



**IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER PADA HASIL
FRAKSINASI EKSTRAK *Phaseolus vulgaris* L. DENGAN METODE GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY (GC-MS)**

Khurriyatul Khair¹, Yayuk Andayani², Aliefman Hakim³

Program Studi Magister Pendidikan IPA, Program Pascasarjana Universitas Mataram¹²³

Email: khurri@unram.ac.id

Key Words	Abstract
<i>P.vulgaris</i> L extract, fractionation, VLC, GC-MS	This research was aimed to identify some classes of secondary metabolite compound on the fractionation results of green bean extract (<i>P. vulgaris</i> L.) using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) method. Green bean was extracted by methanol solvent. Fractionation of methanol extract used Vacuum Liquid Chromatography (VLC) with some variation of eluents such as n-hexane 100%; n-hexane: ethyl acetate (9 : 1 to 1 : 9); and ethyl acetate 100%, produced 11 major fractions. Based on Thin Layer Chromatography (TLC) analysis using DCM: MeOH (9.5: 0.5) as mobile phases, these 11 major fractions were classified based on their polarity such as non-polar, semi-polar and polar fraction. The results of identification by GC-MS spectrometer showed the presence of secondary metabolites such as monoterpenes in non-polar fraction; in semi-polar fraction was found terpenoids and steroids; in polar fraction was found monoterpenes, phenolic and steroid as the lowest percent area, that is less than 2%.
Kata Kunci	Abstrak
Ekstrak <i>P.vulgaris</i> L, fraksinasi, KCV, GC- MS	Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder pada hasil fraksinasi ekstrak buah buncis (<i>P. vulgaris</i> L.) dengan metode <i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (GC-MS). Buah buncis diekstraksi dengan pelarut metanol. Fraksinasi ekstrak metanol dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan variasi eluen <i>n</i> -heksan 100 %; <i>n</i> -heksan : etil asetat = 9:1 sampai 1:9; dan etil asetat 100%, menghasilkan 11 fraksi utama. Berdasarkan uji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen DCM:MeOH (9,5:0,5), 11 fraksi utama hasil KCV digolongkan berdasarkan kepolarannya yaitu fraksi nonpolar, semipolar dan polar. Hasil identifikasi dengan spektrometer GC-MS menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder golongan monoterpen pada fraksi nonpolar; pada fraksi semipolar ditemukan terpenoid dan steroid; dan pada fraksi polar ditemukan monoterpen, fenolik dan steroid dengan % area terendah yaitu kurang dari 2%.

PENDAHULUAN

Buncis merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat meluruhkan kencing (diuretik) dan menurunkan kadar glukosa darah (sebagai antihiperlikemik), diduga karena peran senyawa aktif β -sitosterol dan stigmasterol (Andayani, 2003). Karena khasiatnya tersebut, maka ekstrak buah buncis telah diproduksi dalam bentuk sediaan serbuk yang dikemas dalam bentuk kapsul. Kemampuan aktivitas antioksidan dari ekstrak *Phaseolus vulgaris* L. telah dilaporkan oleh Kurnia (2013), sedangkan Nugrahani (2015) melaporkan bahwa serbuk ekstrak buah buncis memiliki aktivitas antioksidan, diduga karena mengandung senyawa golongan flavonoid. Penelitian yang dilakukan Lam (2010) menyebutkan bahwa biji buncis dapat bertindak sebagai antitumor, antijamur dan anti-HIV-1 *reverse transcriptase*.

