

## AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SUJI (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown)

[Antioxidant Activity of Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) Leaf Extract]

Endang Prangdimurti, Deddy Muchtadi, Made Astawan dan Fransiska R. Zakaria

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan FATETA IPB

Diterima 20 September 2006 / Disetujui 10 Oktober 2006

### ABSTRACT

Numerous studies showed that chlorophyll and its derivatives had antioxidant activity. This research was conducted to obtain the chlorophyll-rich suji leaf liquid extract (SLE) and then to investigate the oral administration this extract on the antioxidant status by means of animal study. The use of Tween 80 0.75% in sodium citrate 12 mM solution as an extraction solution combined with 30 minutes incubation time at 70-75°C increased significantly the total chlorophylls content, the water-soluble chlorophylls content and the antioxidant activity of the yielded extract, compared to the suji leaf water-only extract. Two-months oral administration of SLE to male Sprague Dawley rats showed that the liver malondialdehyde (MDA) level significantly decreased, and the liver catalase and superoxide dismutase antioxidant enzyme activities significantly increased compared to the control group. This study suggested that the chlorophyll content in SLE might increase the antioxidant status of animal tested.

**Key words :** suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown), chlorophyll, antioxidant

### PENDAHULUAN

Peningkatan konsumsi fitokimia yang memiliki aktivitas antioksidan dapat menekan timbulnya penyakit-penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, kanker, dan diabetes mellitus. Berbeda dengan senyawa fitokimia lain, seperti komponen fenolik, klorofil terdapat dalam jumlah banyak dalam tanaman yaitu rata-rata 1% berat kering, sehingga sangat berpotensi dikembangkan sebagai suplemen pangan atau pangan fungsional. Klorofil alami (seperti klorofil-a dan klorofil-b) bersifat lipofilik karena keberadaan gugus fitolnya ( $C_{20}H_{39}OH$ ). Hidrolisis terhadap gugus tersebut akan mengubah klorofil menjadi turunannya yang larut air, seperti klorofilid dan klorofilin. Klorofil dan beberapa turunannya menunjukkan kemampuan antioksidatif secara *in vitro* dan *ex vivo*. Endo et al., (1985) menyebutkan bahwa jika klorofil dioksidasi dalam sistem metil linoleat akan dihasilkan radikal  $\pi$ -kation dari klorofil yang dapat membentuk kompleks dengan radikal peroksi, kemudian dihasilkan produk yang stabil. Klorofilin memiliki kemampuan sebagai *radical scavenger* terhadap  $^*OH$ ,  $ROO^*$ ,  $^1O_2$  dan  $H_2O_2$  dengan konstanta masing-masing sebesar  $6.1 \pm 0.4 \times 10^9$ ,  $5.0 \pm 1.3 \times 10^7$ ,  $1.3 \times 10^8$ ,  $2.7 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$  (Kumar et al., 2001; Kamat et al., 2000).

Sebelum adanya laporan Egner et al., (2000), klorofil dianggap tidak diserap oleh tubuh. Mereka adalah yang pertama kali menemukan adanya turunan klorofil dalam serum manusia yang berwarna hijau setelah pemberian klorofilin dengan dosis 3x100 mg/hari selama

4 bulan. Pengujian secara *in vitro* menggunakan sel Caco-2 (*human intestinal cell line*), menunjukkan bahwa penyerapan klorofil yang lipofil sebesar 5-10% (Ferruzzi et al., 2001), sedangkan klorofilin sebesar 45-60% (Ferruzzi et al., 2002a). Klorofilid maupun klorofilin memiliki aktivitas menangkap radikal bebas yang lebih tinggi dibandingkan klorofil yang masih mengandung gugus fitol (Ferruzzi et al., 2002b). Oleh karena itu upaya menghidrolisis gugus fitol klorofil agar diperoleh klorofil yang larut air diduga dapat meningkatkan manfaat klorofil bagi kesehatan tubuh. Hidrolisis dapat dilakukan menggunakan asam, alkali atau enzim klorofilase.

Saat ini semakin banyak beredar produk impor suplemen pangan kaya klorofil, padahal dilihat dari segi geografis Indonesia memiliki potensi sumber klorofil yang besar. Salah satunya adalah daun suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) yang sejak dahulu digunakan sebagai sumber pewarna hijau alami untuk pangan. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian untuk meningkatkan manfaat daun suji, khususnya dalam meningkatkan status antioksidatif tubuh.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan ekstrak cair daun suji kaya klorofil dan menguji aktivitas antioksidannya secara *in vivo*.

