ASAM FENOLAT DARI EKSTRAK KACANG PANJANG
(*Vigna sinensis*)

Oleh : Purwantiningsih Sugita *)

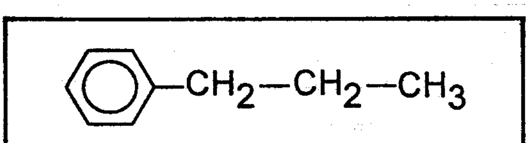
ABSTRACT

Three phenolic acids have been iisolated from the methanol extract of the legume and were identified as caffeic (1), ferulic (2), and vanillic (3) acids. The structure of the three compounds have been elucidated based on spectroscopic evidance.

PENDAHULUAN

Asam fenolat adalah senyawa yang memiliki cincin aromatis dengan satu atau lebih gugus hidroksil, metoksi, karboksil dan banyak terdapat dalam bahan makanan yang berasal dari tumbuhan yang umum dan biasa dikonsumsi masyarakat. Selain enak dan menyegarkan, tumbuhan juga merupakan bahan makanan yang paling mudah didapat. Apalagi di Indonesia yang memiliki iklim tropis dan tanah yang subur, sehingga banyak terdapat berbagai macam tumbuhan yang tumbuh dan berkembang biak.

Asam-asam fenolat dan turunannya terdapat dalam tumbuhan hampir pada semua bagian, yaitu bagian akar, kayu, daun, bunga dan buah. Sedangkan fenol bebas jarang ditemukan dan walaupun ada hanya sedikit sekali. Yang telah tersebar luas adalah turunannya, terutama dalam bentuk turunan fenil propana yang dikenal dengan rumus inti C_6-C_3 (Gambar 1.).



Gambar 1. Struktur Fenilpropana

*) Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA, IPB.

Pada umumnya manusia tidak dapat membentuk sendiri senyawa-senyawa yang berintikan gugus fenol, asam fenolat dan turunannya. Senyawa-senyawa tersebut sebagian besar dapat terpenuhi oleh tumbuhan. Manusia memerlukannya untuk membentuk pigmen melanin. Selain dari senyawa-senyawa fenol, pigmen ini juga dapat dibentuk dari asam-asam amino seperti triptofan, tirosin dan fenilalanin.

Dalam pembentukan strukturnya bukan gugus karboksil yang diperlukan, melainkan gugus aromatisnya. Sisa fenol dan turunannya yang tidak diperlukan lagi oleh tubuh manusia akan mengalami perombakan dalam metabolisme, yang kemudian diekskresikan melalui urin. Pelepasan asam-asam fenolat terutama asam vanilat ke dalam urin sangat tergantung sekali pada macam dan jumlah makanan yang dikonsumsi setiap harinya. Asam vanilat yang diekskresikan melalui urin tersebut merupakan hasil metabolisme dari asam fenolat dalam hati.

Penelitian tentang senyawaan fenolat dalam tumbuhan telah banyak dipelajari. Stoll dan Bouteville (1954) telah berhasil mengidentifikasi asam vanilat, vanilin dan kumarin dalam buah vanili (*Vanila planifolia*) melalui kromatografi kertas, UV visibel dan reaksi pewarnaan.

Dierscherl dan Schmidtmann (1959) telah mengisolasi asam vanilat (asam 4-hidroksi-3-metoksi-bensoat) untuk pertama kali dari urin manusia dalam bentuk kristal sebagai hasil akhir dari metabolisme adrenalin dan nor adrenalin.

Yamamoto dkk. (1964) berhasil mengidentifikasi asam ferulat, asam vanilat dan vanilin yang terdapat dalam padi (*Oryza sativa*) dan sake. Asam-asam fenolat tersebut dipisahkan melalui kromatografi kertas. Sedangkan identifikasinya menggunakan spektroskopi inframerah, UV dan reaksi pewarnaan.

