

ISOLASI DAN AKTIVITAS PENSTABIL OKSIGEN SINGLET FRAKSI FENOLIK DARI EKSTRAK ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)

*Isolation and Singlet Oxygen Quenching Activities of Phenolic Fractions from Andaliman Extract (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)*

Edi Suryanto¹, Sri Raharjo², Hardjono Sastrohamidjojo³, Tranggono²

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi perbedaan fraksi fenolik yang terdapat pada ekstrak andaliman dan menentukan aktivitas penstabilan oksigen singlet. Buah andaliman diekstraksi secara berturut-turut dengan heksana, aseton dan etanol (1:5) selama 24 jam. Ekstrak buah andaliman selanjutnya dipisahkan dengan metode elusi gradien dengan kromatografi kolom menggunakan etil asetat-metanol sebagai fasa gerak dan silika gel G-60 sebagai fasa diam. Aktivitas penstabilan oksigen singlet diuji menggunakan asam linoleat sebagai substrat yang mengandung 100 ppm eritrosin sebagai fotosensitizer. Fraksi aktif dikarakterisasi dengan teknik spektrometer IR dan UV. Fraksi II ditemukan memiliki sifat-sifat sebagai penstabil oksigen singlet yang sama efektifnya dengan fraksi III. Efek penstabilan fraksi II dan III lebih tinggi daripada α -tokoferol ($p < 0,05$). Fraksi II diidentifikasi dengan spektrometer IR dan sampel menunjukkan bahwa terdapat penyerapan yang sangat kuat pada 3356 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus hidroksil dari senyawa fenolik sedangkan spektra UV menunjukkan data fraksi aktif mengindikasikan adanya serapan maksimum berturut-turut adalah 204, 221 dan 272 nm. Kesimpulannya adalah komponen fraksi ekstrak andaliman menunjukkan aktivitas penstabilan oksigen merupakan komponen yang memiliki gugus fenolik.

Kata kunci: Ekstrak andaliman, fraksi fenolik, penstabilan oksigen singlet

ABSTRACT

The objectives of this study was to isolate the different phenolic fractions present in andaliman extract and to determine their singlet oxygen quenching activities. Andaliman fruit was sequentially extracted with hexane, acetone and ethanol (1:5) for 24 hours, respectively. The extracts of andaliman fruit were further separated by gradient elution methods with column chromatography, using ethyl acetate-methanol as mobile phase and silica gel G-60 as stationary phase. Singlet oxygen quenching activities was examined using linoleic acid as substrates each containing 100 ppm erythrosine as a photosensitizer. The active fractions were characterized by IR and UV spectrometry techniques. Fraction II was discovered having properties as quencher of singlet oxygen effectively as well as fraction III. The quenching effect of fractions II and III were much higher than that of α -tocopherol ($p < 0.05$). The fraction II was identified by IR spectrometry, and the sample showed that strongest absorption at 3356 cm^{-1} indicating hydroxyl group from the phenolic compounds and the UV spectra showed that data of active fractions indicated an absorption maximum were 204, 221 and 272 nm, respectively. The conclusion was that fractions component of andaliman extract showing singlet oxygen quenching activity was a component having phenolic group.

Keywords: Andaliman extract, phenolic fractions, singlet oxygen quenching

LATAR BELAKANG

Radikal bebas dan *reactive oxygen species* (ROS) merupakan pemicu terjadinya sejumlah penyakit seperti inflamasi, gangguan metabolik, penuaan selular, atherosclerosis

dan karcinogenesis. ROS termasuk radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal anion superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$). Diantara ROS tersebut, oksigen singlet memberikan banyak ketertarikan sebagai suatu pengoksidasi biologi dan memperlihatkan sifat pengoksidasi

¹ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Jl. Kampus Kleak, Manado 95115, Email: edisuryanto@yahoo.com

² Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Yogyakarta 55281

³ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Sekip, Yogyakarta 55281

yang unik serta reaktivitasnya sangat tinggi terhadap komponen biologi seperti protein, lipida, vitamin dan DNA (Foote dkk., 1970; Jung dkk., 1995; Jung dkk., 1998; King dan Min, 2002; Choe dan Min, 2005).

Oksigen singlet adalah suatu jenis ROS yang non radikal elektrofilik (Min dan Boff, 2002; Choe dkk., 2005). Oleh karena itu, oksigen singlet bisa mempengaruhi suatu proses oksidasi yang khas melalui penyerangan secara langsung kepada senyawa yang kaya elektron tanpa keterlibatan radikal bebas. Oksidasi komponen biologi yang terinduksi oleh oksigen singlet bisa dihubungkan dengan berbagai jenis peristiwa patologis seperti pigmentasi, katarak, penuaan kulit dan kanker (Davies dan Goldberg, 1987; Shahidi, 1997; Haliwell dan Guttridge, 2001).