### METODOLOGI

#### Bahan

Daun suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) yang digunakan berasal dari satu lokal di daerah

perumahan dosen IPB Darmaga Bogor. Daun yang digunakan adalah daun tua, yaitu 7-10 helai di bawah pucuk daun. Untuk pembuatan ekstrak digunakan Tween 80 (Sigma Co.), trinitrium sitrat dihidrat, NaHCO<sub>3</sub>. Sebagai pembanding ekstrak daun suji digunakan klorofilin (*Sodium Copper Chlorophyllin/SCC*, Sigma Co.). Untuk studi *in vivo*, digunakan tikus jenis *Sprague Dawley* jantan umur 2 bulan dari Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) Jakarta. Untuk simulasi pencernaan *in vitro* digunakan pepsin (P-7000), pankreatin (P-1750) dan ekstrak bile (B-8631) dari Sigma Co., lipase (NOVO), dan kantung dialisis 6000-8000 MWCO (Spectrapor). Untuk analisis digunakan antara lain *1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl* (DPPH), xantin oksidase (*Grade IV*, dari susu sapi), xantin, *nitroblue tetrazolium* (NBT), *phosphat buffer saline* (PBS), tetraetoksipropana (TEP), asam tiobarbiturat (TBA), asam trikloroasetat (TCA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aseton, petroleum eter.

## Metode penelitian

### Penentuan prosedur ekstraksi daun suji

Penentuan prosedur ekstraksi daun suji yang digunakan difokuskan pada jenis larutan pengeksrak yang digunakan dan lama inkubasi yang diterapkan untuk menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan dan kadar klorofil yang terbaik. Ada 6 jenis larutan pengeksrak yang digunakan yaitu NaHCO<sub>3</sub> 0.5%, Na-sitrat 12 mM dan akuades, masing-masing dengan maupun tanpa penambahan Tween 80 1% (b/v). Pembuatan ekstrak daun suji mengikuti prosedur umum berikut ini. Daun suji yang telah dicuci dan dipotong-potong, dihancurkan dengan larutan pengeksrak (1:10, b/v). Setelah diinkubasi pada 70-75°C selama 60 menit, dilakukan penyaringan dengan kain batis 2 lapis dan disentrifugasi 600xg selama 10 menit untuk membuang padatan. Supernatan (ekstrak) yang diperoleh kemudian diblansir dalam air mendidih selama 1 menit. Untuk meminimalkan kerusakan klorofil, ekstraksi dilakukan dalam cahaya redup.

Tahap selanjutnya adalah penentuan konsentrasi Tween 80 yang ditambahkan ke dalam larutan pengeksrak terpilih (0.25, 0.5, 0.75, dan 1.0%; b/v) serta proses inkubasi yang diberikan (tanpa diinkubasi, diinkubasi selama 0, 30, dan 60 menit pada 70-75°C). Inkubasi 0 menit adalah saat pertama kali ekstrak mencapai suhu 70°C. Inkubasi ditujukan untuk memberi kesempatan klorofilase suji bekerja.

### Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak

Analisis dilakukan berdasarkan metode Kubo et al., (2002) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 1 ml buffer asetat 100 mM (pH 5.5), 1.87 ml metanol, dan 0.1 ml DPPH 3 mM dalam metanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Larutan DPPH dibuat segar setiap akan digunakan. Selanjutnya, sebanyak 0.03 ml larutan sampel ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan diinkubasi 25°C selama 20 menit. Absorbansi yang

dihasilkan dibaca pada 517 nm. Sebagai larutan blanko, digunakan 0.03 ml akuades sebagai pengganti larutan sampel. Semakin banyak radikal DPPH yang dinetralisir ditunjukkan oleh semakin pudarnya warna campuran reaksi atau semakin besarnya selisih absorbansi terhadap larutan blanko. Aktivitas antioksidan (%) = (1-Absorbansi sampel/Absorbansi blanko) x 100%.

### Analisis kadar klorofil ekstrak

Pengukuran kadar total klorofil dan klorofil larut air dalam ekstrak dilakukan dengan mengikuti prinsip Gross (1991). Sejumlah ekstrak (1,5 ml) dicampur dengan 8,5 ml aseton 99.5%, kemudian dibiarkan selama 1 malam dalam refrigerator. Selanjutnya campuran disentrifus 600xg selama 10 menit. Untuk menganalisis kadar total klorofil, supernatan yang diperoleh diukur absorbansinya pada 645 dan 663 nm atau pada 652 nm. Untuk mengukur kadar klorofil larut air, sebagian supernatan (3 ml) dicampur dengan 6 ml petroleum eter dan 0.2 ml air deionisasi, kemudian divorteks dan disentrifus. Klorofil larut air atau yang bersifat hidrofilik akan berada pada lapisan aseton (bawah), untuk selanjutnya diukur absorbansinya. Perhitungan kadar klorofil dilakukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Kadar klorofil (mg/L)} = 20.2 A_{645.0 \text{ nm}} + 8.02 A_{663.0 \text{ nm}},$$

atau

$$\text{Kadar klorofil (mg/L)} = \frac{1000 A_{652 \text{ nm}}}{34.5}$$

### Estimasi tingkat penyerapan klorofil menggunakan sistem pencernaan *in vitro*

Larutan yang diujikan yaitu ekstrak daun suji terpilih dan larutan klorofilin (SCC) sebagai pembanding. Sebelum pengujian dilakukan penyetaraan kadar klorofil larutan uji.