Buncis (*P. vulgaris* L.) dikonsumsi secara luas oleh masyarakat sebagai sayuran. Penelitian mengenai kandungan fitokimia dari tanaman buncis ini telah dilakukan, diantaranya Jannah (2013) melaporkan hasil uji Kromatografi Lapis Tipis menunjukkan adanya kandungan senyawa fitosterol dalam ekstrak buah buncis, Balafif

(2013) menemukan adanya kandungan senyawa golongan triterpenoid dalam fraksi partisi metanol dari ekstrak air buah buncis dan Risnafiani (2015) melaporkan kandungan fitokimia dari daun buncis diantaranya adalah senyawa golongan steroid, alkaloid, kuinon, tannin, flavonoid, polifenol, monoterpen dan seskuiterpen. Atchibri, *et al.* (2010) melaporkan aktivitas antidiabetes dan kandungan fitokimia dari biji *P. vulgaris* L. yang terdiri atas alkaloid, antrakuinon, *catechic tannins*, flavonoid, *gallic tannins*, glikosida, polifenol, saponin, steroid dan terpenoid. Walaupun telah banyak dilakukan penelitian mengenai profil fitokimia dari tanaman ini, identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder pada hasil fraksinasi kromatografi cair vakum (KCV) dari buah buncis dengan spektrometer GC-MS belum pernah dilaporkan. Berdasarkan uraian di atas maka dipandang perlu mengidentifikasi dan membandingkan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada hasil fraksinasi ekstrak metanol buah buncis.

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi ilmiah mengenai senyawa-senyawa metabolit sekunder dari buah buncis

yang tergolong dalam fraksi polar, semipolar dan nonpolar yang berguna untuk pengembangan ilmu kimia bahan alam dan memberikan peluang untuk dilakukannya penelitian lanjutan untuk mengetahui bioaktivitas dari senyawa metabolit sekunder dari buncis ini.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian deskriptif-eksploratif untuk menganalisis senyawa metabolit sekunder hasil fraksinasi ekstrak buah buncis yang dilakukan melalui tahapan ekstraksi, fraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV), analisis hasil fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilaksanakan di laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Mataram dan analisis dengan metode spektroskopi *GC-MS* dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Udayana. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 kg serbuk kering buah buncis, metanol teknis, metanol *pro-analysis*, n-heksan teknis, diklorometana (DCM) *pro-analysis*, etil asetat teknis, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ berlapis alumunium, silika gel 60 G dan silika gel

impregnasi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini lampu UV λ_{254} dan λ_{366} , corong pisah, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, pipa kapiler, pipet tetes, spatula, bejana pengembang (*chamber*), neraca analitik, dan botol kaca 150 mL, peralatan destilasi (*rotary evaporator*) dan peralatan kromatografi cair vakum (KCV). Pada tahap identifikasi senyawa metabolit sekunder digunakan spektrometer *GC-MS*.

Ekstraksi Buah Buncis (Phaseolus vulgaris L.)

Ekstraksi buah buncis dilakukan dengan cara maserasi bertingkat yaitu perendaman buah buncis kering sebanyak 1000 gram pelarut metanol sebanyak 3000 ml selama 1 x 24 jam dengan sekali-kali pengocokan. Kemudian maserat (maserat A) dipisahkan dari ampas setelah 24 jam maserasi dan ditampung dalam bejana lain. Remaserasi dilakukan dengan memasukan pelarut sebanyak 2000 ml ke dalam bejana yang berisi residu (ampas), dan dilakukan pengocokan, lalu dibiarkan 24 jam. Maserat B dipisahkan setelah 24 jam, kemudian mencampur maserat A dan B. Remaserasi dilakukan kembali selama 1 x 24 jam hingga diperoleh maserat C dengan 1000 mL metanol. Maserat A, B, C dicampur dan dilakukan evaporasi dengan

menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol pekat.

Fraksinasi Ekstrak Metanol Buah Buncis (Phaseolus vulgaris L.) dengan Metode Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak hasil evaporasi (ekstrak metanol buah buncis) difraksinasi dengan KCV (eluen *n*-heksan 100 %; *n*-heksan : etil asetat = 9:1 sampai 1:9; dan etil asetat 100%) dengan fase diam silika gel 60 G. Fraksi-fraksi yang keluar dari kolom ditampung ke dalam botol kaca 150 mL dan dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi-fraksi yang memiliki spot dengan *R_f* yang sama atau mirip pada plat KLT dijadikan satu fraksi besar/utama dan digolongkan berdasarkan kepolarannya.

