

THE EFFECT OF HEATING TIME TO THE CONTENT OF PIGMENTS AND VITAMIN A IN CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) AND CEARA-RUBBER (*Manihot glaziovii* Muell. Arg) LEAVES

*Pengaruh Lama Pemanasan Terhadap Kandungan Pigmen serta Vitamin A Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dan Daun Singkong Karet (*Manihot glaziovii* Muell. Arg)*

Madalena¹, Heriyanto², Susanti Pudji Hastuti¹ and Leenawaty Limantara^{1,2,3,*}

¹ Faculty of Sciences and Mathematics, Satya Wacana Christian University Jl. Diponegoro 52 – 60, Salatiga 50711

² Workstation of Mochtar Riady Institute for Nanotechnology, Lippo Karawaci

³ Magister Biology, Satya Wacana Christian University Jl. Diponegoro 52 – 60, Salatiga 50711

Received 28 September 2006; Accepted 8 November 2006

ABSTRACT

Cassava and ceara-rubber leaves are leavy vegetables that can not be consumed in raw form because they contained cyanide, therefore cooking process is needed to remove the cyanide. However cooking process cause the changes of the content of pigments and vitamin A. The aims of the research are to know and to compare the effect of heating time to the content of pigments and vitamin A in cassava and ceara-rubber leaves. Content of chlorophyll and carotenoid was analyzed base of Porra and Lichtenthaler equations, respectively, while pheophytin content was analyzed base on HPLC. The result shown that the content of chlorophylls, carotenoids and vitamin A of cassava and ceara-rubber leaves were reduced, while the content of pheophytin was increased during heating. Pheophytin was the main product degradation of chlorophyll during heating of cassava and ceara-rubber leaves.

Keywords: heating process, cassava, pigment, vitamin A.

PENDAHULUAN

Sayuran hijau banyak dikonsumsi oleh masyarakat sebagai makanan sehari-hari, di antaranya adalah bayam, sawi hijau, kangkung, daun singkong, daun pepaya dan lain-lain. Hal ini dikarenakan sayuran hijau mudah diperoleh, harganya relatif murah sehingga mudah dijangkau oleh semua lapisan masyarakat, selain itu juga memiliki kandungan gizi dan non gizi yang sangat diperlukan oleh tubuh [1,2]. Daun singkong diketahui mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi karena kandungan protein, vitamin, serat dan mineral. Dua jenis daun singkong yang banyak dikonsumsi adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dan daun singkong karet (*Manihot glaziovii* M.A.).

Kesegaran sayuran menentukan selera makan dan kualitas gizi sayuran tersebut. Secara umum kesegaran sayuran dapat dilihat dari kenampakan luarnya terutama warna, sedangkan warna sayuran sangat ditentukan oleh kandungan pigmen dalam sayuran tersebut. Dilihat dari kenampakan warna hijau tua pada daun singkong dan daun singkong karet, maka dapat dikatakan bahwa keduanya memiliki pigmen dominan yaitu klorofil dan karotenoid [3].

Proses pengolahan sayuran yang banyak digunakan oleh masyarakat untuk menambah cita rasa makanan adalah dengan cara pemasakan atau

perebusan. Pemanasan dilakukan untuk menghilangkan kandungan racun dalam bahan segar seperti sianida pada daun singkong [4], namun proses pemasakan ini juga dapat menyebabkan kandungan pigmen serta vitamin A mengalami perubahan [5,6].

Hingga saat ini, penelitian mengenai pengaruh lama pemanasan terhadap kandungan pigmen serta vitamin A daun singkong dan daun singkong karet belum dilakukan. Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dan membandingkan pengaruh lama pemanasan terhadap kandungan pigmen dan vitamin A daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dan daun singkong karet (*Manihot glaziovii* M.A.).

METODE PENELITIAN

Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dan daun singkong karet (*Manihot glaziovii* M.A.) yang diperoleh dari daerah Salatiga, Jawa Tengah.

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah CaCO₃; sodium L-askorbat; Na₂SO₄ anhidrat; NaCl; 2,5 mM Buffer fosfat (pH = 7,8); metanol; dietil eter; heksana; aseton; akuades; dan gas N₂.