Sistem pencernaan *in vitro* mengadopsi prosedur Ferruzzi et al., (2001). Fase lambung (*gastric*) dilakukan dengan menginkubasi larutan uji dengan pepsin (1.6 mg/ml) selama 1 jam dalam penangas air bergoyang 37°C. Larutan uji sebelumnya telah diatur menjadi pH 2 menggunakan HCl 4 N. Selanjutnya, ke dalam larutan uji dimasukkan kantung dialisis berisi NaHCO<sub>3</sub> 0,5M. Setelah tercapai pH 7, inkubasi fase usus halus dimulai dengan menambahkan campuran pankreatin (0.2 mg/ml), ekstrak empedu (1.25 mg/ml) dan lipase (0.1 mg/ml). Setelah 2 jam inkubasi, kantung dialisis diangkat dan dibilas, kemudian isi kantung (dialisat) diukur volumenya. Pengukuran kadar klorofil terlarut dilakukan pada fraksi awal, fraksi lambung (*gastric*), fraksi digesta (luar kantung) dan fraksi dialisat (isi kantung). Tingkat penyerapan klorofil (%) diestimasi dari kadar klorofil fraksi dialisat per-kadar klorofil fraksi awal, lalu dikalikan 100. Data ini selanjutnya digunakan dalam perhitungan dosis pengujian secara *in vivo*.

### Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan tikus percobaan

Tikus yang digunakan terlebih dahulu diadaptasikan selama 1 minggu. Setelah itu, tikus (berat rata-rata 220 g) dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok yang diberi: (1) ekstrak daun suji, (2) larutan klorofilin, dan (3) akuades (sebagai kontrol). Dosis per-hari yang diberikan setara dengan 20 mg klorofil/kg BB untuk kelompok suji, dan 6.6 mg SCC/kg BB untuk kelompok SCC. Ransum yang diberikan adalah ransum basal dengan sumber protein kasein 10% mengikuti AOAC (1984) diberikan *ad libitum*. Setelah 2 bulan masa perlakuan, tikus masing-masing kelompok (N=7) dietanasi untuk dianalisis kadar MDA (malondialdehida) hati, aktivitas katalase hati, dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) hati.

#### Preparasi sampel hati

Preparasi sampel dari organ hati dilakukan mengikuti metode Singh *et al.*, (2002). Sebanyak 1.25 g hati dicacah dalam kondisi dingin dalam 5 ml larutan PBS (*phosphat buffer saline*) yang mengandung 11,5 g/L KCl. Homogenat yang dihasilkan kemudian disentrifus 1074xg hingga diperoleh supernatan jernih. Supernatan selanjutnya digunakan untuk pengukuran kadar MDA, aktivitas SOD dan katalase.

#### Pengukuran kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan mengikuti prosedur Singh *et al.* (2002). Sebanyak 0.5 ml supernatan hati ditambah 2.0 ml HCl dingin (0.25 N) yang mengandung 15% TCA, 0.38% TBA dan 0.5% BHT. Campuran dipanaskan 80°C selama 1 jam. Setelah dingin, campuran disentrifus 822xg selama 10 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 532 nm. Sebagai larutan standar digunakan TEP.

#### Pengukuran aktivitas SOD

Pengukuran dilakukan dengan mengikuti prosedur Kubo *et al.* (2002) dan Wijeratne *et al.* (2005) dengan sedikit modifikasi. Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas menangkap radikal anion superoksida. Anion superoksida dihasilkan secara enzimatis oleh sistem xantin-xantin oksidase. Sebanyak 0.06 ml supernatan hati direaksikan dengan campuran yang terdiri dari 2.70 ml bufer Natrium-karbonat yang

mengandung 0.1 mM EDTA (pH 10), 0.06 ml xantin 10 mM, 0.03 ml *bovine serum albumin* (BSA) 0.5%, 0.03 ml NBT 2.5 mM. Selanjutnya dilakukan penambahan xantin oksidase (0.04 units). Absorbansi yang dihasilkan setelah 30 menit diukur pada panjang gelombang 560 nm. Sebagai kontrol digunakan larutan yang dipakai dalam preparasi sampel hati (yaitu PBS yang mengandung 11.5 g/L KCl). Aktivitas SOD (%) dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:  $[1 - (A/B)] \times 100$ , dimana A= absorbansi larutan sampel, B= absorbansi larutan kontrol.

