

AKTIVITAS DAN STABILITAS RADICAL SCAVENGING L-ASKORBIL PALMITAT HASIL SINTESIS SECARA ENZIMATIK

[Activity and Stability of Radical Scavenging of L- Palmitate Synthesized Enzymatically]

Tri Agus Siswoyo^{1)*}, dan Tri Ardiyati ²⁾

¹⁾Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jln Kalimantan III/23, Jember 68121

²⁾ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Diterima 10 Januari 2009/ Disetujui 7 Desember 2009

ABSTRACT

L-ascorbyl palmitate (AsA-Pal-Enz) was synthesized by using an immobilized lipase from Aspergillus niger. A comparison of antioxidative effects between L-ascorbic acid (AsA) and AsA-Pal-Enz was determined in terms of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging. The results indicate that the AsA-Pal-Enz was effective in preventing lipid oxidation, while the antioxidative activity in authentic AsA-Pal was lower. The activity of AsA-Pal-Enz was very stable than AsA-Pal standard during heating.

Key words : *Aspergillus niger, Lipase, Antioxidant, L-Ascorbic Acid, L-Ascorbyl Palmitate*

PENDAHULUAN

Oksidasi lipid merupakan reaksi utama terjadinya kerusakan pada beberapa jenis pangan yang mengandung lemak atau minyak. Proses ini dapat mengakibatkan penurunan kualitas dengan menimbulkan perubahan seperti bau, rasa dan warna. Ketengikan pada minyak juga disebabkan oleh reaksi oksidasi lipid melalui sederetan mekanisme reaksi. Pertama, pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir (terminasi) yaitu pengubahan menjadi radikal bebas yang stabil dan tak reaktif (Ishido *et al.*, 2002; Simic *et al.*, 1992; Labuza, 1971). Proses oksidasi lipid dapat dicegah dengan menambahkan senyawa antioksidan. Dalam arti khusus antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas atau kemampuan menangkap senyawa radikal (*radical scavenging*) dalam oksidasi lipid (Kochhar dan Rossell, 1990). Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) (Shui dan Leong, 2004).

Asam askorbat (AsA) diketahui mempunyai potensi sebagai antioksidan atau sebagai agen sinergistik antioksidan pada beberapa model dan makanan yang mengandung lipid (Yin *et al.*, 1993). Asam askorbat dapat juga mengakibatkan terpacunya oksidasi (pro-oksidan) pada minyak. Ion besi merupakan hal utama yang mengakibatkan AsA sebagai pro-oksidan (Yin *et al.*, 1993; Harel dan Kanner, 1985). Beberapa jenis derivat AsA telah banyak disintesis diantaranya adalah ester askorbil (AsA-ester) di mana derivat ini mempunyai kemampuan untuk dapat larut dalam minyak. Sintesis AsA-ester secara kimia telah banyak dilakukan terutama di

negara-negara berkembang, akan tetapi metode yang digunakan mempunyai beberapa kelemahan diantaranya adalah instabilitas AsA yang dapat mengakibatkan produksi menjadi rendah dan adanya residu pelarut yang terikat pada produk (Chen *et al.*, 1994). Residu yang terikat pada produk tersebut dalam bidang pangan dan kosmetik sangat tidak direkomendasikan, karena akan dapat menimbulkan efek samping pada pengguna (Humeau, 1995). Diketemukannya lipase sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi atau trans-esterifikasi lipid, membuka suatu wacana baru untuk memproduksi AsA-ester secara enzimatik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas dan stabilitas *radical scavenging* L-askorbil palmitat hasil sintesis secara enzimatik (AsA-Pal-Enz) pada media emulsi linoleat dan virgin coconut oil (VCO).

METODOLOGI

Bahan

Lipase kasar dari *Aspergillus niger* diperoleh dari Amano Pharmaceutical Co., Ltd. (Nagoya), Celite 545 dan asam vinil palmitat dari Fluka. Asam askorbat (AsA) dan askorbil palmitat (AsA-Pal) (Fluka) ; 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan asam linoleat (Wako) dan bahan kimia lainnya yang digunakan diperoleh dari Wako dengan spesifikasi untuk analisis (*analytical reagent grade*).

Sintesis dan isolasi AsA-Pal-Enz.