* Corresponding author. Tel : 0298-321212 Fax : 0298-321433
Email address : shlimantara@yahoo.com

Alat

Alat yang digunakan antara lain: Spektrofotometer berkas tunggal Hitachi U-1100, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Jasco Tri Rotar-II, rotary evaporator, neraca analitis, pH meter HANNA, dan alat-alat gelas.

Prosedur Kerja

Preparasi Sampel

Sampel kontrol yang digunakan adalah 2 g sampel yang diambil dari ± 50 g daun singkong segar yang sudah diacak, dimasukkan ke dalam air panas ($\pm 98-100^\circ\text{C}$) selama 0,5 menit, kemudian secepatnya direndam dalam air es selama 1,5 menit. Untuk sampel yang digunakan dalam perlakuan pemanasan berupa 2 g sampel yang diambil dari sampel segar yang sudah diacak, dimasukkan ke dalam air dalam gelas piala 250 mL yang telah dipanaskan sampai mendidih ($\pm 98-100^\circ\text{C}$) selama 10, 20, 30, dan 60 menit menggunakan tutup dan dengan volume air yang tepat habis.

Ekstraksi Pigmen

Klorofil

Dua gram sampel dipotong kecil-kecil, kemudian ditumbuk dengan mortal sampai halus. Sampel selanjutnya diekstraksi menggunakan 80% aseton dalam 2,5 mM bufer fosfat (pH = 7,8) dengan perbandingan sampel terhadap pelarut 1 : 10 ($^w/v$). Ekstraksi dilakukan secepat mungkin untuk menghindari terjadinya proses oksidasi atau degradasi enzimatis. Ekstrak kemudian disaring, residu yang diperoleh diekstraksi kembali dengan pelarut yang sama sampai seluruh pigmen terangkat. Filtrat hasil ekstraksi digabung, lalu volumenya diukur hingga tepat 100 mL dengan penambahan pelarut.

Karotenoid

Dua gram sampel yang telah dipotong kecil-kecil ditambah sedikit CaCO_3 dan sodium L-askorbat, kemudian ditumbuk dengan mortal sampai halus. Sampel diekstraksi menggunakan pelarut aseton : metanol dengan perbandingan 3 : 7 ($^v/v$). Perbandingan sampel terhadap pelarut adalah 1 : 10 ($^w/v$). Ekstraksi dilakukan secepat mungkin untuk menghindari terjadinya proses oksidasi atau degradasi enzimatis. Ekstrak kemudian disaring dan residu yang diperoleh, diekstraksi kembali dengan pelarut yang sama sampai seluruh pigmen terangkat. Filtrat hasil ekstraksi digabung lalu dipartisi menggunakan dietil eter dan ditambah larutan NaCl jenuh serta air ledeng. Partisi diulang sampai lapisan air tidak mengandung pigmen. Lapisan dietil eter ditampung lalu ditambah Na_2SO_4 anhidrat dan disaring. Ekstrak pigmen dalam dietil eter dipekatkan menggunakan rotary evaporator dan dikeringkan dengan gas N_2 .

Analisis Kandungan Pigmen dan Vitamin A

Klorofil

Ekstrak pigmen dalam 80% aseton dalam 2,5 mM bufer fosfat (pH = 7,8) dianalisis kandungan klorofilnya menggunakan Spektrofotometer berkas tunggal Hitachi U-1100 pada panjang gelombang 663,6 dan 646,6 nm. Kandungan klorofil dihitung menggunakan persamaan Porra [7] dalam satuan $\mu\text{g/mL}$:

$$\text{Klorofil } a = 12,25 A_{663,6} - 2,55 A_{646,6}$$

$$\text{Klorofil } b = 20,31 A_{646,6} - 4,91 A_{663,6}$$

$$\text{Total Klorofil} = 17,76 A_{646,6} + 7,34 A_{663,6}$$

Karotenoid

Ekstrak pigmen dalam dietil eter dianalisis menggunakan Spektrofotometer berkas tunggal Hitachi U-1100 pada panjang gelombang 660,6; 642,2; dan 470 nm. Kandungan karotenoid dihitung menggunakan persamaan Lichtenthaler [8] dalam satuan $\mu\text{g/mL}$:

$$\text{Klorofil } a = 10,05 A_{660,6} - 0,97 A_{642,2}$$

$$\text{Klorofil } b = 16,36 A_{642,2} - 2,43 A_{660,6}$$

$$\text{Total Klorofil} = 7,62 A_{660,6} + 15,39 A_{642,2}$$

$$\text{Total Karotenoid} =$$

$$\frac{1000 A_{470} - 1,43 \text{ klorofil } a - 35,87 \text{ klorofil } b}{205}$$