#### Pengukuran aktivitas katalase

Pengukuran dilakukan dengan mengikuti prosedur Iwai *et al.* (2002). Aktivitas katalase diukur berdasarkan besarnya reduksi hidrogen peroksida. Dalam kuvet kuarsa, sebanyak 0.5 ml supernatan hati ditambahkan ke dalam 2.0 ml bufer kalium fosfat (pH 7.0) yang mengandung 10 mM hidrogen peroksida. Perubahan absorbansi pada 240 nm dicatat setiap 15 detik selama 1 menit. Aktivitas katalase dihitung dengan menggunakan data kemiringan (*slope*) kurva absorbansi larutan sampel (SL) maupun larutan blanko (SLb) mengikuti rumus berikut ini :

$$\text{Aktivitas katalase (U/ml)} = \frac{(\text{SL} - \text{SLb}) \times 2.5}{0.0436 \times 0.5}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan prosedur ekstraksi daun suji

Ekstrak daun suji yang diinginkan adalah ekstrak cair yang memiliki aktivitas antioksidan, kadar total klorofil dan kadar klorofil larut air yang tinggi. Skrining terdahulu terhadap beberapa larutan pengeksrak, yaitu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1-0.5%), NaHCO<sub>3</sub> (0.1-0.5%), Na-sitrat 12 mM menunjukkan bahwa penggunaan larutan pengeksrak NaHCO<sub>3</sub> 0.5% dan Na-sitrat 12 mM menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan, kadar total klorofil, dan kadar klorofil larut air yang baik (Prangdimurti *et al.*, 2005). Oleh karena itu untuk selanjutnya dicobakan 6 jenis larutan yaitu NaHCO<sub>3</sub> 0.5%, Na-sitrat 12 mM dan akuades, masing-masing dengan maupun tanpa penambahan Tween 80 1% (b/v). Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh jenis larutan pengeksrak terhadap nilai rata-rata aktivitas antioksidan, kadar total klorofil, dan kadar klorofil larut air dari ekstrak daun suji yang dihasilkan

Larutan pengeksrak	Aktivitas antioksidan (%)	Kadar total klorofil (mg/10 ml)	Kadar klorofil larut air (mg/10 ml)
Akuades	1.74 <sup>a</sup>	1.487 <sup>a</sup>	0.091 <sup>a</sup>
Akuades + Tween 80 1%	8.74 <sup>b</sup>	2.540 <sup>b</sup>	0.509 <sup>bc</sup>
Na-sitrat 12 mM	8.07 <sup>b</sup>	2.478 <sup>b</sup>	0.129 <sup>ab</sup>
Na-sitrat 12 mM + Tween 80 1%	14.13 <sup>c</sup>	2.586 <sup>b</sup>	0.670 <sup>c</sup>
NaHCO <sub>3</sub> 0.5%	12.11 <sup>bc</sup>	2.575 <sup>b</sup>	0.258 <sup>ab</sup>
NaHCO <sub>3</sub> 0.5% + Tween 80 1%	11.94 <sup>bc</sup>	2.606 <sup>b</sup>	0.770 <sup>c</sup>

Ket. : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (p<0.05).

Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan Tween 80 1% ke dalam larutan pengeksrak meningkatkan aktivitas antioksidan (aktivitas menangkap radikal DPPH) dari ekstrak akuades dan ekstrak Na-sitrat, meningkatkan kadar klorofil larut air dari ketiga ekstrak, serta meningkatkan kadar total klorofil dari ekstrak akuades. Penggunaan larutan pengeksrak Tween 80 1% dalam Na-sitrat 12 mM menghasilkan aktivitas antioksidan ekstrak yang paling tinggi, serta pH ekstrak yang mendekati netral (sekitar 6.6), sehingga terpilih untuk digunakan pada tahap berikutnya.

Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat) merupakan surfaktan atau deterjen non ionik dan termasuk dalam bahan tambahan pangan kelas polisorbitat. Penggunaan Tween 80 dalam ekstraksi klorofil dapat menekan pembentukan feofitin dibandingkan deterjen anionik (Vargas dan Lopez, 2003). Tween 80 dapat membantu klorofil lipofil teremulsi di dalam air dan mempermudah kontak dengan enzim klorofilase. Klorofilase bekerja menghidrolisis gugus fitol klorofil sehingga mengubahnya menjadi klorofilid yang larut air.

Na-sitrat 12 mM dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas klorofilase (Lopez et al., 1992). Larutan pengeksrak Tween 80 1% dalam Na-sitrat 12 mM memiliki pH 7.65, yaitu mendekati pH optimum klorofilase daun suji (pH 7.4) (Sibarani, 1994). Kondisi tersebut menyebabkan lebih banyak klorofil larut air yang terbentuk. Penggunaan suhu inkubasi sebesar 70°C adalah berdasarkan pertimbangan bahwa suhu optimum klorofilase dalam pelarut air berkisar antara 65-75°C (Clydesdale dan Francis, 1976). Perlakuan blansir terhadap ekstrak dilakukan selama 1 menit, karena waktu yang lebih lama dapat merangsang terjadinya reaksi oksidasi non enzimatis (Eskin, 1979).