Sintesis AsA-Pal dilakukan secara enzimatik (AsA-Pal-Enz) dengan menggunakan lipase dari *Aspergillus niger* yang sudah terimmobilisasi (Siswoyo *et al.*, 2006). Campuran reaksi yang terdiri dari AsA, lipase terimmobilisasi dan saringan molekuler (3 Å, yang telah diaktifkan dengan cara memanaskan pada suhu 250°C pada kondisi tereduksi) dalam larutan etil metil keton (EMK). Campuran

* Korespondensi penulis : HP. 08179607263
E-mail : siswoyo.triagus@gmail.com

reaksi tersebut diinkubasikan pada suhu 40°C selama 6 jam dengan kecepatan pengadukan 450 rpm. Reaksi dimulai dengan menambahkan asam vinil palmitat. Hasil sintesis diisolasi menggunakan metode yang dijelaskan pada Siswoyo *et al.*, (2006). Isolasi hasil sintesis dianalisis secara kualitatif menggunakan TLC dan HPLC.

Analisis HPLC dan TLC

Analisis hasil sintesis AsA-Pal-Enz dilakukan menggunakan HPLC dengan jenis kolom Altima C18 (4,6 × 250 mm; Nacalai Tesque, Kyoto). Larutan sampel (10 µL) diinjeksikan pada kolom dengan larutan elusi berupa metanol/air/asam fosforat (95/5/0,1, per vol) dengan kecepatan aliran 1,0 mL/min. Hasil larutan elusi dimonitor menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 245 nm. Analisis TLC menggunakan plat gel silika 60F240 (Merck) dengan system pengembangan menggunakan etil-asetat:metanol:air (80:20:5, per vol.). Visualisasi spots menggunakan pereaksi Cer (25 g asam molibdofosforat dan 10 g Cer(IV)-sulfat dilarutkan dalam 300 mL akuades dan 80 mL H₂SO₄ pekat dengan volume akhir 1 L, setelah itu dipanaskan pada suhu 110°C selama 5 min).

Pengukuran potensi aktivitas radical scavenging

Potensi aktifitas *radical scavenging* sampel diukur menggunakan metode *DPPH Radical-Scavenging* berdasarkan jumlah donor hidrogen atau kemampuan *radical scavenging* dari radikal berupa DPPH yang stabil (Yamaguchi *et al.*, 1998; Gadow *et al.*, 1997). 500 µM DPPH dalam etanol disiapkan sebagai larutan stock. 0,6 mL larutan DPPH dan 2,4 mL etanol dicampurkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,1 mL larutan metanolik sampel. Setelah dibiarkan pada suhu ruang selama 30 min, penurunan absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan Shimadzu spectrophotometer UV-160A (Kyoto, Japan). Absorbansi larutan DPPH tanpa sampel diukur untuk digunakan sebagai kontrol. Perhitungan persentase reduksi DPPH dilakukan berdasarkan persamaan (Tomaino *et al.*, 2005):

$$\% \text{ DPPH} = (\text{DPPH}/\text{DPPH}_0) \times 100\%$$

dimana: konsentrasi DPPH diperoleh berdasarkan persamaan linier $\text{DPPH} = (3,4 \times 10^{-4})A_{517} + (7,5 \times 10^{-7})$ dan DPPH_0 adalah konsentrasi DPPH pada awal reaksi.

Aktivitas radical scavenging L-askorbil palmitat pada emulsi asam linoleat

Aktivitas *radical scavenging* AsA-Pal-Enz (suatu antioksidan) pada emulsi asam linoleat digunakan sebagai model terhadap kemampuan AsA-Pal-Enz. Aktifitas antioksidan ini diukur dengan metode thiosianat (Mitsuda *et al.*, 1966). 500 µg AsA-Pal-Enz dalam 0,5 mL air yang tidak berion dicampur dengan larutan asam linoleat (2,5 mL, 0,02 M, pH 7,0) dan bufer fosfat (2 mL, 0,2 M, pH 7,0). Preparasi emulsi asam linoleat dilakukan dengan mencampur 0,2804 g asam linoleat, 0,2804 g Tween-20 sebagai emulsifier dan 50 mL buffer fosfat. Selanjutnya campuran dihomogenkan dan diinkubasikan pada suhu 37°C. Sebanyak 0,1 mL dari larutan reaksi diambil untuk dianalisis pada interval waktu yang berbeda

selama inkubasi. Derajat oksidasi diukur berdasarkan metode thiocyanate, perubahan yang terjadi dimonitor dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