Penelitian tentang peran rempah-rempah sebagai penangkap radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal anion superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) telah banyak dilakukan (Martinez-Tome dkk., 2001; Dragland dkk., 2003; Agbor dkk., 2005; Juntachote dan Berghofer, 2005); Shan dkk., 2005; Jayaprakasha dkk., 2006). Penggunaan rempah-rempah sebagai penghambat oksidasi dalam masakan telah lama terbukti, di samping bahan alam tersebut mudah diperoleh dan aman dikonsumsi serta tidak mempunyai resiko terhadap kesehatan pada konsumen. Dengan demikian penggunaan rempah-rempah menjadi bahan pertimbangan dan kecenderungan meningkatkan ketertarikan konsumen terhadap zat aditif dari bahan alam.

Buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) termasuk jenis rempah-rempah tradisional dan mempunyai aroma yang khas, seperti jeruk. Buah andaliman sangat digemari oleh masyarakat Sumatera Utara, Aceh Tenggara dan Aceh Tengah. Selain sebagai penghasil flavor yang khas dalam berbagai produk makanan tradisional, buah andaliman mempunyai kasiat menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti sakit perut, sakit gigi, antipiretik dan membangkitkan nafsu makan (Perry, 1978). Penelitian andaliman sebelumnya terutama terfokus pada metode ekstraksi dengan beberapa jenis pelarut. Ekstrak etanol andaliman menunjukkan penangkap radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan penstabil oksigen singlet lebih tinggi daripada ekstrak aseton dan heksana (Suryanto dkk., 2004; Suryanto dkk., 2005a; Suryanto dkk., 2005b). Tujuan penelitian adalah isolasi fraksi fenolik ekstrak andaliman dan menentukan aktivitas penstabil oksigen singlet fraksi fenolik yang dipisahkan dengan kromatografi kolom.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan penelitian terdiri atas buah andaliman yang diperoleh dari pasar lokal di Medan, dan bahan kimia

meliputi metanol, etil asetat, asam asetat, kloroform, kalium iodida, α -tokoferol, eritrosin dan reagen Folin-Ciocalteu diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany). Bahan kimia seperti natrium nitrit, natrium hidroksida, vanilin, asam klorida, natrium karbonat, aluminium klorida diperoleh dari Laboratorium Kimia dan Biokimia FTP UGM, Alat-alat yang digunakan terdiri atas timbangan analit (Sartorius), rotary evaporator (RVOG-ML, IKA WERKE), vortex (Vortex Mixer, VM-300), kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm) dengan 4 buah lampu fluoresen 15 wat (Sylvania), kolom kromatografi diameter 2 cm dan panjang 50 cm, pengukur intensitas cahaya (Extect, Cole-Palmer Instrument, Co.), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601) dan spektrofotometer IR (Shimadzu FTIR 8201 PC).

Ekstraksi Buah Andaliman

Ekstrak buah andaliman dibuat dengan mengikuti prosedur yang diungkapkan oleh Suryanto dkk. (2005a). Sebanyak 100 g serbuk buah andaliman dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer yang berkapasitas 1000 mL, kemudian ditambahkan pelarut heksana sebanyak 500 mL. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam sehingga diperoleh ekstrak heksana (EH). Dengan cara yang sama, pelarut aseton mengekstraksi residunya sehingga diperoleh ekstrak sekuensial heksana-aseton (ESHA). Terakhir dengan menggunakan pelarut etanol dan diperoleh ekstrak sekuensial heksana-aseton-etanol (ESHAE). Rendemen tertinggi diperoleh EH sebesar 7,81% diikuti EHSAE (6,70%) dan ESHA (3,17%).

Fraksinasi Ekstrak Andaliman

Ekstrak etanol andaliman (ESHAE) yang dilakukan oleh Edi Suryanto (2005a) selanjutnya dipisahkan dengan teknik kromatografi kolom. Fasa diam digunakan silika gel G-60 dan fasa gerak digunakan pelarut etil asetat, etil asetat-metanol (3:1, v/v), etil asetat-metanol (1:1, v/v), etil asetat-metanol (1:3, v/v) dan metanol. Sebelum diisikan dimasukkan dalam kolom, maka silika gel diaktifkan terlebih dahulu dengan dipanaskan pada suhu 180 °C selama 2 jam. Setiap 5 mL fraksi-fraksi yang didapat pada pemisahan ditampung dalam tabung kolektor fraksi dan setiap sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada λ 280 nm. Fraksi yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C sebelum dilakukan analisis kandungan total fenolik, flavonoid tanin terkondensasi dan aktivitas penstabil oksigen singlet.