Konversi Karotenoid-Vitamin A

Berdasarkan hasil perhitungan total karotenoid maka dapat diketahui kandungan total vitamin A dengan mengkonversikan kandungan total karotenoid menggunakan rumusan NAS-NRC [9]:

Retinol ekuivalen (RE)

$$= 1 \mu\text{g retinol}$$

$$= 6 \mu\text{g } \beta\text{-karoten}$$

$$= 12 \mu\text{g karotenoid provitamin A yang lain}$$

$$= 3,33 \text{ IU aktivitas vitamin A dari retinol}$$

$$= 10 \text{ IU aktivitas vitamin A dari } \beta\text{-karoten}$$

$$= 20 \text{ IU aktivitas vitamin A dari karotenoid provitamin A yang lain}$$

Feofitin

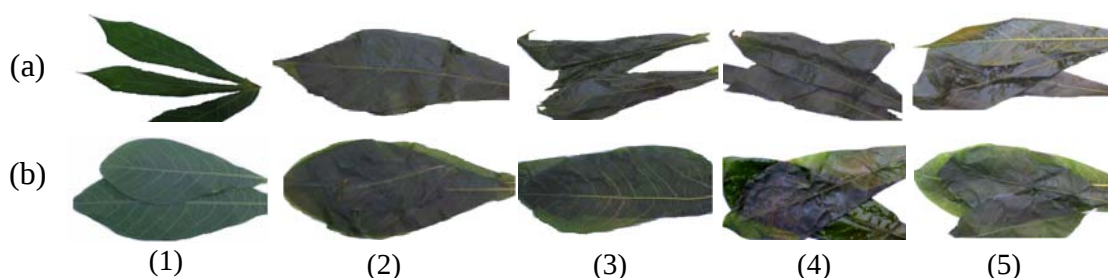
Kandungan feofitin dihitung berdasarkan luas area puncak feofitin terhadap total puncak pada kromatogram hasil Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Jasco Tri Rotar-II [10]. Fase diam yang digunakan adalah Lichrosorb Si-60 dan aseton : heksana 1 : 4 ($^v/v$) sebagai fase gerak. Deteksi pada panjang gelombang 420 nm dengan kecepatan alir 1 mL/menit.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan tiga kali pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemasakan sayuran hijau dapat mengakibatkan terjadinya perubahan kualitas sayuran seperti warna,



Gambar 1. Perubahan warna (a) daun singkong dan (b) daun singkong karet dalam keadaan (1) segar, pemanasan (2) 10, (3) 20, (4) 30, dan (5) 60 menit

Tabel 1. Kandungan klorofil *a*, klorofil *b* dan total klorofil daun singkong (a) dan daun singkong karet (b) pada berbagai lama pemanasan

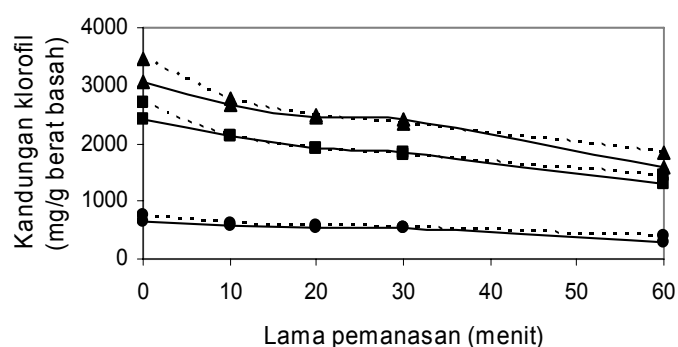
Perlakuan		Konsentrasi ($\mu\text{g/g}$ berat basah) $\pm$ SE		
		Klorofil <i>a</i>	Klorofil <i>b</i>	Total Klorofil
Segar	a	2400 $\pm$ 45	650 $\pm$ 55	3050 $\pm$ 31
	b	2700 $\pm$ 23	760 $\pm$ 181	3460 $\pm$ 188
Pemanasan 10 menit	a	2120 $\pm$ 65	560 $\pm$ 34	2680 $\pm$ 36
	b	2130 $\pm$ 35	620 $\pm$ 46	2760 $\pm$ 12
Pemanasan 20 menit	a	1910 $\pm$ 66	530 $\pm$ 44	2450 $\pm$ 46
	b	1890 $\pm$ 35	590 $\pm$ 46	2480 $\pm$ 36
Pemanasan 30 menit	a	1850 $\pm$ 122	550 $\pm$ 90	2400 $\pm$ 39
	b	1800 $\pm$ 16	550 $\pm$ 71	2350 $\pm$ 59
Pemanasan 60 menit	a	1310 $\pm$ 24	280 $\pm$ 84	1590 $\pm$ 65
	b	1440 $\pm$ 17	410 $\pm$ 70	1850 $\pm$ 72