Stabilitas radical scavenging L-askorbil palmitat

Sampel antioksidan (AsA; AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz) ditambahkan sebanyak 1% (w/w) pada tabung reaksi bertutup yang sudah berisi asam linoleat dan virgin coconut oil (VCO) dan diinkubasikan pada beberapa suhu yang berbeda (suhu ruang (28°C), 60; 80; 100 dan 120°C) selama 3 jam. Stabilitas *radical scavenging* diukur menggunakan metode DPPH (Yamaguchi *et al.*, 1998; Gadow *et al.*, 1997), sedangkan perhitungan persentase reduksi DPPH dilakukan berdasarkan persamaan yang disebutkan sebelumnya (Tomaino *et al.*, 2005).

Analisis statistik

Analisis statistik menggunakan analisis co-variance (ANOVA) dan perbedaan antar sampel dihitung menggunakan Duncan's multiple range test (Window SPSS program versi 10.05).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis AsA-palmitat

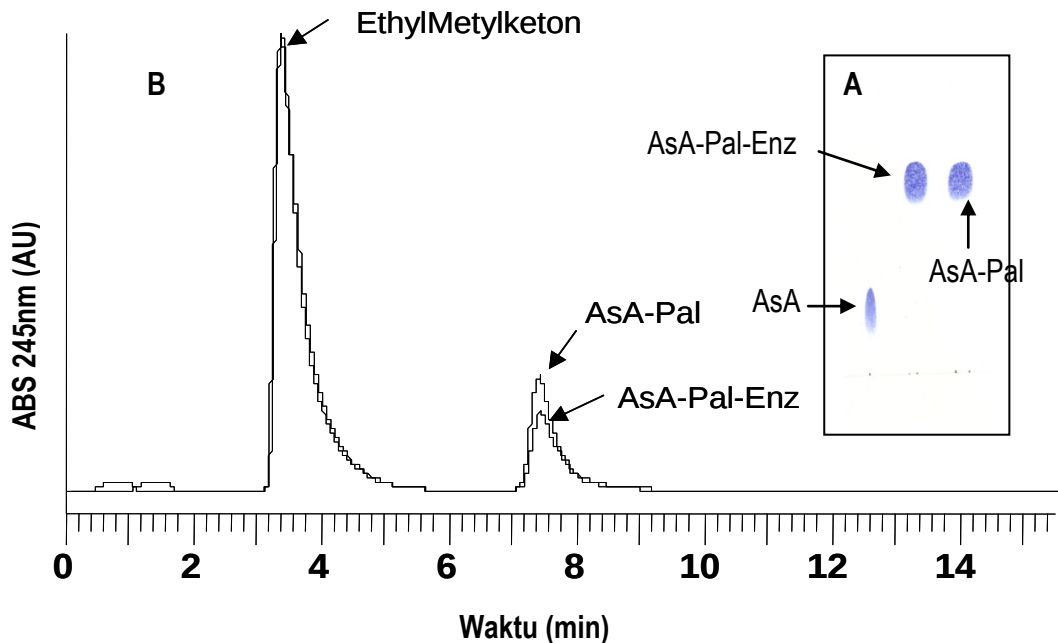
Hasil sintesis L-askorbil palmitat (AsA-Pal) secara enzimatis dengan menggunakan larutan EMK dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada gambar tersebut terlihat adanya spot baru pada TLC dengan *rate of flow* (Rf) sekitar 0,82 dimana nilai tersebut hampir sama dengan nilai Rf dari AsA-Palmitat standard. Begitu pula hasil analisis HPLC kromatogram, AsA-Pal-Enz dan AsA-Pal standard menunjukkan puncak tunggal dengan waktu retensi yang sama sekitar 7,7 min (Gambar 1B).