Penentuan Total Fenolik

Total fenol dalam fraksi-fraksi ditentukan dengan metode Huang dan Yen (2002). Sampel ekstrak dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL ditambah 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (50%) dan kemudian divortex selama 3 menit. Setelah interval waktu 3 menit, ditambah 1 mL larutan Na_2CO_3 2%.

Selanjutnya campuran disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit untuk menghindari reaksi yang dipicu oleh cahaya. Absorbansi ekstrak dibaca dengan spektrofotometer pada λ 750 nm. Hasil pembacaan absorbansi dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat dalam mg/kg ekstrak. Kurva standar disiapkan dengan cara yang sama menggunakan asam galat.

Penentuan Total Flavonoid

Untuk penentuan total flavonoid digunakan metode Zhishen dkk. (1999). Satu mililiter ekstrak ditambah 5,7 mL akuades, 0,3 mL NaNO₂ dan 3 mL aluminium klorida 10%, divortek dan didiamkan selama 5 menit. Setelah 5 menit, 2 mL larutan sampel ditambah 2 mL NaOH 1 M, kemudian divortek dan ditera pada λ 510 nm. Total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen mg kuersetin/kg ekstrak. Kurva standar disiapkan dengan cara yang sama menggunakan kuersetin.

Penentuan Tanin Terkondensasi

Tanin terkondensasi sampel ditentukan mengikuti metode Julkunen-Tiitto (1985). Sebanyak 0,1 mL larutan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang dibungkus aluminium foil, lalu ditambah 3 mL larutan vanilin dalam metanol 4% dan divortek. Segera sesudah ditambahkan 1,5 mL HCl pekat divortek lagi. Absorbansinya dibaca pada λ 500 nm setelah sampel diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Hasilnya diplotkan terhadap kurva standar katekin yang dipersiapkan dengan cara yang sama. Kandungan tanin terkondensasi dinyatakan sebagai mg/kg katekin.

Penentuan Aktivitas Penstabil Oksigen Singlet (¹O₂)

Penentuan kemampuan penstabilan oksigen singlet fraksi I-V menggunakan metode Lee dkk. (1997) yang dimodifikasi. Pengaruh masing-masing fraksi terhadap oksidasi oksigen singlet diuji dalam asam linoleat 1% (b/v) yang mengandung 100 bpj eritrosin dalam metanol sebagai sensitiser. Efek fraksi I-V terhadap fotooksidasi asam linoleat menggunakan konsentrasi 200 bpj. Sampel diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam botol gelas yang berukuran 30 mL yang dilengkapi penutup karet dan dibungkus aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak kayu (70 cm x 50 cm x 60 cm) dengan intensitas cahaya 4.000 lux. Angka peroksida (AP) diukur setelah 5 jam dengan metoda AOCS (1990). Persen penghambatan oksigen singlet dihitung menggunakan rumus: (AP sampel-AP kontrol/ AP kontrol) x 100%

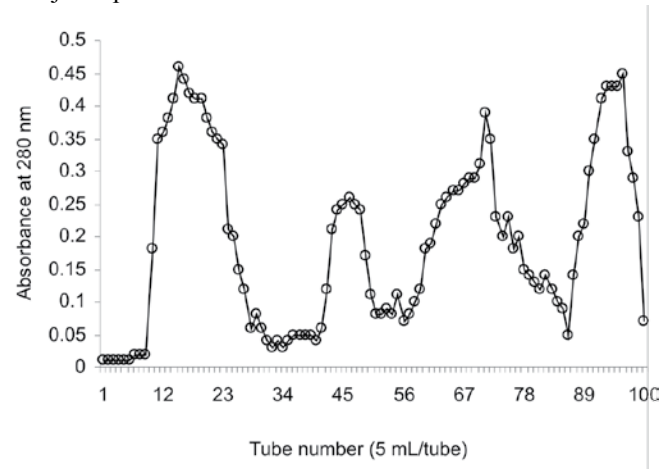
Analisis Statistik

Semua percobaan dilakukan dua kali ulangan dan analisisnya 3 ulangan. Sampel data yang diperoleh secara statistik menggunakan software SPSS versi 10.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi Ekstrak Andaliman dengan Kromatografi Kolom