Kusnawijaya (1980) mengadakan penyelidikan asam-asam fenolat khususnya asam kafeat, asam ferulat dan asam vanilat dalam bahan makanan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan dengan metode pemisahan kromatografi kertas dua dimensi. Identifikasinya melalui reaksi pewarnaan, UV dan spektrokopi inframerah. Analisis dilanjutkan dengan mengisolasi asam vanilat dan asam siringat dalam bentuk kristal. Dewasa ini penelitian senyawaan fenolat lebih banyak difokuskan pada potensi bioaktivitasnya.

El Abdaoui, F. (1991) telah mempelajari sifat alelopati dari asam ferulat, asam galat dan asam vanilat pada perkecambahan dan pertumbuhan jagung dan lobak. Dilaporkan bahwa ketiga senyawaan fenolat tersebut menujukkan efek yang nyata.

Nagem, T.J. (1992) telah melakukan isolasi, identifikasi dan uji aktivitas senyawaan fenolat yang berasal dari bibit kacang kedelai sebagai antioksidan. Diperoleh senyawaan fenolat asam klorogenat, asam kafeat, asam p-kumarat dan asam ferulat. Aktivitas antioksidan yang paling besar ditunjukkan oleh asam kafeat.

Berawal dari kajian literatur tesebut, terdapatnya asam-asam fenolat dalam tumbuhan membuka kemungkinan pemanfaatannya dalam bidang industri maupun ksehatan. Penambahan asam vanilat dapat mengawetkan maupun mengharumkan makanan, minuman dan obat-obatan dapat mengawetkan maupun mengharumkan. Pengaruh makanan yang berasal tumbuhan terhadap metabolisme asam vanilat, serta ditemukannya dalam urin berguna untuk penentuan diagnosis klinik yang pemakaiannya masih memerlukan penelitian leih lanjut. Merupakan tantangan bagi para ahli kimia untuk mengadakan penelitian dalam mengembangkan dan mengolah tumbuhan agar mempunyai nilai tambah.

METODE PENELITIAN

1. Bahan dan Alat yang Digunakan

- kacang panjang
- metanol
- asam klorida
- natrium bikarbonat
- asam asetat glasial
- n-butanol
- kalium bromida
- eter
- kertas Whatman
- alat-alat gelas yang lazim di laboratorium
- satu set refluks, evaporator dan penyaring
- spektrofotometer IR, NMR dan MS.

2. Percobaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada. Prosedurnya sebagai berikut : 200 gram kacang panjang segar dihaluskan, ditambah 300 ml metanol pa kemudian diasamkan dengan HCl pekat sampai pH = 2. Campuran ini direfluks selama 12 jam. Hidrolisat ini kemudian disaring, filtratnya diuapkan dan dihidrolisis dalam 32 ml HCl 2M selama 1 jam. Hidrolisat ini kemudian dilarutkan dalam 50 ml eter dan didihkan selama 6 jam. Hasilnya dipisah, lapisan atas (ekstrak eter) dikocok dengan larutan $NaHCO_3$ 5% dengan perbandingan volume 1:1, sedang residunya dibuang. Setelah dikocok, didiamkan dan dipisah. Lapisan atasnya dibuang, sedangkan lapisan bawahnya diasamkan dengan HCl pekat sampai pH = 2, kemudian dikocok lagi dengan eter. Hasilnya dipisah, lapisan bawah dibuang, sedang lapisan atasnya diuapkan dan dilarutkan dalam 4 ml metanol pa. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan kromatrografi kertas satu dimensi. Pemurnian dilakukan dengan cara rekromatografi. Fraksi yang dihasilkan ditentukan titik leburnya dan dianalisis strukturnya dengan spektrofotometer IR, NMR dan MS.

HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pembuatan ekstrak kacang panjang diperoleh suatu cairan berwana kuning kecoklatan. Pemisahan dilakukan dengan metode kromatografi kertas satu dimensi dengan eluen n-butanol : asam asetat: air (4: 1: 5; diambil lapisan atas). Pemisahan ini memberikan 3 spot yang terpisah dengan baik dan pendaran dari ketiga spot tersebut dilihat di bawah lampu UV.