Tahap selanjutnya ditujukan untuk menentukan konsentrasi Tween 80 dan lama inkubasi, dengan menggunakan larutan pengeksrak Tween 80 1% dalam Na-sitrat 12 mM. Hasil dari tahap ini dapat dilihat pada Gambar 1. Pengujian sidik ragam menunjukkan bahwa adanya tahapan inkubasi meningkatkan aktivitas antioksidan dan kadar klorofil larut air. Peningkatan konsentrasi Tween meningkatkan kadar klorofil larut air dari ekstrak, namun peningkatan konsentrasi Tween dari 0.75% menjadi 1% tidak menghasilkan perbedaan kadar klorofil larut air ( $p > 0.05$ ). Dari tahap ini disimpulkan bahwa prosedur ekstraksi yang terbaik adalah dengan menggunakan larutan pengeksrak Tween 80 0.75% dalam Na-sitrat 12 mM dan pemberian inkubasi selama 30 menit pada suhu 70-75°C sebelum tahapan pemisahan padatan. Menurut Sibarani (1994) waktu inkubasi optimum untuk klorofilase daun suji adalah 30 menit.

### Estimasi tingkat penyerapan klorofil ekstrak daun suji

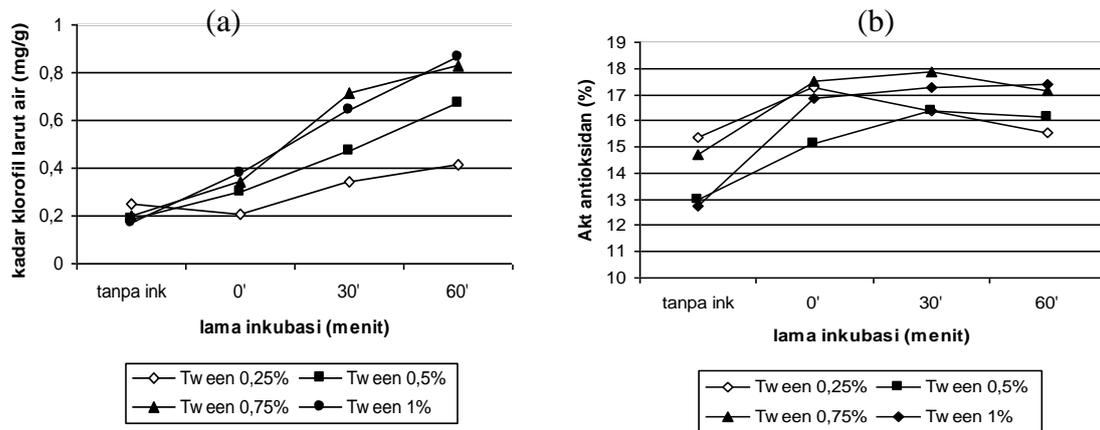
Suatu komponen pangan dapat dengan mudah diserap oleh usus apabila berada dalam kondisi terlarut atau tidak terikat oleh komponen lain yang berukuran besar, oleh karena itu besarnya klorofil yang dapat diserap berkorelasi positif dengan kadar klorofil terlarut.

Berdasarkan kurva standar SCC, kadar klorofil ekstrak daun suji (0.1 g/ml) setara dengan larutan SCC 2,3 mM. Selama pencernaan terjadi penurunan kadar klorofil terlarut, baik klorofil suji maupun SCC (Gambar 2). SCC, suatu klorofilin, umum digunakan sebagai bahan utama suplemen pangan kaya klorofil atau minuman klorofil. Sebanyak 45% klorofil suji terdegradasi di lambung (Gambar 2a), diperkirakan berubah menjadi feofitin. Ferruzzi et al., (2001) menyebutkan bahwa sebanyak 75-77% klorofil pure bayam berubah menjadi feofitin di lambung. Adanya senyawa antioksidan lain dalam ekstrak daun suji diduga turut berperan dalam mencegah degradasi klorofil suji. Analisis yang telah dilakukan terpisah terhadap ekstrak daun suji menunjukkan bahwa ekstrak mengandung total karoten sebanyak 17.0 ppm dan total fenol sebanyak 230.3 ppm. Ferruzzi et al., (2002a) mengungkapkan hal yang sama bahwa keberadaan antioksidan dalam saus apel yang ditambahkan ke dalam larutan SCC menurunkan laju degradasi klorofilin. Gambar 2a memperlihatkan adanya penurunan jumlah klorofil terlarut dari SCC pada kondisi asam (lambung), yang jika dilihat secara visual tampak adanya endapan butiran SCC. Namun endapan yang terbentuk bersifat *reversible* yaitu dengan adanya peningkatan pH hingga di atas 7, seperti yang terjadi pada kondisi usus halus, sebagian SCC dapat melarut kembali. Ferruzzi et al., (2002a) juga menyatakan adanya kehilangan sejumlah SCC selama pencernaan *in vitro* dan berubah menjadi produk yang belum diketahui. Hal ini menegaskan kembali bahwa SCC juga mengalami degradasi di dalam saluran pencernaan, meskipun tidak sebesar klorofil a maupun klorofil b.