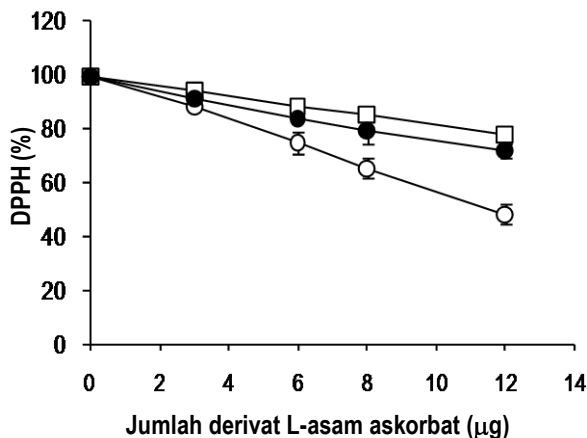
Etil metil eton (EMK) dengan nilai Log *P* (o/w) 0.29 (Effenberger *et al.*, 1997) mengindikasikan terbentuknya AsA-Pal-Enz. Hal ini dapat dimungkinkan bahwa larutan tersebut mempunyai kemampuan polaritas yang sedang untuk dapat membatasi jumlah air dalam konfigurasi struktur aktif enzim, sedang untuk yang lain tidak ditemukan. Log *P* ini sangat umum digunakan untuk prediksi kemampuan katalitik dan karakter enzim pada suatu larutan (Parida dan Dordick, 1991).

Aktivitas radical scavenging

Potensi aktifitas derivat AsA (AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz) diukur menggunakan DPPH dan emulsi linoleat. Gambar 2 menunjukkan peningkatan derivat AsA mengakibatkan penurunan persentase reduksi DPPH secara linier. Penambahan konsentrasi AsA sebesar 12 µg menghasilkan penurunan persentase reduksi DPPH terendah (48%) diikuti AsA-Pal-Enz (72%) dan AsA-Pal standard (78%). Penurunan persentase DPPH menunjukkan kemampuan derivat AsA dalam mereduksi DPPH, hal ini dapat digunakan sebagai indikator adanya aktivitas suatu senyawa sebagai antioksidan (Tomaino *et al.*, 2005).



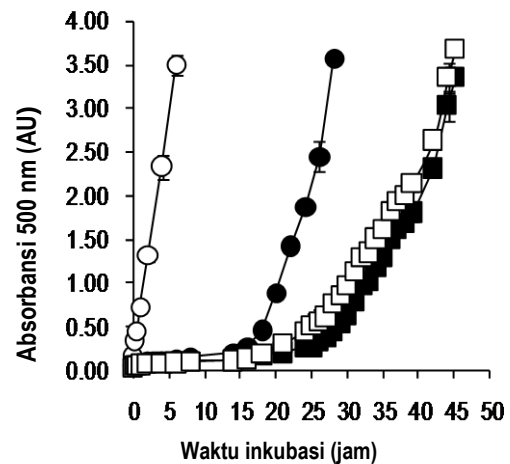
Gambar 1. Hasil TLC (A) dan HPLC (B) kromatogram dari L-askorbil palmitat standard (AsA-Pal) dan hasil sintesis secara enzimatik (AsA-Pal-Enz).



Gambar 2. Aktivitas antioksidan derivat L-asam askorbat (AsA) diukur menggunakan DPPH. ○, AsA; □, AsA-Pal; ●, AsA-Pal-Enz.

Sebaliknya aktivitas antioksidan AsA dalam menghambat pembentukan senyawa peroksi pada sistem emulsi linoleat menunjukkan hasil yang berbeda, seperti terlihat pada Gambar 3. Penambahan sebesar 12 μ g AsA mengakibatkan terjadinya peningkatan nilai peroksi secara linier sampai akhir inkubasi (6 jam) atau 10 jam lebih cepat dengan kontrol, sedangkan untuk AsA derivat (AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz) dapat menghambat oksidasi 10 jam lebih lama daripada kontrol. Menurut Mitsuda *et al.*, (1966), terbentuknya senyawa peroksi selama oksidasi asam linoleat dapat mengakibatkan perubahan ion ferro menjadi ion ferri dan ion ferri yang terbentuk akan berikatan dengan ion tiosianat membentuk kompleks ferri tiosianat. Kompleks ferri tiosianat akan membentuk

warna merah dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 500nm.