Identifikasi Kepolaran Fraksi-Fraksi Hasil KCV Ekstrak Metanol P. vulgaris L. dengan Metode KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan terhadap ekstrak dan hasil fraksinasi ekstrak metanol buah buncis. Langkah analisis KLT adalah sebagai berikut: *chamber* kromatografi diisi dengan eluen DCM : MeOH (9,5:0,5), ditotolkan ekstrak dan fraksi-fraksi hasil kromatografi cair vakum (KCV) pada bagian plat KLT yang telah diberi tanda sebelumnya, dimasukkan plat KLT ke dalam *chamber* yang berisi eluen, dan diangkat plat KLT jika eluen telah

mencapai batas yang telah ditentukan. Spot-spot yang muncul pada plat KLT diamati dengan menggunakan lampu UV 254 dan 366.

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Nonpolar, Semipolar dan Nonpolar Ekstrak Metanol P. vulgaris L. dengan spektrometer GC-MS

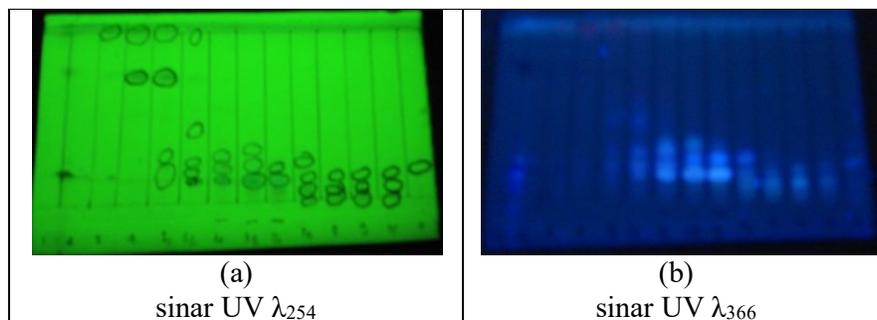
Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan Spektrometer GC-MS. Fraksi nonpolar, semipolar dan polar masing-masing diinjeksikan ke dalam alat GC-MS. Kondisi *running GC-MS* QP-2010 Ultra dilakukan pada temperatur oven kolom sebesar 70°C-270°C, sedangkan temperatur injeksi 250°C. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan tekanan sebesar 76,1 kPa dan laju alir 1,19 mL/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menghasilkan maserat sebanyak 5,25 L diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 42°C - 45°C menghasilkan 100 mL ekstrak kental buah buncis dan terbentuk 3 lapisan dimana lapisan ketiga memiliki hasil terbaik berdasarkan uji KLT. Fraksinasi 10 gram lapisan ketiga

ekstrak metanol buah buncis menghasilkan 11 fraksi utama dimana fraksi dengan spot yang mirip disatukan. Hasil fraksinasi dengan KCV dikelompokkan menjadi kelompok fraksi nonpolar, semipolar dan polar

berdasarkan uji KLT pada tiap fraksi dengan eluen DCM:MeOH (9,5:0,5). Gambar 1 menunjukkan hasil uji KLT fraksi-fraksi hasil KCV dan Tabel 1 merupakan penggolongan fraksi-fraksi berdasarkan kepolarannya.



Gambar 1. Kromatogram KLT fraksi-fraksi KCV dengan eluen DCM: MeOH (9,5:0,5)

Tabel 1. Tabel penggolongan kepolaran hasil fraksinasi KCV ekstrak metanol buah buncis.