Fraksi-fraksi yang diperoleh dalam 100 tabung reaksi dan setiap tabung reaksi dan masing-masing berisi 5 mL sampel. Setiap sampel dalam tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 280 nm dan hasilnya disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Profil fraksi ekstrak andaliman pada λ 280 nm

Sampel dari nomor fraksi yang termasuk satu puncak pada Gambar 1 digabung menjadi satu kelompok fraksi dan pelarutnya diuapkan dengan vakum evaporator pada 40 °C. Sampel dengan nomor fraksi 1-9, 10-39, 40-55, 56-85 dan 86-100 berturut-turut disebut fraksi I, II, III, IV dan V dan kelima fraksi selanjutnya ditimbang (Tabel 1).

Tabel 1. Berat masing-masing fraksi ekstrak andaliman hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom

Fraksi	Kelompok fraksi	Warna	Berat (g)
1 - 9	I	Kuning muda	0,06
10 - 39	II	Kuning coklat	0,64
40 - 55	III	Kuning muda	0,18
56 - 85	IV	Coklat tua	0,04
86 - 100	V	Coklat	0,46

*) Rata-rata dari 2 ulangan percobaan

Dari 2 g sampel ekstrak (ESHAE) diperoleh berat total lima fraksi sebesar 1,38 g, berarti ada 0,62 g residu sampel yang tertahan dalam kolom silika gel. Hal ini dikarenakan komponen yang tertinggal diperkirakan bersifat polar yang sangat kuat ditahan oleh silika gel (polar).

Total Fenol, Flavonoid dan Tanin Terkondensasi Fraksi

Total fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi dari 5 fraksi ekstrak andaliman disajikan pada Tabel 2. Dari lima

fraksi yang diuji, semuanya memiliki fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi yang berbeda nyata ($p \leq 0.05$). Hasil ini mengindikasikan bahwa fraksi I-V kaya fitokimia fenolik, flavonoid dan tanin.

Tabel 2. Total fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi dari 5 fraksi*

Fraksi	Total fenolik (mg asam galat/kg ekstrak)	Total flavonoid (mg kuersetin/kg ekstrak)	Total tannin terkondensasi (mg katekin/kg ekstrak)
I	3,80 ± 0,04 ^{a**}	0,79 ± 0,02 ^a	5,94 ± 0,02 ^a
II	99,46 ± 0,08 ^b	16,63 ± 0,01 ^b	136,76 ± 0,47 ^b
III	55,98 ± 0,03 ^c	9,43 ± 0,07 ^c	77,29 ± 0,21 ^c
IV	84,24 ± 0,01 ^d	14,11 ± 0,28 ^d	115,95 ± 0,14 ^d
V	97,28 ± 0,04 ^e	16,27 ± 0,01 ^e	135,79 ± 0,28 ^e

* Data dinyatakan dalam rata-rata ± SD dari 2 ulangan percobaan dan 3 ulangan analisa. Data dengan *superscript* huruf yang sama dalam satu kolom berarti tidak berbeda nyata ($p \leq 0.05$)

** Huruf dibelakang angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p \leq 0.05$)

Penentuan total fenolik dimaksudkan untuk mengetahui potensi antioksidan dalam fraksi. Total fenolik dalam masing-masing fraksi ditentukan dengan standar asam galat (mg/kg), berdasarkan kemampuan senyawa fenolik dalam fraksi-fraksi bereaksi dengan asam fosfomolibdat–fosfotungstat dalam reagen Folin–Ciocalteu (kuning) dan mengalami perubahan warna menjadi warna biru. Total fenolik fraksi I, II, III, IV dan V berturut-turut 3,80 ± 0,04; 99,46 ± 0,08; 55,98 ± 0,03; 84,24 ± 0,01 dan 97,28 ± 0,04 mg asam galat/kg ekstrak. Fraksi II diindikasikan mempunyai total fenolik paling tinggi (99,46 mg asam galat/kg ekstrak) dibandingkan dengan V, IV, III dan I. Total fenolik dalam fraksi II sangat besar diduga karena senyawa fenolik dalam fraksi II bersifat semi polar. Tinggi rendahnya total fenolik dalam fraksi II tersebut berhubungan langsung dengan aktivitas antifotooksidatif dari fraksi. Kemampuan antifotooksidatif dari fraksi-fraksi disebabkan oleh senyawa-senyawa kimia yang dapat berperan sebagai penstabil oksigen singlet.

