

## THE INFLUENCE OF STRONG AND WEAK ACID UPON AGGREGATION AND PHEOPHYTINIZATION OF CHLOROPHYLL A AND B

*Pengaruh Asam Kuat dan Asam Lemah terhadap Agregasi dan Feofitinisasi Klorofil a dan b*

Lia Kusmita<sup>1</sup> dan Leenawaty Limantara<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Magister of Biology, Satya Wacana Christian University, Jl Diponegoro no.52-60, Salatiga

<sup>2</sup> Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments, Univ. Ma Chung, Malang 65151

Received September 13, 2008; Accepted February 1, 2009

### ABSTRACT

Chlorophyll is green pigment that can be found in plant chloroplast. Higher plants usually have two kinds of chlorophylls, chlorophyll a and b. These green pigments are easily degraded by temperature, light intensity, oxygen, acid, and water. Water causes aggregation of chlorophyll, while acid causes pheophytinization of chlorophyll. Aggregation and pheophytinization process of chlorophyll are influenced by solvents. This study was conducted to observe the spectral difference of aggregated chlorophyll in acetone and methanol upon pheophytinization by strong (HCl) and weak acid (CH<sub>3</sub>COOH), in comparison to the non-aggregated chlorophyll. Observation of spectral pattern was carried out using double beam spectrophotometer CARY 50 at 350-1100 nm. The result shows that pheophytinization of chlorophyll a and b causes hypsochromic shift, particularly at Soret band. There are new peak formations in Qx region, specifically at 506 and 535 nm for pheophytinized-chlorophyll a, and at 371, 435, 526 and 599 nm for pheophytinized-chlorophyll b.

**Keywords:** aggregation, chlorophyll a and b, pheophytinization

### PENDAHULUAN

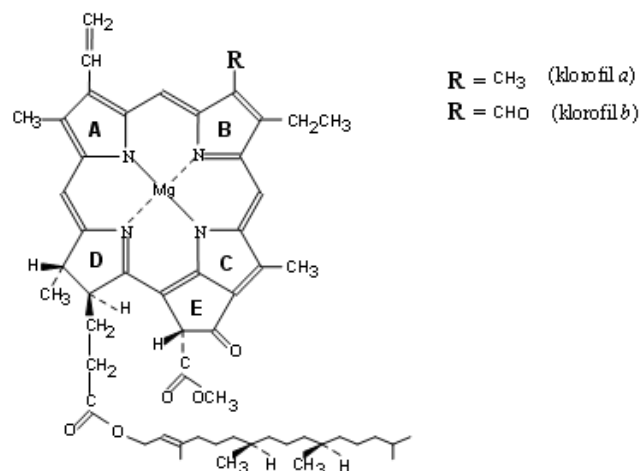
Klorofil merupakan pigmen yang berwarna hijau yang terdapat pada kloroplas sel tanaman [1]. Pigmen klorofil sangat berperan dalam proses fotosintesis dengan mengubah energi cahaya menjadi energi kimia. Proses tersebut dibutuhkan tidak hanya bagi tumbuhan tetapi juga pada hewan dan manusia, karena sebagian besar kebutuhan gizi berasal dari proses fotosintesis. Pada tumbuhan tingkat tinggi klorofil yang sering ditemukan adalah klorofil a dan b dengan perbandingan 3:1 [2]. Perbedaan struktur klorofil a dan b disajikan pada Gambar 1.

Selain berperan dalam fotosintesis, klorofil juga memberikan manfaat secara langsung bagi kesehatan manusia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa klorofil mempunyai bioaktivitas tinggi diantaranya sebagai senyawa antikanker [3-4], antioksidan [5], katalisator pelepas radikal bebas [6], menghambat oksidasi lipid, fototoksin khususnya terhadap larva nyamuk [7], membersihkan darah kotor, meningkatkan imunitas [8], serta dapat bertindak sebagai fotosensitizer dalam terapi fotodinamika untuk penghancuran sel tumor dan kanker [9].

Namun klorofil mudah mengalami degradasi menjadi turunannya. Klorofil dapat terdegradasi oleh pengaruh suhu, cahaya, air, asam, basa dan alkohol [2,10]. Dalam proses memperoleh klorofil dari sayuran

hijau, faktor-faktor tersebut pasti sangat mempengaruhi. Turunan klorofil yang berupa feofitin tersebut ternyata juga mempunyai banyak manfaat. Berdasarkan hasil penelitian, feofitin dapat berfungsi sebagai antioksidan potensial yang dapat mencegah kanker [11-14].