Fraksi	Eluen	Nilai Rf Spot ke -					Pengelompokan
		1	2	3	4	5	
1	n-heksan 100%	-	-	-	-	-	Nonpolar
2	n-heksan : EtOAc 9:1	-	-	-	-	-	Nonpolar
3	n-heksan : EtOAc 8:2	1	-	-	-	-	Nonpolar
4	n-heksan : EtOAc 7:3	1	0,72	-	-	-	Nonpolar
5 _A	n-heksan : EtOAc 6:4	1	0,72	0,27	0,15	-	Semipolar
5 _B	n-heksan : EtOAc 6:4	0,96	0,38	0,22	0,17	0,12	Semipolar
6 _A	n-heksan : EtOAc 1:1	0,26	0,19	0,12	-	-	Semipolar
6 _B	n-heksan : EtOAc 1:1	0,27	0,19	0,12	-	-	Semipolar
7 _A	n-heksan : EtOAc 4:6	0,17	0,12	-	-	-	Semipolar
7 _B	n-heksan : EtOAc 4:6	0,20	0,12	0,05	-	-	Semipolar
8	n-heksan : EtOAc 3:7	0,12	0,05	-	-	-	Polar
9	n-heksan : EtOAc 2:8	0,13	0,07	-	-	-	Polar
10	n-heksan : EtOAc 1:9	0,13	0,07	-	-	-	Polar
11	EtOAc 100%	0,07	-	-	-	-	Polar

Penggolongan fraksi-fraksi hasil KCV didasarkan pada kepolarannya, mulai dari nonpolar, semipolar dan polar. Kromatogram hasil fraksinasi

KCV yaitu fraksi 1 sampai dengan 11 menghasilkan noda dengan berbagai variasi Rf dan terdapat juga spot yang mirip. Hasil KLT menunjukkan belum

adanya senyawa yang terfraksinasi pada fraksi 1 dan 2, sedangkan pada fraksi 3 dan 4, tampak spot/noda dengan nilai R_f yang besar atau spot-spot yang dihasilkan terelusi jauh mendekati jarak tempuh eluen. Kepolaran suatu senyawa dari hasil uji KLT ditentukan oleh sejauh mana senyawa terelusi oleh eluen yang digunakan. Semakin jauh terelusi maka semakin nonpolar sifat dari fraksi tersebut, atau semakin besar nilai R_f maka semakin nonpolar sifat dari suatu senyawa. Hal ini dapat dipahami karena pada fasa diam, plat KLT bersifat polar, sedangkan eluen KLT yang digunakan harus memiliki kepolaran yang lebih rendah daripada plat KLT, sehingga hanya senyawa-senyawa dengan sifat polar yang dapat tertinggal pada fasa diam (plat KLT), sedangkan senyawa-senyawa nonpolar akan terelusi jauh oleh fasa gerak (eluen) meninggalkan fasa diam. Dengan demikian, berdasarkan kromatogram KLT hasil fraksinasi KCV ekstrak metanol buah buncis, fraksi 1-4 digolongkan ke dalam fraksi nonpolar, fraksi 5-7 merupakan fraksi semipolar dan fraksi 8-11 merupakan fraksi polar.

Fraksi 1-4 memiliki perbandingan eluen KCV dengan jumlah n-heksan lebih banyak

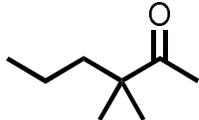
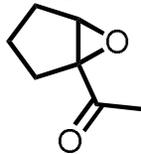
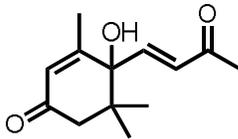
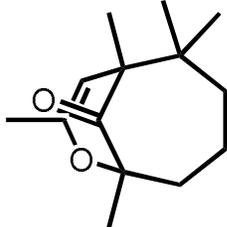
dibandingkan dengan jumlah etil asetat sehingga akan melarutkan senyawa-senyawa nonpolar pada fraksinasi dengan KCV, sedangkan fraksi 5-7 memiliki perbandingan eluen dengan jumlah n-heksan dan etil asetat yang hampir sama sehingga dapat melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat semipolar. Fraksi 8-11 memiliki perbandingan eluen KCV dengan jumlah etil asetat lebih banyak dibandingkan dengan jumlah n-heksan, sehingga dapat melarutkan senyawa-senyawa polar. Dengan demikian pada analisis KLT senyawa-senyawa yang teridentifikasi pada fraksi 1-4 digolongkan dalam kelompok senyawa yang bersifat nonpolar, fraksi 5-7 bersifat semipolar dan fraksi 8-11 bersifat polar.