Tabel 1 menunjukkan bahwa fraksi II dan V mempunyai total flavonoid tertinggi yaitu 16,63 ± 0,01 dan 16,27 ± 0,01 mg kuersetin/kg ekstrak diikuti oleh fraksi IV, III dan I berturut-turut 14,11 ± 0,28; 9,43 ± 0,07 dan 0,79 ± 0,02 mg kuersetin/kg ekstrak. Hasil ini mengindikasikan bahwa terdapat hubungan yang erat antara flavonoid dengan fenolik dari lima jenis fraksi yang berhasil dipisahkan dari ekstrak etanol andaliman. Hal ini kemungkinan disebabkan senyawa flavonoid bersifat polar dan semi polar sehingga campuran pelarut etil asetat-metanol atau metanol yang terdapat pada fraksi II dan V lebih besar. Menurut Larson (1988), komponen fenolik seperti flavonoid

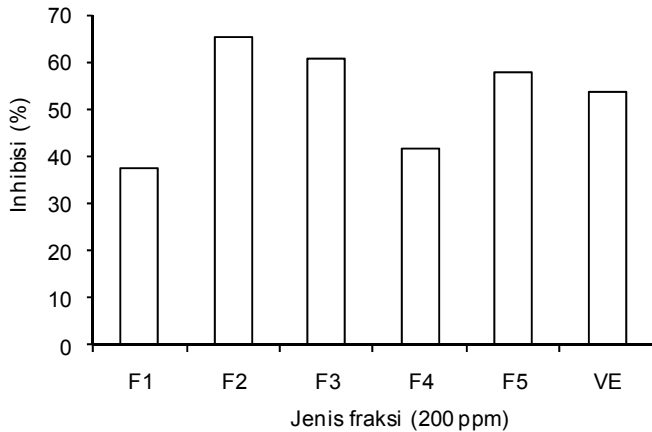
yang dikenal sebagai antioksidan primer dari tanaman bersifat polar dan semi polar. Berdasarkan beberapa hasil penelitian (Tian dan White, 1994; Su dkk, 2000; Sakakibara dkk., 2003; Zhao dkk., 2006) disebutkan bahwa pelarut polar dan semi polar seperti metanol, etanol dan aseton merupakan pelarut yang sangat luas digunakan dan efektif untuk ekstraksi antioksidan dari bahan alam.

Total tanin terkondensasi tertinggi ditemukan pada fraksi II (136,76 ± 0,47 mg katekin/kg ekstrak) dan diikuti V, IV, III dan I, yang besarnya berturut-turut; 135,79 ± 0,28; 115,95 ± 0,14; 77,29 ± 0,21 dan 5,94 ± 0,02 mg katekin/kg ekstrak. Fraksi II memiliki tanin terkondensasi paling tinggi daripada fraksi V, IV, III dan I. Hal ini disebabkan fraksi II lebih besar daripada fraksi lainnya adalah bahwa tannin yang terdapat pada ekstrak etanol andaliman relatif lebih besar berat molekulnya daripada fraksi-fraksi lainnya. Menurut Alasalvar dkk. (2006), tanin yang memiliki berat molekul yang relatif besar lebih baik diekstraksi dengan pelarut semi polar seperti aseton daripada pelarut etanol atau metanol. Walaupun fraksi V juga terfraksinasi terbesar kedua tannin terkondensasi, data ini membuktikan bahwa fraksi ini lebih mudah terekstraksi komponen fenoliknya dengan pelarut metanol terutama kelompok flavonol dan tanin berat molekul kecil dan sedang (Shahidi dan Nacz, 1995). Tanin merupakan bagian yang bertanggung jawab untuk rasa sepat dan berwarna coklat serta secara alamiah larut dalam air terjadi kompleks polifenol yang hadir pada banyak tanaman termasuk biji dan kulit (Shahidi dan Nacz, 1995; Chung dkk., 1998). Aspek kesehatan tannin telah dibahas oleh beberapa peneliti seperti Chung dkk., 1998. Penelitian lain yang telah dilaporkan adalah bahwa tanin memiliki potensi 15-30 kali lebih efektif dalam penangkap radikal peroksil daripada senyawa fenolik sederhana dan trolox (Hagerman dkk., 1998). Oleh karena itu, tanin bisa dipertimbangkan sebagai antioksidan biologis penting dan berpotensi.