Pemurnian fraksi dilakukan dengan metode rekromatografi dengan eluen metanol : air (9 : 1). Dari pemurnian ini diperoleh kristal halus. Data nilai R_f, warna yang ditimbulkan oleh tiap fraksi dan hasil penentuan titik leburnya disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Nilai R_f dan warna yang Terlihat di bawah Lampu Ultra Violet

No.	Warna yang Terlihat di bawah UV	R_f	Titik lebur (°C)
1.	Biru terang	0,78	225,5
2.	Biru terang	0.87	174,5
3.	Kuning muda	0,90	215

Interpretasi data R_f dan titik lebur dilakukan dengan membandingkan data literatur. Harborne melaporkan bahwa pemisahan asam-asam fenolat dengan metode kromatografi kertas satu dimensi disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Nilai R_f dan Warna yang Terlihat di bawah Lampu Ultra Violet

No.	Asam Fenolat	R_f x 100 dalam BAW	Warna	Titik lebur (°C)
1.	Asam kafeat	79	Biru	223 - 225
2.	Asam fenolat	88	Biru	174
3.	Asama vanilat	-	-	210

Spot 1 dengan R_f = 0,78 dan titik lebur 225,5 °C merupakan harga pendekatan untuk jenis fenolat asam kafeat. Spot 2 dengan R_f = 0.87 dan titik lebur 174,5 °C, merupakan pendekatan untuk jenis fenolat asam ferulat. Sedangkan spot 3 tidak diperoleh data lengkap. Titik lebur spot 3 adalah 215 °C dan ini merupakan pendekatan untuk jenis asam vanilat. Adanya perbedaan nilai mungkin disebabkan fraksi yang belum atau tidak murni. Identifikasi dilanjutkan dengan menggunakan metode spektroskopi IR, NMR dan Masa. Data spektrum IR, NMR dan Massa untuk ketiga spot disajikan dalam Tabel 3.

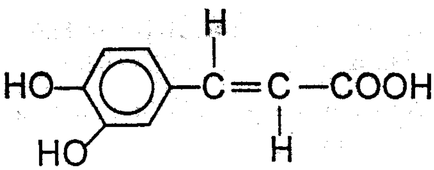
Tabel 3. Data Spektrum IR, NMR dan Massa untuk spot 1, 2 dan 3.

Spek trum	Jenis Serapan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		
		Spot 1	Spot 2	Spot 3
IR	Vibrasi ulur O-H fenol	3500	3500	3500
	Vibrasi ulur C-O	1290, 1120	1290, 1110	1290, 1100
	Vibrasi ulur C-H aromatis	3400-3000	3000	3400-3000
	Vibrasi ulur C=C	1620, 1600	1620,1600	1600, 1500
	Aromatis tersubstitusi pada 1, 2, 4	840, 800	840, 790	849, 790
	Vibrasi ulur C=C yang berkonjugasi dengan aromatis	900	900	-
	Posisi trans	970	970	0
	Vibrasi ulur C=O	1640	1690	1690
	Vibrasi ulur O-H asam	3250	3050	3200
	Vibrasi ulur C-O-C (eter)	-	1320-1230	1320, 1230
	Vibrasi C-O-C-aromatis	-	1380	1380
NMR	Tipe Pemecahan Proton		δ (ppm)	
	Singlet	10,07	7,93	9,83
	Doublet	7,47	7,57	-
	Singlet	7,15	7,13	7,10
	Multiplet	6,66-6,93	6,27	-
	Doublet	6,17	6,80-7,00	7,43
	Singlet	-	3,87	3;90
Massa	Bobot Molekul	180	194	168