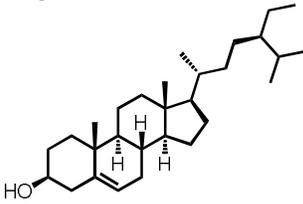
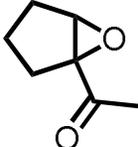
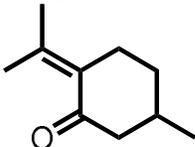
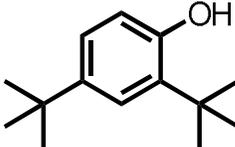
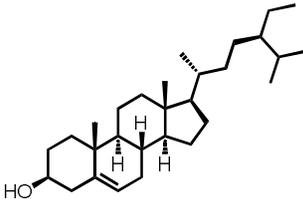
Hasil identifikasi senyawa-senyawa metabolit sekunder pada fraksi nonpolar, semipolar dan polar dari hasil fraksinasi ekstrak metanol buah buncis dengan spektrometer *GC-MS* yang *running* pada temperatur oven kolom 70°C - 270°C, temperatur injeksi 250°C dengan gas pembawa helium pada tekanan 76,1 kPa dan laju alir 1,19 mL/menit, dapat dilihat pada Tabel 2. Identifikasi dengan *GC-MS* menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder

golongan monoterpen pada fraksi nonpolar; golongan terpenoid dan steroid pada fraksi semipolar; golongan monoterpen, fenol dan steroid pada fraksi polar dengan % area terendah yaitu kurang dari 2%. Hal ini dapat dipahami karena umumnya senyawa metabolit sekunder golongan steroid

dan flavonoid bersifat semipolar dan nonpolar bergantung pada gugus fungsi yang diikat oleh kerangka utamanya, dengan demikian pada fraksi polar % area dari senyawa-senyawa metabolit sekunder memiliki nilai yang paling rendah dibandingkan dengan nilai % area fraksi yang lainnya.

Tabel 2. Hasil Analisis GC-MS Senyawa Metabolit Sekunder pada Tingkat Fraksi

Fraksi	Peak	R. Time	% Area	Nama Senyawa Metabolit Sekunder & Strukturnya	Golongan Senyawa
Nonpolar	4	3,869	5,06	3,3-dimethyl-2-hexanone 	Monoterpen
	6	4,780	5,00	1-acetyl-1,2-epoxy-cyclopentane 	Monoterpen
Semipolar	3	15,982	5,38	4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-2-cyclohexen-1-one 	Terpenoid
	5	17,600	4,71	1,2,2,6,8-pentamethyl-7-oxabicyclo[4,3,1]dec-8-en-10-one 	Terpenoid

	15	26,866	8,77	Stigmast-5-en-3.beta.-ol 	Steroid
Polar	12	4,768	1,81	1-acetyl-1,2-epoxy-cyclopentane 	Monoterpen
	22	7,429	0,31	Pulegone 	Monoterpen
	38	12,664	1,75	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol 	Fenol
	45	27,172	0,03	Gamma-sitosterol 	Steroid

Hasil analisis GC-MS pada fraksi nonpolar menunjukkan terdapat dua senyawa yang tergolong dalam monoterpen yaitu 3,3-dimethyl-2-hexanone dengan % area 5,06% dan 1-acetyl-1,2-epoxy-cyclopentane dengan % area 5,00%. Monoterpen merupakan senyawa yang disusun oleh dua unit

isoprena dengan jumlah atom C sebanyak 10. Penelitian yang dilakukan oleh Balafif, dkk (2013) menemukan adanya kandungan triterpenoid pada ekstrak metanol hasil partisi ekstrak air buah buncis dengan % area 4,66%. Triterpenoid terdiri atas 6 unit isoprena dengan jumlah atom C sebanyak 30.