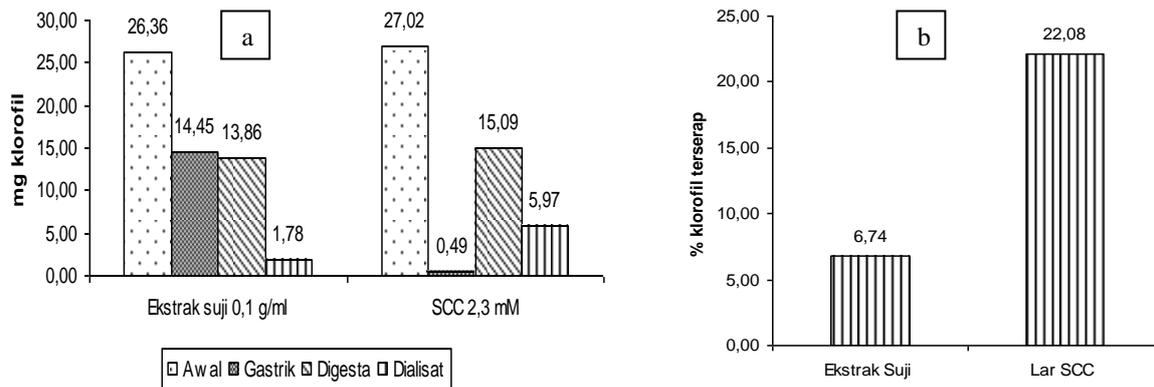
Tingkat penyerapan klorofil ekstrak daun suji jauh lebih rendah dibandingkan larutan SCC (Gambar 2b). Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Ferruzzi et al., (2001; 2002a), yang menggunakan sel absorptif Caco-2, dimana tingkat penyerapan klorofil lipofil sebesar 5-10% sedangkan klorofilin sebesar 45%-60%. Klorofil lipofil membentuk misel berukuran besar sehingga menghambat dialisisnya ke dalam kantung dialisis 6000-8000 MWCO (Salin et al., 1999).

### Pengujian aktivitas antioksidatif menggunakan tikus percobaan

Tikus selama percobaan dalam keadaan sehat yang ditunjukkan oleh adanya kenaikan berat badan sebesar 1,7-1,8 g/hari, dan konsumsi ransum rata-rata sebanyak 15 g/hari. Hasil pengukuran terhadap berat organ dan parameter antioksidatif dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Pengaruh tingkat konsentrasi Tween 80 yang ditambahkan ke dalam larutan pengekstrak Na-sitrat 12 mM dan lama inkubasi terhadap: (a) kadar klorofil larut air, dan (b) aktivitas antioksidan



Gambar 2. (a) Kadar klorofil terlarut pada masing-masing fraksi selama pencernaan *in vitro*, (b) estimasi jumlah klorofil yang terserap

Tabel 2. Pengaruh pemberian ekstrak daun suji dan SCC terhadap berat organ dan parameter antioksidatif tikus percobaan

Parameter	Kelompok Kontrol	Kelompok Suji	Kelompok SCC
Berat organ (g per 100 g BB):			
hati	2.98 <sup>a</sup>	3.22 <sup>a</sup>	3.21 <sup>a</sup>
limpa	0.20 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>
ginjal	0.54 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>
Kadar MDA hati (pmol/g)	217.97 <sup>b</sup>	65.17 <sup>a</sup>	116.49 <sup>a</sup>
Aktivitas katalase hati (U/ml)	16.75 <sup>a</sup>	23.49 <sup>b</sup>	19.58 <sup>ab</sup>
Aktivitas SOD hati (%)	19.02 <sup>a</sup>	23.77 <sup>b</sup>	31.52 <sup>c</sup>

Ket. : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ( $p < 0.05$ )

Pemberian ekstrak daun suji maupun SCC tidak mengakibatkan perbedaan berat organ hati, limpa dan ginjal ( $p > 0.05$ ). Berdasarkan laporan JECFA (Anonim, 1969), tembaga (Cu) dalam senyawa Cu-klorofil/klorofilin terikat kuat dan tidak ada efek toksikologis yang berarti jika diberikan melalui jalur oral, bahkan pada pengujian jangka panjang menggunakan tikus percobaan. Pemberian Cu-klorofilin dalam ransum sebanyak 1500 mg/kg berat badan per hari tidak mengakibatkan efek toksikologis. Perkiraan ADI (*Acceptable Daily Intake*) Cu-klorofil/klorofilin untuk manusia sebesar 0-15 mg/kg berat badan. Sedangkan untuk ekstrak daun suji belum dilakukan analisis histopatologis maupun uji toksisitas.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur kadar MDA (malondialdehida), aktivitas SOD dan aktivitas katalase hati. MDA adalah produk peroksidasi lipid, dan kadarnya dapat ditekan oleh keberadaan senyawa-senyawa antioksidan. Dengan kata lain kadar MDA yang rendah menunjukkan adanya penghambatan terhadap oksidasi lipid oleh suatu antioksidan. Tabel 2 di atas menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun suji maupun SCC menurunkan kadar MDA sebesar 70% dan 47%, diduga karena sifat antioksidatif dari klorofil. Endo et al., (1985) mengemukakan bahwa klorofil merupakan antioksidan pemutus rantai yang bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas. Dalam menghambat oksidasi lipid, klorofil bekerja pada tahap inisiasi. Dikatakannya pula bahwa yang berperan dalam sifat antioksidatif klorofil adalah struktur porfirinnya.