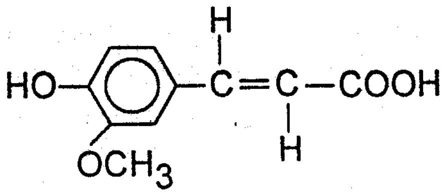
Dari data spektrum infra merah (Tabel 3.) terlihat adanya perbedaan pada daerah serapan di sekitar 900 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur gugus C=C yang terkonjugasi dengan inti benzena. Vibrasi ini hanya terlihat pada spot 1 dan 2. Perbedaan lain pada serapan di sekitar 1320 cm^{-1} dan 1230 cm^{-1} yang 1380 cm^{-1} yang merupakan serapan gugus metil yang terikat pada -0-aromatis. Kedua vibrasi ini hanya nampak pada spot 2 dan 3. Serapan lain pada daerah sekitar 970 cm^{-1} yang memberikan indikasi bahwa hidrogen yang terikat oleh atom C yang berikatan rangkap dua berada pada posisi trans. Serapan ini terlihat pada spot 1 dan 2.

Dari data spektrum NMR (Tabel 3.) terlihat adanya perbedaan pada geseran sekitar 3,87 ppm yang menunjukkan adanya proton CH_3 yang terikat pada -0- aromatis. Geseran ini hanya terlihat untuk spot 2 dan 3. Perbedaan lain pada geseran sekitar 6,13-7,15 ppm yang menunjukkan serapam proton vinil yang terkonjugasi dengan cincin bensena dan dengan adanya tetapan kopling (J) sebesar 16 Hz, sehingga data ini menerangkan bahwa proton pada atom C-vinil berada pada posisi trans. Geseran ini hanya terlihat pada spot 1 dan 2, sedangkan dari data spektrum massa terlihat perbedaan pada bobot molekul yaitu spot 1 mempunyai bobot molekul 180, spot 2 dengan bobot molekul 194 dan spot 3 dengan bobot molekul 168.

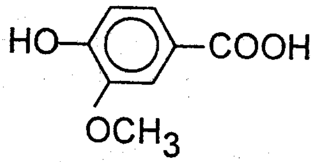
Dari paduan analisis dengan menggunakan spektroskopi IR, NMR dan Massa membuktikan bahwa asam fenolat yang terdapat dalam ekstrak kacang panjang (*Vigna sinensis*) ada 3, yaitu asam kafeat, asam ferulat dan asam vanilat. Struktur ketiga asam fenolat tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



Spot 1.



Spot 2.



Spot 3.

Gambar 2. Sruktur Asam Kafeat (Spot 1), Ferulat (Spot 2) dan vanilat (Spot 3)

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa asam fenolat yang ada dalam ekstrak kacang panjang adalah asam kafeat (BM= 180) dengan rums molekul $C_9H_8O_4$, asam ferulat (BM= 194) dengan rumus molekul $C_{10}H_{10}O_4$, dan asam vanilat (BM=168) dengan rumus molekul $C_8H_8O_4$.

DAFTAR PUSTAKA

El Abdaoui, F., 1991, **Allelopathic Effect of Ferulic, Gallic and Vanilic on Corn (Zea mays L.)**, dissertation, Abstract International. 52:3, 1169 B.

Florkin, M., 1963, **Comprehensive Biochemistry, Pyrol Pigments Isoprenoid Compounds and Phenolic Plant Constituents,** Elseviser Publishing Company, edisi ke 9, 221-230.

Harborne, J.B., **Phytochemical Methods, a guide to modern technique of plant anallysis,** Chapman and Hall Ltd. London, edisi 2, 33-52.