Adanya air akan menyebabkan klorofil mengalami agregasi. Kehadiran air menyebabkan pusat logam magnesium yang bersifat nukleofilik dapat membentuk ikatan hidrogen dengan air yang bersifat elektrofilik. Kemudian satu atom hidrogen yang lain pada air akan



**Gambar 1.** Struktur kimia Klorofil a dan b

\* Corresponding author. Tel/Fax : +62-341-556400/550175  
Email address : leenawaty.limantara@machung.ac.id

mengikat monomerik klorofil lain atau senyawa lain seperti protein, sehingga akan membentuk agregat. Jika tersedia banyak air maka ikatan tersebut akan terjadi terus menerus dan akan membentuk agregat yang besar.

Kehadiran asam seperti yang terdapat dalam lambung juga dapat menyebabkan klorofil mengalami degradasi menjadi feofitin. Feofitin merupakan salah satu turunan klorofil yang terbentuk jika pusat logam magnesium dalam klorofil terlepas. Pengaruh asam yang mempunyai ion  $\text{OH}^-$  akan menarik ion logam magnesium yang ada dalam cincin makrosiklik klorofil, sehingga ion tersebut akan lepas. Menurut Gross, penambahan 13% HCl pada klorofil dapat menyebabkan pembentukan turunannya berupa feofitin [2]. Selama ini belum ada yang melakukan penelitian mengenai proses pembentukan feofitin baik menggunakan asam lemah maupun asam kuat pada klorofil yang sudah mengalami agregasi. Penambahan air dan asam akan mempengaruhi pola spektra senyawa klorofil. Berdasarkan latar belakang di atas maka tujuan penelitian ini adalah mengamati pengaruh penggunaan asam lemah ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) dan asam kuat (HCl) terhadap perubahan spektra pada proses feofitinisasi klorofil yang teragregasi dalam pelarut metanol dan aseton.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah klorofil *a* dan *b* yang diisolasi dari daun suji. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah aseton, metanol, heksan, dietil eter,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, silika gel dan akuades.

### Alat

Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-tampak CARY 50.

### Prosedur Kerja

#### Ekstraksi pigmen

Daun yang telah dihaluskan diekstraksi dengan pelarut metanol:aseton (7:3 v/v), disaring dan residu diekstrak kembali sampai semua pigmen terangkat. Kemudian filtrat yang diperoleh dipartisi dengan dietil eter. Lapisan dietil eter diambil, ditambah  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, disaring dan dikeringkan dengan *rotary evaporator*.

#### Isolasi klorofil *a* dan *b*

Ekstrak kasar pigmen dimurnikan dengan kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan adalah Silika Gel 60 dan fase gerak yang digunakan

heksana:eter:aseton (60:30:20 v/v). Pita yang berwarna hijau biru (klorofil *a*) dan hijau kekuningan (klorofil *b*) ditampung dan dikeringkan.

#### Pola agregasi klorofil *a* dan *b* dengan penambahan volume air

Klorofil *a* dan *b* yang sudah murni dibuat larutan dengan OD (*Optical Density*)  $\sim 1$  (0.95-1) pada panjang gelombang maksimum ( $Q_y$ ). Pola agregasi klorofil *a* dan *b* dalam pelarut aseton dan metanol dengan penambahan berbagai variasi air dianalisa pola spektrumnya pada panjang gelombang 350 sampai 1100 nm.

#### Pola feofitinisasi klorofil *a* dan *b* dengan penambahan asam kuat (HCl) dan asam lemah ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

Agregat klorofil *a* dan *b* dideagregasi menggunakan asam kuat dan asam lemah. Pola feofitinisasi klorofil *a* dan *b* agregat dalam pelarut aseton dan metanol dengan penambahan HCl dan asam asetat dianalisa pola spektranya pada panjang gelombang 350 nm sampai 1100 nm.