Aktivitas Penstabilan Oksigen Singlet Fraksi I-V

Gambar 2 menunjukkan pengaruh penstabilan oksigen singlet dari kelima fraksi yang dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom. Pengaruh penstabil oksigen singlet untuk kelima fraksi ditentukan berdasarkan perubahan angka peroksida asam linoleat dan 100 ppm eritrosin sebagai sensitiser. Selanjutnya perubahan angka peroksida dari kelima fraksi terhadap fotooksidasi asam linoleat yang disinari cahaya fluoresen dinyatakan dalam persentase penghambatan. Fraksi I, II, III, IV dan V menghasilkan persentase penghambatan berturut-turut adalah 37,42; 65,42; 60,37; 41,61 dan 57,74%.

Fraksi II menunjukkan persentase penghambatan oksigen singlet paling tinggi dari pada fraksi III, V, IV dan II selama 5 jam fotooksidasi asam linoleat ($p < 0,05$). Gambar



Gambar 2. Efek penghambatan fraksi terhadap fotooksidasi asam linoleat yang disensitasi oleh eritrosin yang disinari cahaya fluoresen a(4000 lux) selama 5 jam. VE: vitamin E (α -tokoferol)

2 menunjukkan bahwa fraksi III yang memiliki total fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi yang lebih rendah daripada fraksi V dan IV ternyata memiliki persentase penghambatan oksigen singlet paling tinggi. Hal ini mungkin disebabkan oleh senyawa non fenolik seperti karotenoid, retinil palmitat, askorbil palmitat dan α -tokoferol asetat dalam fraksi III yang mampu bersinergi dengan senyawa fenolik sebagai penstabil oksigen singlet daripada fraksi V dan IV.

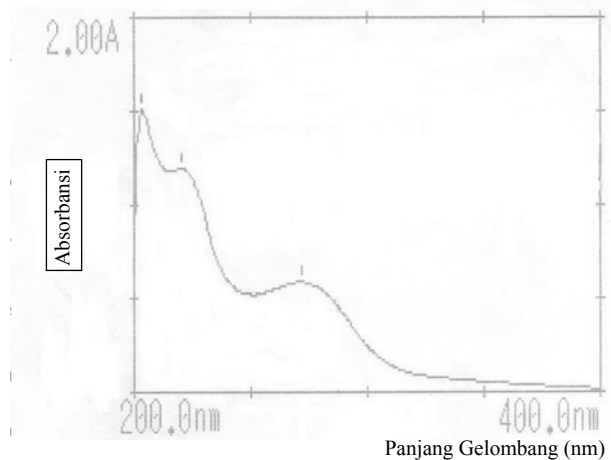
Senyawa retinil palmitat mempunyai kemampuan penstabil oksigen singlet dalam susu skim dengan keberadaan riboflavin sebagai sensitiser, sedangkan askorbil palmitat dilaporkan efektif sebagai penstabil oksigen singlet dalam asam linoleat dan minyak kedele dengan sensitiser klorofil dan metilen biru. (Lee dkk., 1997; Jung dkk., 1998; Chacon dkk., 2000; Min dan Boff, 2002).

Efek penstabil oksigen singlet fraksi I, II, III, IV dan V menunjukkan perbedaan secara nyata dengan α -tokoferol ($p \leq 0,05$). Vitamin E atau α -tokoferol merupakan antioksidan alami yang banyak digunakan sebagai penghambat oksidasi lipida dalam bahan pangan. Disamping itu, α -tokoferol telah dilaporkan sebagai penstabil (*quencher*) oksigen singlet dalam minyak kedele (Jung dkk., 1991). Dalam penelitian ini, antioksidan sintesis seperti *Butylated Hidroxytoluena* (BHT) dan *Butylated Hidroxyanisole* (BHA) tidak digunakan sebagai kontrol positif, karena kedua antioksidan ini tidak memiliki sifat-sifat antioksidatif dalam fotooksidasi asam lemak tak jenuh (Carlsson dkk., 1976; Jung dkk., 1999; Chacon dkk., 2000).