Gambar 3. Pengukuran aktifitas antioksidan derivat L-asam askorbat pada emulsi linoleat menggunakan metode tiosianat. ●, Kontrol; ○, AsA; ■, AsA-Pal; □, AsA-Pal-Enz.

Dari hasil tersebut (Gambar 3), menunjukkan bahwa AsA memacu terjadinya oksidasi pada emulsi linoleat (pro-oksidan) sedangkan AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz bersifat menghambat oksidasi (antioksidan). Menurut Frankel (1995) derivat L-asam askorbat mempunyai sifat yang bertentangan (antioksidan dan pro-oksidan) tergantung kondisi reaksi, bentuk derivat dan konsentrasinya. Selanjutnya Beddow *et al.*, (2001), Marinova dan Yanishliwa (1992) menjelaskan bahwa proses oksidasi lipid pada kondisi normal AsA derivat berfungsi sebagai antioksidan jika dalam reaksinya berfungsi sebagai donor hidrogen pada peroksid radikal, selanjutnya dapat diasumsikan bahwa AsA memotong rantai

oksidasi dalam pembentukan lipid peroksid dan alkosil radikal. Sedangkan pada proses pro-oksidasi AsA tidak dapat menjadi donor hidrogen pada peroksi radikal dikarenakan AsA membentuk askobil radikal secara cepat pada kondisi kelarutan yang rendah, hal ini berbeda dengan AsA yang teresterkan (AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz) (Cort, 1982; Takahashi *et al.*, 1986) dan berpengaruh juga penyebaran secara isometrik dalam pembentukan formasi hidroperoksi (Porter *et al.*, 1980; Porte, 1986).

Stabilitas radical scavenging

Stabilitas aktifitas derivat AsA (AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz) dalam emulsi linoleat (LA) dan virgin coconut oil (VCO) pada suhu yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1. Pada suhu ruang aktifitas *radical scavenging*-nya tidak menunjukkan perbedaan nyata, perbedaan mulai terlihat nyata terjadi pada perlakuan suhu 120°C, dimana kemampuan aktifitasnya mengalami penurunan terutama untuk AsA-Pal baik pada media LA atau VCO.

Dari data tersebut juga menunjukkan bahwa kemampuan stabilitas AsA-Pal-Enz relatif lebih baik khususnya pada suhu 120°C, sedangkan pada suhu 80°C yang baik justru AsA-Pal pada sistem LA atau VCO. Sedangkan perbedaan nilai stabilitas L-askorbil palmitat pada sistem emulsi, VCO lebih tinggi daripada LA. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya suatu sinergistik antioksidan antara L-askorbil palmitat dengan endogenous antioksidan dari VCO. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.*, (2002) dan Gordon *et al.*, (1991) pada coconut oil ditemukan beberapa senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan seperti phytosterol, tocopherol dan tocotrienol.

Tabel 1. Stabilitas *radical scavenging* L-askorbil palmitat (AsA-Pal dan AsA-Pal-Enz) dalam emulsi linoleat (LA) dan virgin coconut oil (VCO) pada suhu yang berbeda selama 3 jam*

	RT	Sisa DPPH (%)			
		60°C	80°C	100°C	120°C
LA-AsA-Pal	54,3±3,0a**	52,7±3,9a	52,9±3,9a	69,8±2,2b	84,3±2,5c
LA-AsA-Pal-Enz	57,5±2,4a	59,8±2,5b	62,4±2,0b	66,8±1,7ab	72,2±0,3a
VCO- AsA-Pal	58,2±1,4a	58,0±2,3b	53,2±3,9a	62,9±5,2a	78,2±2,9b
VCO-AsA-Pal-Enz	58,0±3,2a	59,2±0,7b	63,5±0,8b	67,5±1,1ab	69,8±1,0a

