tanda-tanda bahwa antioksidan memberikan perlindungan penuh terhadap vitamin A sampai suatu jangka waktu tertentu, terlihat dari tidak adanya waktu induksi (induction period) yang dapat diamati, kecuali adanya reaksi yang lambat oleh radikal perantara yang aktif.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Percobaan faktor-faktor yang mempengaruhi laju oksidasi vitamin A dengan oksigen dari udara dan oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida telah dilakukan dan dari hasil yang diperoleh ternyata bahwa proses oksidasi vitamin A dengan t-butyl hidroperoksida sebagai pengoksid lebih cepat dibandingkan dengan autoksidasi vitamin A.

2. Perlu dilakukan percobaan seperti di atas untuk ester vitamin A dan juga pengaruh peroksida methyl linoleat dan peroksida minyak yang terdapat dipasaran terhadap laju oksidasi vitamin A.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Associate Professor G. Crank, School of Chemistry, University of New South Wales, Kensington, NSW, Australia atas bimbingannya selama penelitian ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- BONDI, A. and SKLAN, D. *Vitamin A and Carotene in Animal Nutrition*. In: Progress in Food and Nutrition Sci. Vol.8, 1984 : 166.
- CHALK, A.J. and SMITH, J.F. *Catalysis of Cyclohexene Autoxidation by Trace Metals in Non-polar Media*, Trans. Faraday Soc., 53, 1957 : 1214.
- KHARASCH, M.S. AND FONON, A. *A New Method of Introducing Peroxy Groups into Organic Molecules*. J. Org. Chem., 23, 1958 : 324.
- PARDIJANTO, M.S. *Oksidasi vitamin A. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Laju Autoksidasi Vitamin A*, Warta IHP, 5 (2) 1988: 46 - 50.
- SHANTZ, E.M., CAWLEY, N.J. and EMBREE, N.D. *Anhydro("cyclized") vitamin A*, J. Am. Chem. Soc., 65, 1943 : 901.