### Analisa Data

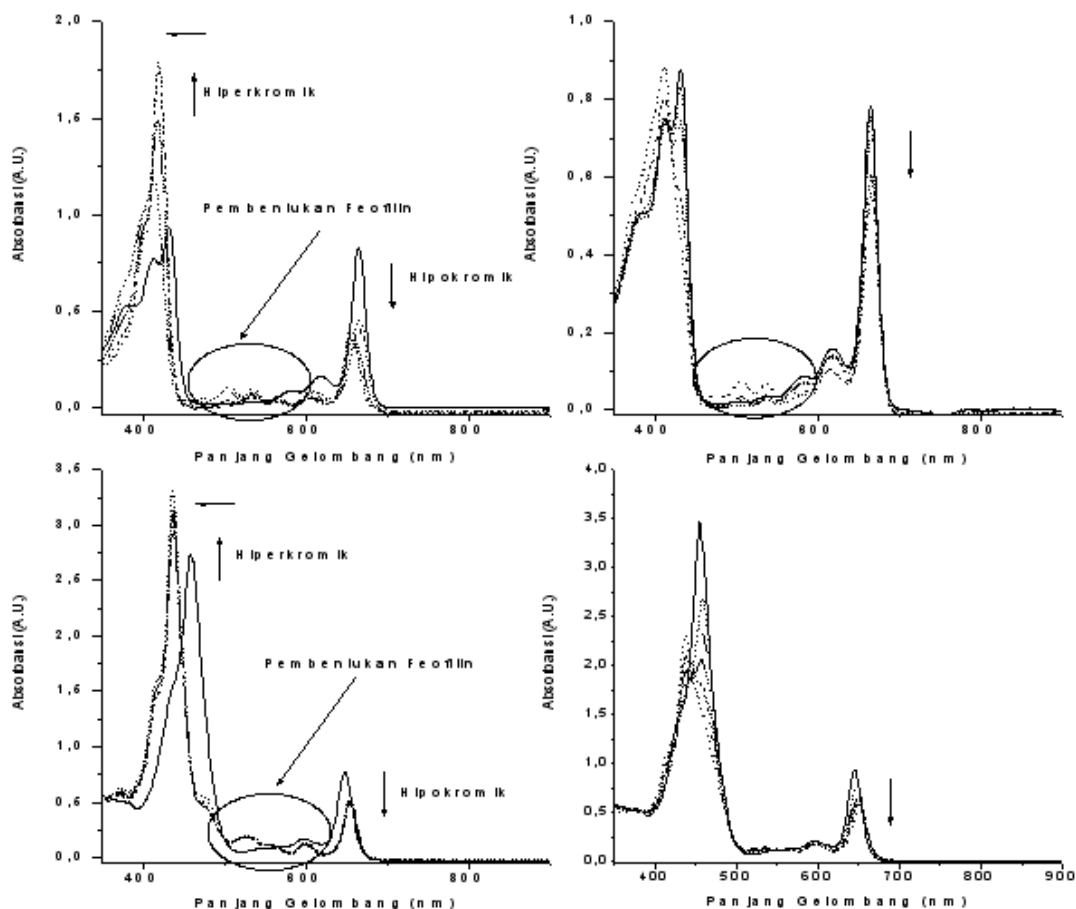
Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisa menggunakan program Matlab 6.5 dan Origin 6.1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh asam terhadap proses feofitinisasi

Kehadiran asam dapat mempengaruhi proses feofitinisasi pada klorofil. Feofitinisasi merupakan proses pembentukan feofitin yang merupakan salah satu produk degradasi dari klorofil yang kehilangan logam Mg pada cincin makrosiklik [2]. Selama proses feofitinisasi, jenis dan jumlah asam yang ditambahkan memberikan pengaruh terhadap perubahan pola spektrum dari klorofil (Gambar 2).

Gambar 2 menunjukkan bahwa penambahan jenis asam yang berbeda berpengaruh pada proses feofitinisasi. HCl merupakan asam kuat sehingga dapat terionisasi sempurna menjadi  $\text{H}^+$  dan  $\text{Cl}^-$ , sedangkan asam asetat merupakan asam lemah yang derajat ionisasinya kurang dari 1 dan mempunyai nilai  $\text{pK}_a$  kecil. Proses feofitinisasi lebih cepat terjadi dengan menggunakan asam kuat. Realita tersebut terjadi karena asam kuat lebih cepat dan lebih mudah menarik logam magnesium dibandingkan asam lemah. Terbentuknya feofitin dapat dilihat dari pola spektra yang dihasilkan. Feofitin mempunyai serapan pada wilayah sekitar 409,5; 474,7; 506,3; 534,7; 608,9 dan 665 nm, masing-masing pada bagian solet, daerah Qx



**Gambar 2.** Proses feofitinisasi pada klorofil *a* (atas) dan klorofil *b* (bawah) dengan menggunakan HCl (kanan) dan asam asetat (kiri) pada penambahan volume asam (—) 0,05 mL; (---) 0,1 mL; (- - -) 0,2 mL; (- · -) 0,3 mL; (- · ·) 0,4 mL; dan (- · · ·) 0,5 mL

dan Qy [2, 15]. Dalam pelarut aseton, klorofil *b* mempunyai serapan 370,3; 434,5; 527,7; 599,9 dan 653,5 nm [15]. Pembentukan feofitin tersebut terlihat jelas dengan penambahan asam kuat (HCl) (Tabel 1).

Tabel 1 menunjukkan panjang gelombang maksimum pada setiap pita ketika dititrasi dengan asam. Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat bahwa feofitin sudah dapat terbentuk dengan penambahan 0,05 mL HCl, baik pada klorofil *a* maupun *b*. Pada titrasi dengan asam asetat, feofitin baru terbentuk setelah dititrasi sebanyak 0,3 mL untuk klorofil *a* dan 0,4 mL untuk klorofil *b*. Kenyataan tersebut menunjukkan bahwa klorofil *a* lebih tidak stabil atau mudah mengalami degradasi dibanding dengan klorofil *b* [2].