Kerentanan suatu jaringan terhadap kerusakan oksidatif tergantung terutama pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain enzim-enzim antioksidannya. Enzim katalase dan SOD termasuk enzim-enzim utama yang berperan dalam melindungi oksidasi jaringan. Katalase dan SOD adalah enzim-enzim yang bekerjasama menetralkan radikal superoksida. Radikal superoksida pertama-tama didismutasi oleh SOD menjadi  $H_2O_2$  yang masih bersifat toksik, dan selanjutnya  $H_2O_2$  didegradasi oleh katalase menjadi produk yang tidak toksik. Dalam analisis yang dilakukan, katalase ditambahkan ke dalam campuran reaksi dalam jumlah yang sama, kemudian dihitung kecepatan penguraian dari  $H_2O_2$  yang ditambahkan. Hasil pengujian terhadap ekstrak hati kelompok suji menunjukkan adanya peningkatan aktivitas katalase sebesar 40% lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol ( $p < 0.05$ ). Kecepatan penguraian  $H_2O_2$  ini diduga disebabkan oleh: (1) peningkatan aktivitas katalase hati dan/atau (2) kemampuan klorofil menangkap (*scavenge*)  $H_2O_2$ . Efek klorofil terhadap katalase telah dibuktikan secara *in vitro* antara lain oleh Hsu et al., (2005) yang menyatakan bahwa klorofil larut air, dalam hal ini feoforbida dan feoforbida b, memperkuat ketahanan limfosit manusia terhadap kerusakan oksidatif yang diinduksi oleh  $H_2O_2$ . Kemampuan klorofil menangkap  $H_2O_2$  telah diteliti oleh Kumar et al., (2001) yang

menyebutkan bahwa konstanta kecepatan reaksi antara klorofil dengan  $H_2O_2$  adalah sebesar  $2.7 \times 10^6 M^{-1}.s^{-1}$ . Katalase maupun klorofil memiliki kerangka porfirin dalam strukturnya, sehingga diduga klorofil berkontribusi dalam sintesis katalase. Selain itu keberadaan antioksidan lain dalam ekstrak daun suji, seperti karotenoid dan komponen fenolik berkontribusi dalam peningkatan status antioksidatif kelompok suji.

SOD merupakan enzim antioksidan yang berperan dalam dismutasi radikal superoksida. Dalam analisis yang dilakukan, radikal superoksida dihasilkan terlebih dahulu dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Radikal superoksida akan mengoksidasi garam tetrazolium (berwarna kuning) menjadi formazan yang berwarna biru. Semakin tinggi aktivitas SOD berarti semakin banyak radikal superoksida yang dinetralkan, dan hal ini ditunjukkan oleh semakin rendahnya jumlah formazan yang terbentuk. Kelompok suji dan SCC memiliki aktivitas menangkap radikal superoksida yang lebih besar, yaitu masing-masing 25% dan 66% lebih besar dibandingkan kelompok kontrol. Boloor et al. (2000) menyatakan bahwa klorofilin pada konsentrasi 10  $\mu M$  melindungi membran mitokondria hati tikus terhadap radiasi dan fotosensitasi, yang ditandai dengan penurunan peroksida, protein oksidasi, serta restorasi GSH (glutathion) dan SOD.

## KESIMPULAN

Ekstraksi daun suji dilakukan dengan menggunakan larutan pengekstrak Tween 80 0.75% dalam Na-sitrat 12 mM diikuti dengan inkubasi selama 30 menit pada 70-75°C. Metode ini mampu menghasilkan ekstrak daun suji yang lebih baik, yaitu memiliki kadar total klorofil, kadar klorofil larut air dan aktivitas antioksidan yang signifikan lebih tinggi, dibandingkan dengan ekstrak yang dihasilkan dengan hanya menggunakan air (akuades) seperti yang biasa dilakukan di tingkat rumah tangga. Pengujian dengan menggunakan kantung dialisis menunjukkan bahwa klorofilin (SCC) diserap lebih banyak dibandingkan klorofil ekstrak daun suji, yaitu berturut-turut sekitar 22% dan 7%.