Hasil analisis dengan GC-MS pada fraksi semipolar menunjukkan terdapat dua senyawa golongan terpenoid yaitu 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-2-cyclohexen-1-one dengan % area 5,38% dan 1,2,2,6,8-pentamethyl-7-oxabicyclo[4,3,1]dec-8-en-10-one dengan % area 4,71%. Metabolit sekunder lain yang teridentifikasi adalah golongan steroid yaitu stigmast-5-en-3.β-ol dengan % area 8,77. Penelitian yang dilakukan oleh Jannah, dkk (2013) menemukan kandungan senyawa stigmasterol dengan % area 2,48% pada ekstrak kasar yaitu ekstrak etanol buah buncis. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah stigmasterol yang teridentifikasi pada fraksi semipolar ekstra metanol lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak etanol buah buncis. Metanol sebagai pelarut memiliki ukuran molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan etanol sehingga dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder lebih banyak.

Hasil analisis GC-MS pada fraksi polar menunjukkan terdapat dua senyawa golongan monoterpen yaitu 1-acetyl-1,2-epoxy-cyclopentane dengan % area 1,81% dan pulegon dengan % area 0,31%.

DAFTAR PUSTAKA

Andayani, Y. 2003. *Mekanisme Aktivitas Antihiperlipemik Ekstrak Buncis (Phaseolus*

Metabolit sekunder golongan fenol yang teridentifikasi adalah 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol dengan % area 1,75%. Golongan steroid yang teridentifikasi pada fraksi ini adalah gamma-sitosterol dengan % area 0,03%. Senyawa metabolit sekunder golongan fenol hanya ditemukan pada fraksi polar, walaupun dengan persentase area yang rendah yaitu 1,75 %. Hal ini menunjukkan bahwa fenolik yang terkandung dalam buah buncis bersifat polar.

Tidak teridentifikasinya senyawa metabolit sekunder yang lain pada fraksi-fraksi hasil fraksinasi ekstrak metanol buah buncis diduga karena keterbatasan senyawa-senyawa standar yang terdapat pada library spektrometer GC-MS.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi dengan *Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS)* menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder golongan monoterpen; golongan terpenoid dan steroid pada fraksi semipolar; golongan monoterpen, fenol dan steroid pada fraksi polar dengan % area terendah yaitu kurang dari 2%.

vulgaris L.) pada Tikus Diabetes dan Identifikasi Komponen Aktif. Disertasi S3. Institut Pertanian Bogor.

- Atchibri, A.L. Ocho Anin., Brou., Kouakou., Kouadlo dan Gnakri. 2010. Screening for Antidiabetic Activity and Phytochemical Constituents of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds. *Journal of Medicinal Plant Research*, Vol. 4(17), pp. 1757-1761.
- Balafif, R.A.R., Andayani, Y., dan Gunawan, E.R. 2013. Analisis Senyawa Triterpenoid dari Hasil Fraksinasi Ekstrak Air Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chemical Program* Vol. 6 No.2, hal 56-61.
- Jannah, H., Sudarma I M., dan Andayani, Y. 2013. Analisis Senyawa Fitosterol dalam Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chemical Program* Vol. 6 No. 2, hal 71-75.
- Kurnia, N. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Buah Buncis (Phaseolus vulgaris L.)*. Tesis S2. Universitas Mataram.
- Lam, S.K. 2010. Isolation and Characterization of a French Bean Hemagglutinin with Antitumor, Antifungal and Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase Activities and an Exceptionally High Yield. *Phytomedicine*, 17, 457-462.
- Nugrahani, R. 2015. *Analisis Potensi Serbuk Ekstrak Buncis (Phaseolus vulgaris L.)*. Tesis S2. Universitas Mataram.
- Risnafiani, A.R., Rismawati, E. dan Hilda A. 2015. Karakterisasi Daun Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba 2015*.