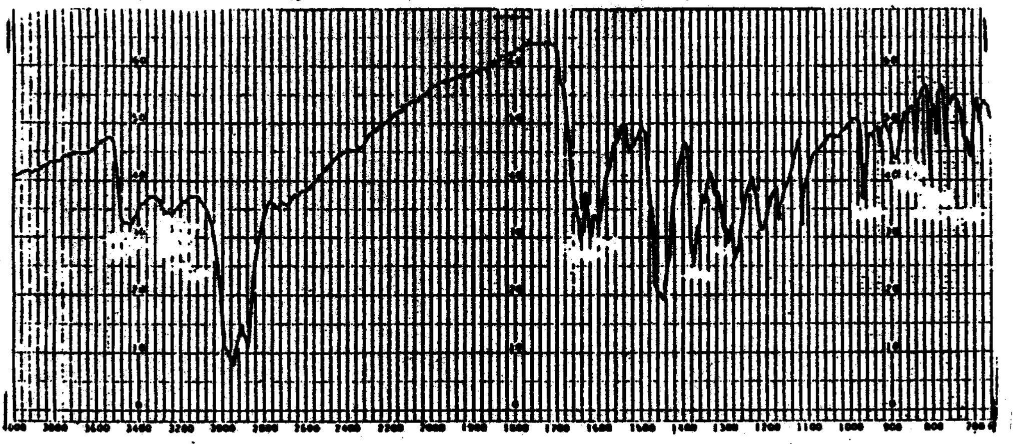
Kusnawidjaja, 1980 **Identifikasi Asam Vanilat dan Asam Siringat Hasil Biotransformasi Asam-asam Fenolat Tumbuhan,** disertasi, FPPA UNPAD.

Nagen, T.J. et al., 1992, **Phenolic Acids in Soybean Cultivares: antioxidant action,** Aquivos-di-Biologia-e-Technologia, 35:1, 129- 138.

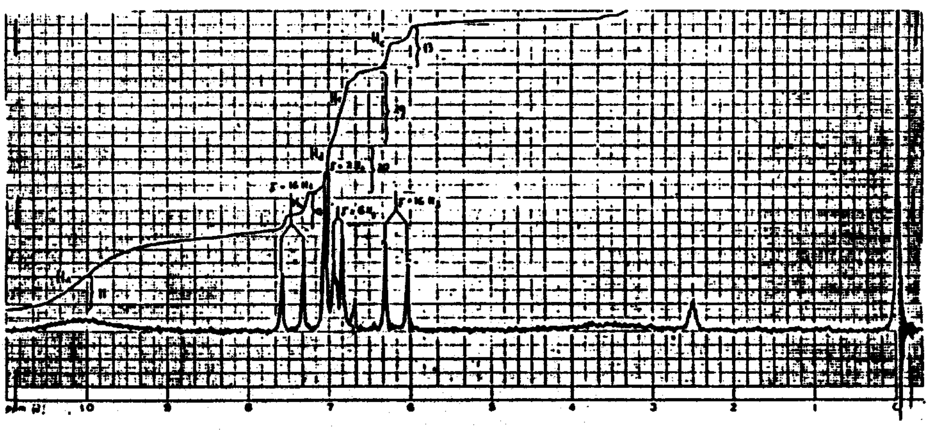
Selligson, H., 1963, **Prosedure for Isolation and Identification of Minuter Ammounts of Phenolic Acids Using Paper Chromatography,** Analytical Biochemistry: 6, 262-366.

Stolls and Y. Bouteville, 1954, **Characterization of some Natural Constituents of Vanilla their Differentiation from Ethyl Vanylilin by Chromatography,** Chem. Abst.: 48, 13171..

Yamamoto, A., 1964, **Seperation and Identification Ferulic Acid, Vanillic Acid and Vanillin,** Chem. Abst: 60, 3455C.