*Data merupakan hasil dari rata-rata ±SD dari tiga kali pengulangan. **Notasi yang berbeda untuk setiap kolom menunjukkan berbeda nyata (p<0,05).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa L-askorbil palmitat hasil sintesis secara enzimatik mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. Pemanasan berpengaruh nyata terhadap penurunan aktifitas antioksidan L-askorbil palmitat. L-askorbil palmitat hasil sintesis secara enzimatik menunjukkan kemampuan yang relatif lebih tahan panas baik pada sistem emulsi linoleat atau virgin coconut oil dibandingkan dengan L-askorbil palmitat standard.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari dana hibah bersaing XII (DIKT/DP2M) untuk disampaikan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Beddows CG, Jagait C, Kelly MJ. 2001 Effect of ascorbyl palmitate on the preservation of α -tocopherol in sunflower oil, alone and with herbs and spices. *Food Chem.*73:255-261.
- Chen ST, Chen SY, Chen SJ, Wang KT. 1994 Vinyl Carboxylate, an acylating reagent for selective acylation of amines and diols. *Tetrahedron Lett.* 35:3583-3584.
- Cort WM. 1982 Antioxidant properties of ascorbic acid in foods. In :*Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism, and Uses*. P.A. Seib and B.M. Tolbert (eds.), 533-550. American Chemical Society, Washington
- Effenberger F, Graef BW, Bwald S. 1997 Preparation of (S)-naproxen by enantioselective hydrolysis of racemic naproxen amide with resting cells of *Rhodococcus erythropolis* MP50 in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16: 2749-2755
- Frankel EN. 1995 Natural and biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications. *Lipid Tech.*7:77-80.
- Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. 1997 Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632-638.
- Gordon MH, Rahman IA. 1991 Effect of processing on the composition and oxidative stability of coconut oil, *JAOC*.68:574-576.
- Harel K, Kanner J. 1985 Muscle membranal lipid peroxidation initiated by H_2O_2 -activated metmyoglobin. *J. Agric. Food Chem.* 33: 1188-1192.
- Humeau C, Girardin M, Rovel B, Miclo A. 1998 Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *J. Mol Catal B. B: Enzymatic* 5:19-23.
- Ishido E, Adachi A, Minemoto Y, Matsuno, R. 2002 Kinetic expression for the oxidation of linoleic and arachidonic acid esters in their mixed system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66:73-77.
- Kochhar SP, Rossell JB. 1990 Detection, estimation and evaluation of antioxidant in food system. In: *Food Antioxidants*. Hudson, B.J.F (eds). Elsevier. Applied Science. London and New York.
- Labuza TP. 1971 Kinetics of lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. in Food Technol.* 2:355-404.

- Marinova EM, Yanishlieva NV. 1992 Inhibited oxidation of lipids III: On the activity of ascorbyl palmitate during the autoxidation of two types of lipid systems in the presence of α -tocopherol. *Fat Sci. Technol.* 94:448-452.
- Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. 1966 Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, 19, 210-214.
- Parida S, Dordick JS. 1991 Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:2253-2259
- Porter NA, Weber BA, Weenen H, Khan JA. 1980 Autoxidation of polyunsaturated lipids. Factors controlling the stereochemistry of product hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* 102:5597-5601.
- Porter NA. 1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* 19: 262-268.
- Shui G, Leong LP. 2004 Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Free Radical Biology and Medicine* 36: S132-S132 Suppl. 1
- Simic MG, Jovanovic SV, and Niki, E. 1992 Mechanismes of lipid oxidative process and their inhibition. In "Lipid Oxidation in Food (ACS Symposium Series 500)," ed. By St. Angelo, A.J., American Chemical Society, Washington D.C., pp. 14-32.
- Siswoyo TA, Ardyati, T Miswar 2006 Optimalisasi Sintesa Vitamin C-ester Secara Enzimatis Menggunakan Immobilisasi Lipase dari *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*, 7 (1) 6-12.
- Takahashi M, Niki E, Kawakami A, Kumasaka A, Yamamoto, Y, Kamiya Y. and Tanaka K. 1986 Oxidation of lipids. XIV. Inhibition of oxidation of methyl linoleate by fatty acid esters of L-ascorbic acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 59:3179-3183.
- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A. 2005 Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*. 89:549-554.
- Wang T, Hicks KB, Moreau R. 2002. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 1201-1206.
- Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. 1998 HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1201-1204
- Yin M C, Faustman C, Riesen JW, Williams SN. 1993 α -Tocopherol and ascorbate delay oxymyoglobin and phospholipid oxidation in vitro. *J. Food Sci.* 58:1273-1276, 1281.