tekstur serta gizi yang terkandung di dalamnya. Selama pemanasan daun singkong dan daun singkong karet terjadi perubahan warna dari hijau menjadi hijau kekuningan atau hijau kecoklatan (Gambar 1). Menurut Dutton [11], perubahan warna tersebut terjadi karena klorofil mengalami degradasi menjadi turunannya. Perubahan warna sayuran berdampak pada perubahan kandungan pigmennya, seperti klorofil dan karotenoid.

Kandungan Klorofil

Hasil pengukuran kandungan klorofil *a*, klorofil *b* dan total klorofil daun singkong serta daun singkong karet pada berbagai lama pemanasan disajikan pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa kandungan klorofil daun singkong karet lebih tinggi daripada daun singkong. Perbedaan kandungan klorofil ini dikarenakan oleh faktor genetik, dalam hal ini adalah penampilan warna daun. Daun singkong karet memiliki warna yang lebih hijau jika dibandingkan dengan daun singkong. Hasil ini didukung oleh Sitompul dan Guritno [12] yang menyatakan bahwa perbedaan susunan genetik suatu tanaman merupakan salah satu faktor yang menyebabkan perbedaan penampilan tanaman.

Kandungan klorofil *a*, klorofil *b* dan total klorofil daun singkong dan daun singkong karet mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu pemanasan. Penurunan kandungan klorofil disajikan pada Gambar 2. Pemanasan selama 60 menit pada daun singkong



Gambar 2. Grafik kandungan (■) klorofil *a*, (●) klorofil *b* dan (▲) total klorofil daun singkong (—) dan daun singkong karet (-----) pada berbagai lama pemanasan

mengakibatkan penurunan kandungan klorofil *a*, klorofil *b* dan total klorofil sebanyak 35,63; 12,21 dan 47,84%; sedangkan pada daun singkong karet terjadi penurunan sebanyak 36,51; 9,85 dan 46,37%. Hasil ini sesuai dengan penelitian Faboya [13] yang menyatakan bahwa terjadi penurunan total klorofil pada sayuran selama proses pemasakan. Van Loey, dkk. [14] menemukan adanya penurunan total klorofil pada brokoli yang direbus pada suhu 100°C selama 37 menit mengalami penurunan total klorofil sebesar 90%.

Penurunan kandungan klorofil *a* yang lebih besar daripada klorofil *b* baik pada daun singkong maupun daun singkong karet selama pemanasan, menunjukkan

Tabel 2. Kandungan total karotenoid daun singkong dan daun singkong karet pada berbagai lama pemanasan

Perlakuan	Total karotenoid ($\mu\text{g/g}$ berat basah) $\pm$ SE	
	Daun singkong	Daun singkong karet
Segar	807 $\pm$ 45	767 $\pm$ 71
Pemanasan 10 menit	664 $\pm$ 58	599 $\pm$ 58
Pemanasan 20 menit	625 $\pm$ 51	542 $\pm$ 51
Pemanasan 30 menit	578 $\pm$ 17	535 $\pm$ 69
Pemanasan 60 menit	598 $\pm$ 53	469 $\pm$ 29

bahwa klorofil *a* mudah terdegradasi dibandingkan dengan klorofil *b*. Hal ini membuktikan bahwa klorofil *b* relatif lebih stabil daripada klorofil *a* [5].