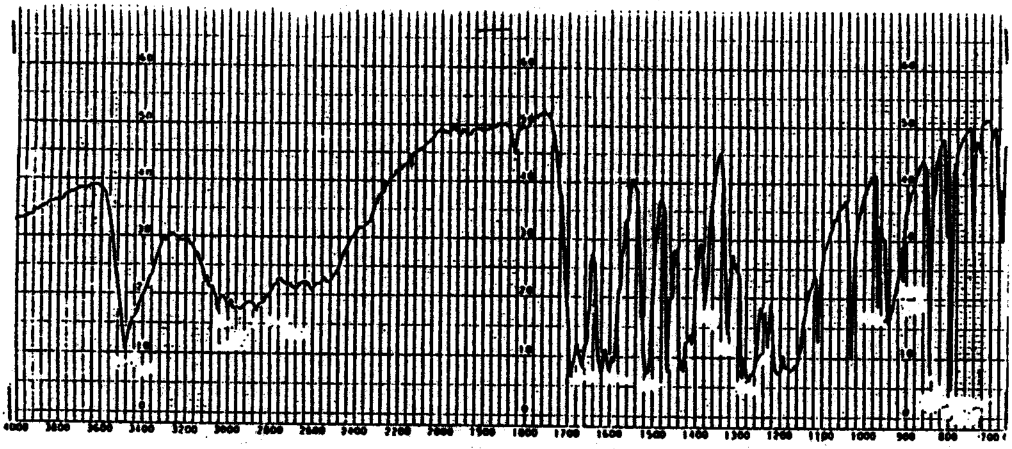


Gambar lampiran 1. Spektrum IR Spot 1

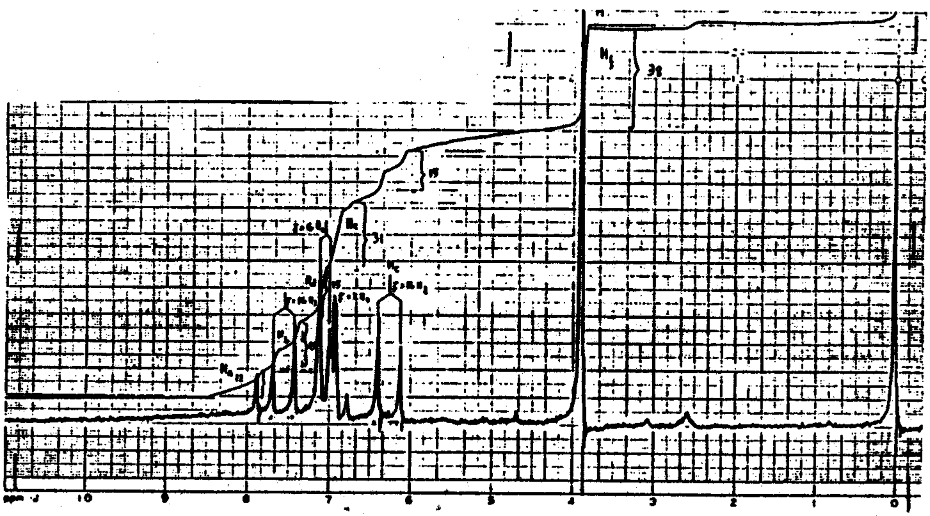


Gambar lampiran 2. Spektrum NMR Spot 1

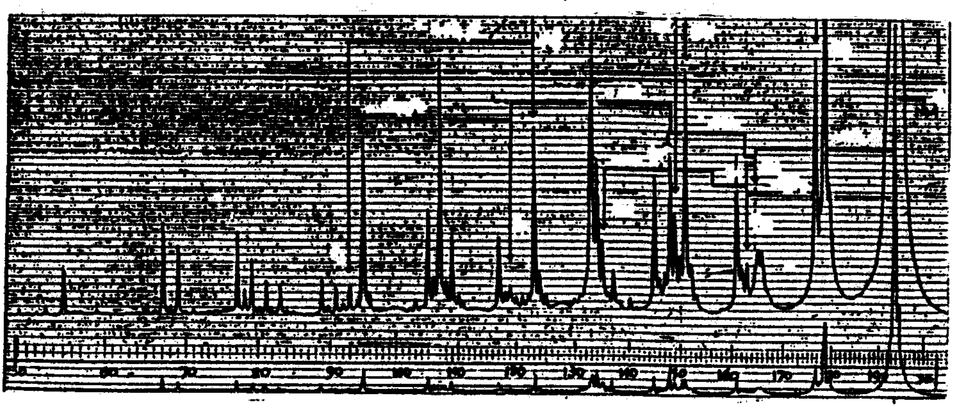
Gambar lampiran 3. Spektrum Massa Spot 1