Pemberian ekstrak daun suji maupun SCC secara oral selama 2 bulan tidak mengakibatkan perbedaan berat organ hati, limpa dan ginjal tikus Sprague Dawley jantan. Pemberian ekstrak daun suji dapat meningkatkan status antioksidatif tubuh, yang antara lain ditunjukkan oleh adanya penurunan kadar MDA hati sebesar 70% dan peningkatan aktivitas katalase hati sebesar 40% dibandingkan kelompok kontrol, bahkan kondisi ini lebih baik dibandingkan kelompok SCC. Pemberian ekstrak daun suji maupun SCC meningkatkan aktivitas SOD hati, yaitu masing-masing 25% dan 66% lebih besar dibandingkan kelompok kontrol. Peningkatan status antioksidatif tikus

percobaan diduga disebabkan oleh aktivitas antioksidan klorofil yang terkandung dalam ekstrak daun suji maupun SCC.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Ditjen Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional R.I atas dana penelitian yang diberikan melalui Program Hibah Bersaing XIII dengan No.kontrak: 026/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005 dan No.kontrak: 317/SP3/PP/DP2M/II/2006

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1969.** Chlorophyll copper complex and chlorophyllin copper complex, sodium and potassium salts. Thirteenth report of the JECFA-FAO Nutr. Meetings Rep. Series.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1984.** Official Methods of Analysis. Washington D.C.
- Bolor, K.K., J.P. Kamat and T.P. Devasagayam. 2000.** Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization. *J. Toxicology* 155 (1-3): 63-71.
- Clydesdale, F.M. dan F.J. Francis. 1976.** Pigments. *Di dalam* O.R. Fennema. Principles of Food Science. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Egner, P.A., K.H. Stansbury, E.P. Snyder, M.E. Rogers, P.A. Hintz dan T.W. Kensler. 2000.** Identification and characterization of chlorin e4 ethyl ester in sera individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. *Chem.Res.Toxicol.* 13:900-906.
- Endo, Y., R. Usuki, dan T. Kaneda. 1985.** Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *JAOCs* 62 :1387-1390.
- Eskin, N.A. 1979.** Plant Pigments, Flavour and Texture : The chemistry and biochemistry of selected compound. Academic Press, New York.
- Ferruzzi, M. G., M. L. Failla, dan S. J. Schwartz. 2001.** Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoid and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. *J. Agric. Food Chem* 49: 2082-2089.
- Ferruzzi, M. G., M. L. Failla, dan S. J. Schwartz. 2002a.** Sodium copper chlorophyllin: *in vitro* digestive stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells. *J.Agric.Food Chem.* 50: 2173-2179.
- Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P.D., dan S. J. Schwartz. 2002b.** Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* 67(6):2589-2594.
- Gross, J. 1991.** Pigments in Vegetables: chlorophylls and carotenoids. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hsu, C.Y., C.M. Yang, C.M. Chen, P.Y. Chao dan S.P. Hu. 2005.** Effects of chlorophyll-related compounds on hydrogen peroxide induced DNA damage withim human lymphocytes. *J.Agric.Food Chem.* 53:2746-2750.
- Iwai, K., N. Nakaya, Y. Kawasaki, dan H. Matsue. 2002.** Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J.,Agric. Food Chem.* 50:3597-3601.
- Kamat J.P., K.K. Bolor, dan T.P. Devasagayam. 2000.** Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo*. *Biochem Biophys Acta* 1487(2-3):113-27.
- Kubo, I., N. Masuoka, P. Xiao., dan H. Haraguchi. 2002.** Antioxidant activity of dodecyl gallate. *J. Agric. Food Chem.* 50:3533-3539.
- Kumar, S.S., T.P. Devasagayam, B. Bhushan, dan N.C. Verma. 2001.** Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. *Free Radic Res.* 35 (5) : 563-74
- Lopez, J.A.F., L. Almela, M.S. Almansa dan J.M. Lopez-Roca. 1992.** Partial purification and properties of chlorophyllase from chlorophyll *citrus limon* leaves. *Phytochem.* 31 (2) : 447 – 449.
- Prangdimurti, E. D. Muchtadi, M. Astawan, F.R. Zakaria. 2005.** The effect of extraction solutions and incubation time on chlorophyll solubility and antioxidant capacity of suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) leaf extracts. Pre-proceeding of 9<sup>th</sup> ASEAN Food Conference Jakarta, 8-10 August 2005.
- Salin, M.L., L.M. Alvarez, B.C. Lynn, B. Habulihaz, dan A.W. Fountain. 1999.** Photooxidative bleaching of chlorophyllin. *Free Radic Res.* 31:S97-105.

**Sibarani, J. 1994.** Pemurnian Parsial dan Pengujian Aktivitas Enzim Klorofilase dari Daun Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown). Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB, Bogor.

**Singh, R.P., K.N.C. Murthy, dan G.K. Jayaprakasha. 2002.** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. J. Agric. Food Chem. 50: 81-86.

**Vargas, F.D dan O.P. Lopez, 2003.** Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press, London. p 221-232.

**Wijeratne, S.S.K., S.L. Cuppett dan V. Schlegel. 2005.** Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. J.Agric.Food Chem. 53:8768-8774.