Kandungan Total Karotenoid dan Vitamin A

Kandungan total karotenoid daun singkong dan daun singkong karet pada berbagai lama pemanasan dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa pada keadaan segar, kandungan total karotenoid daun singkong lebih tinggi yaitu sebesar 806,70 $\mu\text{g/g}$ jika dibandingkan dengan daun singkong karet yaitu sebesar 766,57 $\mu\text{g/g}$.

Kandungan total karotenoid daun singkong dan daun singkong karet mengalami penurunan seiring bertambahnya lama pemanasan. Pemanasan dapat menurunkan kandungan total karotenoid dan vitamin A dalam sayuran [5, 6, 15]. Pemanasan selama 60 menit menyebabkan kandungan karotenoid daun singkong turun sebesar 25,86%; sedangkan pada daun singkong karet mengalami penurunan karotenoid sebesar 38,78%. Khachik, dkk. [16] meneliti kandungan total karotenoid pada bayam terjadi penurunan total karotenoid sebanyak 12,4% selama pemanasan dengan cara pemasakan yang bervariasi. Penurunan kandungan total karotenoid selama pemanasan juga diduga akibat adanya isomerisasi termal [17]. Selama pemanasan terjadi isomerisasi trans-cis karotenoid, sehingga menurunkan total karotenoid dan aktivitas vitamin A. Penurunan kandungan total karotenoid sangat dipengaruhi oleh suhu, cara dan lama pemasakan [18, 19, 20].

Kandungan vitamin A dapat diketahui dengan mengkonversi kandungan total karotenoid menggunakan rumusan NAS-NRC [9]. Kandungan vitamin A daun singkong dan daun singkong karet pada berbagai lama pemanasan disajikan pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan bahwa kandungan vitamin A daun singkong lebih tinggi yaitu sebesar 67,23 RE/g berat

Tabel 3. Kandungan vitamin A daun singkong dan daun singkong karet pada berbagai lama pemanasan

Perlakuan	Vitamin A (RE/g berat basah) $\pm$ SE	
	Daun singkong	Daun singkong karet
Segar	67 $\pm$ 6	64 $\pm$ 5
Pemanasan 10 menit	55 $\pm$ 5	50 $\pm$ 1
Pemanasan 20 menit	52 $\pm$ 4	45 $\pm$ 6
Pemanasan 30 menit	48 $\pm$ 1	45 $\pm$ 6
Pemanasan 60 menit	50 $\pm$ 4	39 $\pm$ 2

basah dibandingkan dengan daun singkong karet yaitu sebesar 63,88 RE/g. Hasil penelitian lain diperoleh bahwa kandungan vitamin A pada daun singkong yaitu sebesar 17,76 RE/g [21] dan 5,5 RE/g atau 110 IU/g berat basah [22].

Penurunan kandungan karotenoid berbanding lurus dengan penurunan kandungan vitamin A selama waktu pemanasan. Pemanasan selama 60 menit menyebabkan terjadinya penurunan kandungan vitamin A pada daun singkong sebesar 25,86 %, sedangkan pada daun singkong karet sebesar 38,78 %. Penteado dan Almeida [23] menyatakan bahwa selama pemasakan daun singkong mengalami penurunan kandungan pro vitamin A sebesar 20-55 %.

Setiawati [24] meneliti kandungan daun singkong sebesar 20,246 $\mu\text{g/g}$ berat basah mengalami penurunan akibat pemanasan selama 30 menit menjadi 15,016 $\mu\text{g/g}$ berat basah. Penelitian Setiawati [24] menggunakan volume air yang tidak tepat habis diduga mengakibatkan sebagian turunan karotenoid (golongan ksantofil) yang larut dalam air tertinggal sebagian dalam air rebusan, sehingga mengurangi kandungan total karotenoid dan vitamin A. Penelitian ini menggunakan perebusan dengan air tepat habis dalam keadaan tertutup sehingga kandungan vitamin A yang hilang relatif lebih kecil.

Waktu pemanasan yang semakin lama menyebabkan isomerisasi termal lebih besar sehingga fungsi aktivitas vitamin A semakin menurun [25]. Suhu pemanasan berperan pada hilangnya kandungan vitamin pada sayuran [5, 14, 20].