Identifikasi Fraksi Aktif

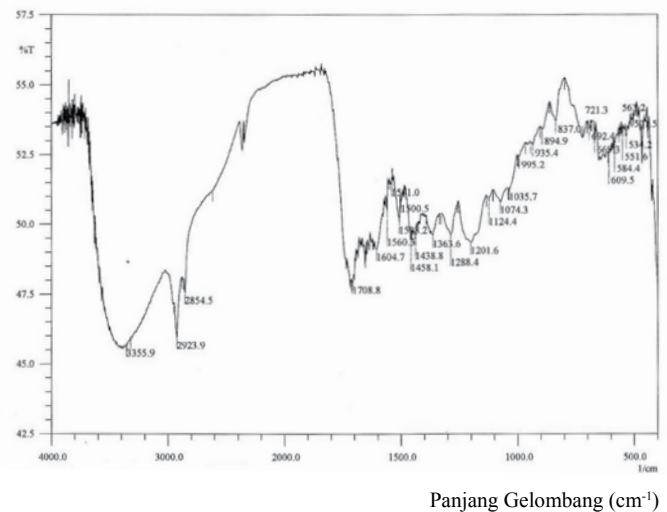
Fraksi II selanjutnya diidentifikasi dengan spektrofotometer ultraviolet (UV) dan infra merah (IR). Data spektrum UV fraksi II mengindikasikan suatu absorpsi maksimum pada 204, 221 dan 272 nm (Gambar 3). Puncak maksimum fraksi II

pada 204 nm bisa disebabkan kehadiran cincin aromatik dalam fraksi. Absorpsi maksimum pada 272 nm fraksi II mungkin disebabkan kehadiran sejumlah kecil fenolik atau flavonoid dalam fraksi. Mabry dkk. (1970) telah melaporkan bahwa flavone dan flavonol berturut-turut menunjukkan dua puncak yaitu 240 dan 400 nm, satu puncak pada rentangan 240-280 nm dan yang lain pada rentangan 300-380 nm. Oleh karena itu, fraksi II yang mempunyai aktivitas penstabil oksigen singlet mungkin mengandung beberapa jenis komponen yang memiliki gugus fenolik alami.



Gambar 3. Spektra ultra violet (UV) dari fraksi aktif II dalam metanol

Hasil spektra infra merah (IR) fraksi II dapat dilihat pada Gambar 5. Dari pemeriksaan spektra dengan spektrometer IR pada fraksi aktif tersebut menunjukkan adanya pita lebar dan kuat pada 3356 cm^{-1} adalah petunjuk untuk gugus OH diikuti pita-pita kuat pada 2924 cm^{-1} dan 2855 cm^{-1} menunjukkan adanya metin (-CH-), gugus metilen (-CH₂-) dan metil (CH₃) diperkuat adanya pita pada 1380 cm^{-1} .



Gambar 4. Spektra infra merah (IR) dari fraksi aktif II

Serapan pada 1708 cm^{-1} sangat kuat dan tajam menunjukkan kehadiran gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$). Pita serapan berturut-turut pada 1607 cm^{-1} dan 1458 cm^{-1} menandakan hadirnya cincin aromatik ($-\text{C}-\text{C}-$) (Silverstein dkk., 1991) dan diikuti pita disekitar 1300-1100 cm^{-1} yang menunjukkan gugus C-O dari eter, dimana pita pada frekuensi ini merupakan karakteristik untuk aril eter. Berdasarkan analisis terhadap spektra IR, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi II mempunyai gugus hidroksi (OH), karbonil ($\text{C}=\text{O}$), aromatik ($\text{C}=\text{C}$), eter (R-O-R), metin ($-\text{CH}-$) metilen ($-\text{CH}_2-$) dan metil (CH_3).