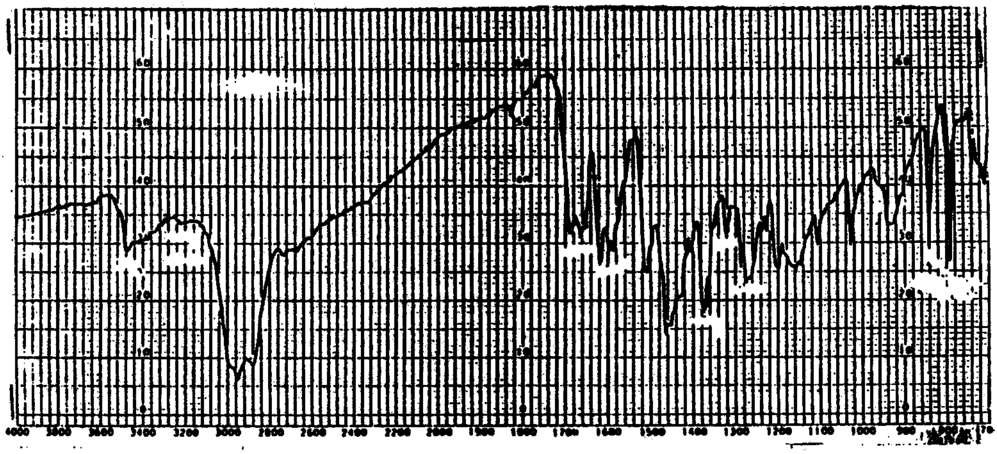
Gambar lampiran 4. Spektrum IR Spot 2



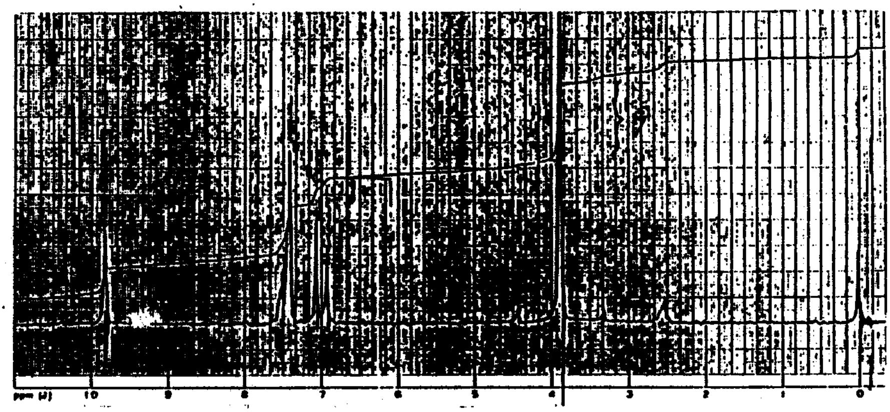
Gambar lampiran 5. Spektrum NMR Spot 2



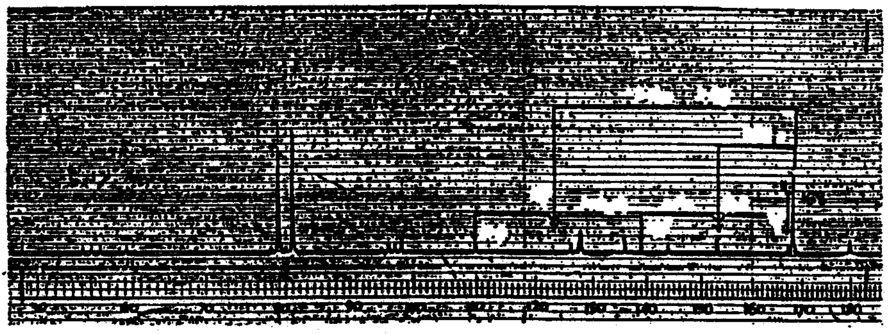
Gambar lampiran 6. Spektrum Massa Spot 2



Gambar lampiran 7. Spektrum IR Spot 3



Gambar lampiran 8. Spektrum NMR Spot 3



Gambar lampiran 9. Spektrum Massa Spot 3