Kandungan Feofitin

Klorofil adalah pigmen hijau daun yang bersifat labil terhadap cahaya, panas, oksigen dan suhu [5, 26]. MacKinney dan Weast [27], Gold, dkk. [28], Schwartz dan Lorenzo [29] menyatakan bahwa selama proses pemanasan, atom magnesium dari cincin porfirin pada klorofil digantikan oleh dua atom hidrogen membentuk feofitin yang menghasilkan perubahan warna yang

Tabel 4. Persentase kandungan feofitin daun singkong dan singkong karet pada berbagai lama pemanasan

Sampel daun	Segar	Lama pemanasan (menit)			
		10	20	30	60
Singkong	1,86	19,35	25,46	27,26	32,53
Singkong karet	5,95	20,24	29,37	37,72	54,35

tidak dikehendaki dari hijau terang menjadi coklat pudar. Berdasarkan jalur degradasi klorofil, feofitin merupakan produk pertama yang mudah terbentuk dan paling stabil diantara turunan lainnya. Hal ini menyebabkan keberadaannya sangat dominan selama pemasakan sayuran hijau [30, 31].

Kandungan feofitin dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) berdasarkan massa pita feofitin terhadap total pita yang terbentuk pada kromatogram [10]. Hasil persentase kandungan feofitin daun singkong dan daun singkong karet pada berbagai lama pemanasan disajikan pada Tabel 4. Persentase kandungan feofitin daun singkong pada keadaan segar adalah 1,86%, sedangkan pada daun singkong karet sebesar 5,95%. Watanabe, dkk. [32] menemukan feofitin pada beberapa macam sayuran hijau dalam keadaan segar.

Pemanasan selama 60 menit, meningkatkan kandungan feofitin sebesar 30,67% pada daun singkong, dan 48,4% pada daun singkong karet. Hasil ini didukung oleh Campbell [33] yang menyatakan bahwa feofitin terbentuk pada gandum yang dipanaskan pada suhu 100 °C, yaitu 31% feofitin *a* dan 14% feofitin *b*. Feofitin juga terbentuk sebesar $\pm 44\%$ pada daun kemangi yang dipanaskan selama 30 menit [34].

Peningkatan persentase kandungan feofitin seiring dengan bertambahnya waktu pemanasan diakibatkan oleh asam yang dilepaskan sayuran, dimana asam dapat mendegradasi klorofil menjadi feofitin [35]. Suhu dan waktu pemanasan menjadi faktor utama pembentukan feofitin selama proses pemasakan sayuran hijau [13,14,28,30,31,33,34,36].

KESIMPULAN

Kandungan klorofil, karotenoid serta vitamin A daun singkong dan daun singkong karet mengalami penurunan, sedangkan kandungan feofitin mengalami peningkatan selama pemanasan. Feofitin merupakan produk degradasi utama klorofil selama pemanasan daun singkong dan daun singkong karet.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Alexander von Humboldt, Jerman dan TWAS, Italy atas dukungan dana penelitian kepada L. Limantara.