KESIMPULAN

Lima fraksi memiliki fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi. Namun fraksi II memiliki fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi lebih besar daripada fraksi V, IV, III dan I. Fraksi II yang dipisahkan dari ekstrak etanol andaliman menunjukkan efek penstabil oksigen singlet pada fotooksidasi asam linoleat dengan sensitiser eritrosin. Fraksi II yang identifikasi dengan spektrofotometer UV pada λ 204 and 272 nm memiliki cincin aromatik dan gugus fenolik, sedangkan dengan spektrofotometer infra merah menunjukkan bahwa fraksi II mempunyai gugus hidroksi (OH), karbonil ($\text{C}=\text{O}$), aromatik ($\text{C}=\text{C}$), eter (R-O-R), metin ($-\text{CH}-$) metilen ($-\text{CH}_2-$) dan metil (CH_3). Fraksi yang paling aktif dalam ekstrak andaliman adalah fraksi II.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbor, G.A., Oben, J.E., Ngogang, J.Y., Xinxing, C. dan Vinson, J.A. (2005). Antioxidant capacity of some herbs/spices from cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 6819-6824.
- Alasalvar, C., Karamac, M., Amarowick, R. dan Shahidi, F. (2006). Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*corylus avellana* l.) and hazelnut green leafy cover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 4826-4832.
- AOCS (1990). *Official and Tentative Methods*. American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois.
- Calrsson, D.J., Suprunchuk, T. dan Siles, D.M. (1976). Photooxidation of unsaturated oils: effect of singlet oxygen quenchers. *Journal of American Oil Chemical Society* **53**: 656-660.
- Chacon, J.N., Gaggini, P., Sinclair, R.S. dan Smith, F.J. (2000). Photo- and thermal-oxidation studies on methyl and phenyl linoleat: anti-oxidant behaviour and rates of reaction. *Chemistry and Physics of Lipids* **62**: 165-176.
- Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkinsand, J.M. dan Lundberg, W.O. (1956). The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technology* **10**: 209-211.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.-I.Y., Huang, Y-W.Y. dan Lin, Y.Y. (1998). Tannins and human health: A review. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* **38**: 421-464.
- Choe, E., Huang, R. dan Min, D.B. (2005). Chemical reaction and stability of riboflavin in foods. *Journal of Food Science* **70**: 28-36.
- Davis, K.J. dan Goldberg, A.I. (1987). Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded to extracts of red blood cells. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 8227-8234.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. dan Blomhoff, R. (2003). Several culiner and medicinal herbs are important source of dietary antioxidant. *Journal of Nutrition* **133**: 1286-1290.
- Foote, C.S., Chang, Y.C. dan Denny, R.W. (1970). Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of American Oil Chemical Society* **92**: 5216-5218.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M, Alexander Jones, G., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W. dan Riechel, T.L. (1998). High molecular wight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1887-1892.
- Halliwel, B. dan Gutteridge, J.M.C. (2001). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London.
- Hung, C.Y. dan Yen, G.C. (2002). Antioxidant of phenolic compounds isolated from mesona procumbens hemsil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2993-2997.
- Jayaprakasha, G.K., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M. dan Rao, L.J. (2006). Phenolic constituents in the fruits of cinnamomum zeylanicum and theirs antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 1672-1679.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**: 213-217.
- Jung, M.Y., Kim, S.K. dan Kim, S.Y. (1995). Riboflavin sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics of amino acid effects. *Food Chemistry* **53**: 397-403.

- Jung, M.L., Lee, K.H. dan Kim, S.Y. (1998). Retinyl palmitate isomers in skim milk during light storage as affected by ascorbic acid. *Journal of Food Science* **63**: 597-600.
- Juntachote, J. dan Berghofer, E. (2005). Antioxidant properties and stability of ethanol extracts of holy basil and galangal. *Food Chemistry* **92**: 193-202.
- King, J.M. dan Min, D.B. (2002). Riboflavin-photosensitized singlet oxygen oxidation product of vitamin D₂. *Journal of American Oil Chemical Society* **79**: 983-987.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**: 969-977.
- Lee, K.H., Jung, M.Y. dan Kim, S.Y. (1997). Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. *Journal of American Oil Chemical Society* **74**: 1053-1057.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. dan Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoid*. Springer-Verlag, New York.
- Martinez-Tome, M., Jimenez, A.M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R. dan Murcia, M.A. (2001). Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection* **64**: 1412-1419.
- Min, D.B. dan Boff, J.M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Food Science and Food Safety* **1**: 58-72.
- Perry, L.M. (1978). *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*. The MIT Press, London.
- Shahidi, F. dan Naczk, M. (1995). *Food Phenolics*. Technomicpub.Co. Inc. Lancaster-Basel.
- Shahidi, F. (1997). *Natural Antioksidants*. Department of Biochemistry Memorial University of Newfoundland St. Jhon's, Newfoundland. AOCS Press. Canada.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. dan Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7749-7759.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. dan Morrill, T.C. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Suryanto, E., Raharjo, S., Sastrohamidjojo, H. dan Tranggono (2004). Singlet oxygen quenching effect of andaliman extracts in light-induced lipid oxidation. *Indonesian Food and Nutrition Progress* **2**: 48-55.
- Suryanto, E., Raharjo, S., Sastrohamidjojo, H. dan Tranggono (2005^a). Efek Antifotooksidatif ekstrak andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) terhadap asam linoleat. *Agritech* **4**: 173-179.
- Suryanto, E., Raharjo, S., Sastrohamidjojo, H. dan Tranggono (2005^b). Aktivitas antioksidan dan stabilitas ekstrak andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) terhadap panas, cahaya fluoresen dan ultraviolet. *Agritech* **4**: 63-69.
- Williams, D.H. dan Fleming, I. (1989). *Spectroscopy Methods in Organic Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, London.
- Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming. 1999. The determination of Flavonoid Contents in Mulberry and their Scavenging Effects on Superoxide Radikal. *Food Chemistry*. **64**: 555-559.