DAFTAR PUSTAKA

1. Apriadi, W.H., 2001, www.sedap-sekejap.com/artikel/2001/edisi5/files/sehat.htm, 12 Desember 2003.
2. Rubatzky, V.E., and Yamaguchi, M., 1995, *Sayuran Dunia: Prinsip Produksi dan Gizi*. Jilid 1, edisi kedua. Penerbit ITB Bandung, hal. 36-44, 57, 163-179.
3. Anonim., 2002, www.glorianet.org/keluarga/kesehatan/kesebuah.html, 12 Desember 2003.
4. Sepridawati, 2002, www.geocities.com/bahana-tetap/ipetek2014.htm. 01 Desember 2003.
5. Gross, J., 1991, *Pigments in Vegetables*, Van Nostrand Reinhold, New York.
6. Khomsan, A., 2002, <http://www.intisari.com>, 01 Desember 2003.
7. Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E., 1989, *Biochim. Biophys. Acta.*, 975, 384-394.
8. Lichtenthaler, H.K., 1987, *Methods Enzymol.*, 148, 350-382.
9. NAS-NRC, 1974, *Recommended Dietary Allowances*, 8th ed. Food and Nutrition Board, Washington, D.C., 20-45.
10. Madalena, Heriyanto, Hastuti, S.P., and Limantara, L., 2006, *Pengaruh Lama Pemanasan Terhadap Komposisi Pigmen Daun Singkong (Manihot esculenta Crantz) dan Daun Singkong Karet (Manihot glaziovii Muell. Arg)*, Prosiding Seminar Nasional SPMIPA – Universitas Diponegoro.
11. Dutton, H.J., Yu, Z.R., and Kohake, E., 1943, *Ind. Eng. Chem.*, 35(11), 1173-1177.
12. Sitompul, S.M., and Guritno, B., 1995, *Analisis Pertumbuhan Tanaman*, Gadjah Mada University Press., Yogyakarta.
13. Faboya, O.O., 1984, *J. Sci. Food Agric.*, 36, 740-744.
14. Van Loey, A., Ooms, V., Weemaes, Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L., Indrawati, Denys, S., and Hendrickx, M., 1998, *J. Agric. Food Chem.*, 46(12), 5289-5294.
15. Chen, H.E., Peng, H.Y., and Chen, B.H., 1996, *Food Chemistry*, 57(4), 497-503.
16. Khachik, F., Goli, M.B., Beecher, G.R., Holden, J.M., Lusby, W.R., Tenorio, M.D., and Barera, M.R., 1992, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 390-398.
17. Zechmeister, L., 1962, *Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamin A and Anypolyenes*, Academic Press, New York.

18. Borchgrevink, N.C., and Charley, H., 1966, *J. Am. Diet. Assoc.*, 49, 116-121.
19. Schillinger, A., and Zimmermann, G., 1965, *Deutsch, Lebensmittel. Rundsch.*, 61, 144-147 in Gross, J., 1991, *Pigments in Vegetables*, Van Nostrand Reinhold, New York.
20. Simeonova, W., 1965, *Von Pepsin, Nahrung*, 9, 307-312 in Gross, J., 1991, *Pigments in Vegetables*, Van Nostrand Reinhold, New York.
21. Hulshof, P.J.M., Chao, Xu, van der Bovenkamp, P., Muhilal, and West, C.E., 1997, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1174-1179.
22. Karjono, 1993. *Pucuk Tanaman yang Jadi Sayuran*. Trubus, No. 285, Agustus, 12-14.
23. Penteado, M.V.C., and Almeida, L.B., 1988, *Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo*, 24, 39-49.
24. Setiawati, P., 2003, Kandungan Vitamin A Beberapa Jenis Sayuran Berdaun, Skripsi: Fakultas Sains dan Matematika – Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga.
25. Baloch, A.K., Buckle, K.A., and Edward, R.A., 1977, *J. Food Technol.*, 12, 285-293.
26. Almela, L., Fernandez-Lopez, J. A., and Roca M. J., 2000, *J. Chromatogr. A.*, 870, 483-489.
27. MacKinney, G., and Weast, C.A., 1940, *Ind. Eng. Chem.*, 33, 392-395.
28. Gold, H.J., and Weckel, H.G., 1959, *Food Technol.*, 13, 281-286.
29. Schwartz, S.J., and Lorenzo, T.V., 1991, *J. Food. Sci.*, 56, 1059-1062.
30. Charley, H., and Weaver, C., 1998, *Foods, A Scientific Approach*, New Jersey-Colombus, Ohio, 519-524.
31. Haisman, R.D., and Clarke, W.M., 1975, *J. Sci. Food. Agric.*, 26, 1111-1126.
32. Watanabe, T., Nakazato, M., Mazaki, H., Hongu, A., Konno, M., Saitoh, S., and Honda, K., 1985, *Biochim. Biophys. Acta.*, 807, 110-117.
33. Campbell, H., 1937, *Food Res.*, 2, 55-57.
34. Sari, T.M., 2003, Kandungan Klorofil, Klorofilid, Feofitin dan Feoforbida Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L. f. *citratum* Back.), Skripsi: Fakultas Sains dan Matematika – Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga.
35. Buckle, K.A., and Edward, R.A., 1970, *J. Food Technol.*, 5, 173-186.
36. Bacon, M.F., and Holden, M., 1967, *Phytochemistry*, 6, 193-210.