Penambahan HCl menyebabkan pergeseran hipsokromik sebesar 18-24 nm, sedangkan pada penambahan asam lemah (asam asetat) pergeserannya tidak terlihat nyata. Pergeseran dan perbedaan intensitas dari pola spektra yang terbentuk selama feofitinisasi klorofil *a* dan *b* antara penambahan asam kuat dan asam lemah (HCl dan asam asetat)

dipengaruhi oleh jenis gugus fungsional yang terkandung pada masing-masing asam tersebut. Gugus -Cl merupakan gugus yang bersifat *auxokrom* artinya gugus jenuh yang dapat mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum apabila berikatan dengan kromofor. Disamping itu, pergeseran dan perubahan intensitas dari spektra pada proses feofitinisasi juga dipengaruhi oleh pelarut serta reaksi terbentuknya senyawa lain (feofitin).

Pigmen klorofil yang dititrasi dengan HCl menunjukkan terjadinya kenaikan absorbansi (hiperkromik) pada pita sorot baik pada klorofil *a* maupun *b*. Titrasi dengan HCl sebesar 0,2 mL sudah dapat menyebabkan kenaikan absorbansi sorot sebesar 50%. Semakin besar volume HCl yang ditambahkan pada larutan klorofil, maka semakin besar pula kenaikan absorbansi. Namun, pada pita Qy dan Qx akan terjadi penurunan absorbansi (hipokromik) seiring dengan peningkatan volume HCl. Selain itu, akan terjadi pergeseran hipsokromik pada pita sorot, Q<sub>x</sub> maupun Q<sub>y</sub>.

**Tabel 1.** Panjang gelombang maksimum pada tiap pita ketika dititrasi dengan asam

	Asam	Awal	Titrasi						
			0,05 mL	0,1 mL	0,2 mL	0,3 mL	0,4 mL	0,5 mL	
Klorofil <i>a</i>	HCl	664.0	666.1	665.0	657.0	655.0	655.0	655.0	
		618.0	608.0	607.0	606.1	603.0	603.0	603.0	
		431.0	535.9	535.9	565.0	565.9	565.9	565.9	
		412.0	506.0	506.0	535.0	532.0	531.0	531.0	
			412.9	414.0	417.0	419.0	419.0	419.0	
			664.0	664.0	664.0	665.0	665.0	665.0	666.0
	Asam Asetat	616.9	616.9	618.0	616.9	615.0	612.1	610.0	
		431.0	431.0	431.0	431.0	536.9	536.0	536.0	
		413.0	412.0	412.0	412.0	505.1	507.0	507.0	
						411.0	409.9	409.9	
			647.0	654.0	654.0	654.0	654.0	654.0	654.0
			597.1	599.0	599.0	599.0	599.0	599.0	599.0
Klorofil <i>b</i>	HCl	458.0	526.0	526.0	525.0	524.1	524.1	524.1	
			435.0	436.1	436.1	436.1	436.1	436.1	
			371.0	371.0	371.0	371.0	371.0	371.0	
			647.0	647.0	647.0	649.0	650.0	651.0	652.0
			597.1	598.0	598.0	598.0	599.0	599.0	599.0
			458.0	458.0	458.0	459.0	459.0	529.0	529.0
	Asam Asetat						371.0	371.0	

### Pengaruh agregasi terhadap proses Feofitinisasi

Proses agregasi klorofil dapat menyebabkan perubahan spektra [16]. Perubahan tersebut terlihat dari spektrum klorofil yang akan mengalami pergeseran batokromik pada semua pita [17], dan menghasilkan pita tambahan pada panjang gelombang 970-975 nm yang akan mengalami kenaikan absorbansi (hiperkromik). Hasil agregasi tersebut kemudian dilakukan proses deagregasi dengan menambah asam pada tiap konsentrasi air. Penambahan asam tersebut menyebabkan klorofil yang teragregasi membentuk turunannya berupa feofitin. Penambahan asam kuat dan lemah sangat berpengaruh terhadap proses feofitinisasi.

Klorofil yang teragregasi dapat terfeofitinisasi setelah ditambah dengan asam (Gambar 3) Proses feofitinisasi tampak nyata pada klorofil yang ditambah dengan air sebesar 0,5 mL, pita sorot akan mengalami kenaikan absorbansi dan pergeseran hipsokromik serta terdapat puncak baru di daerah sorot, kecuali pada klorofil *b* dalam metanol. Namun, pada klorofil yang teragregasi dengan penambahan air lebih dari 1 mL ciri dari proses feofitinisasi kurang tampak.

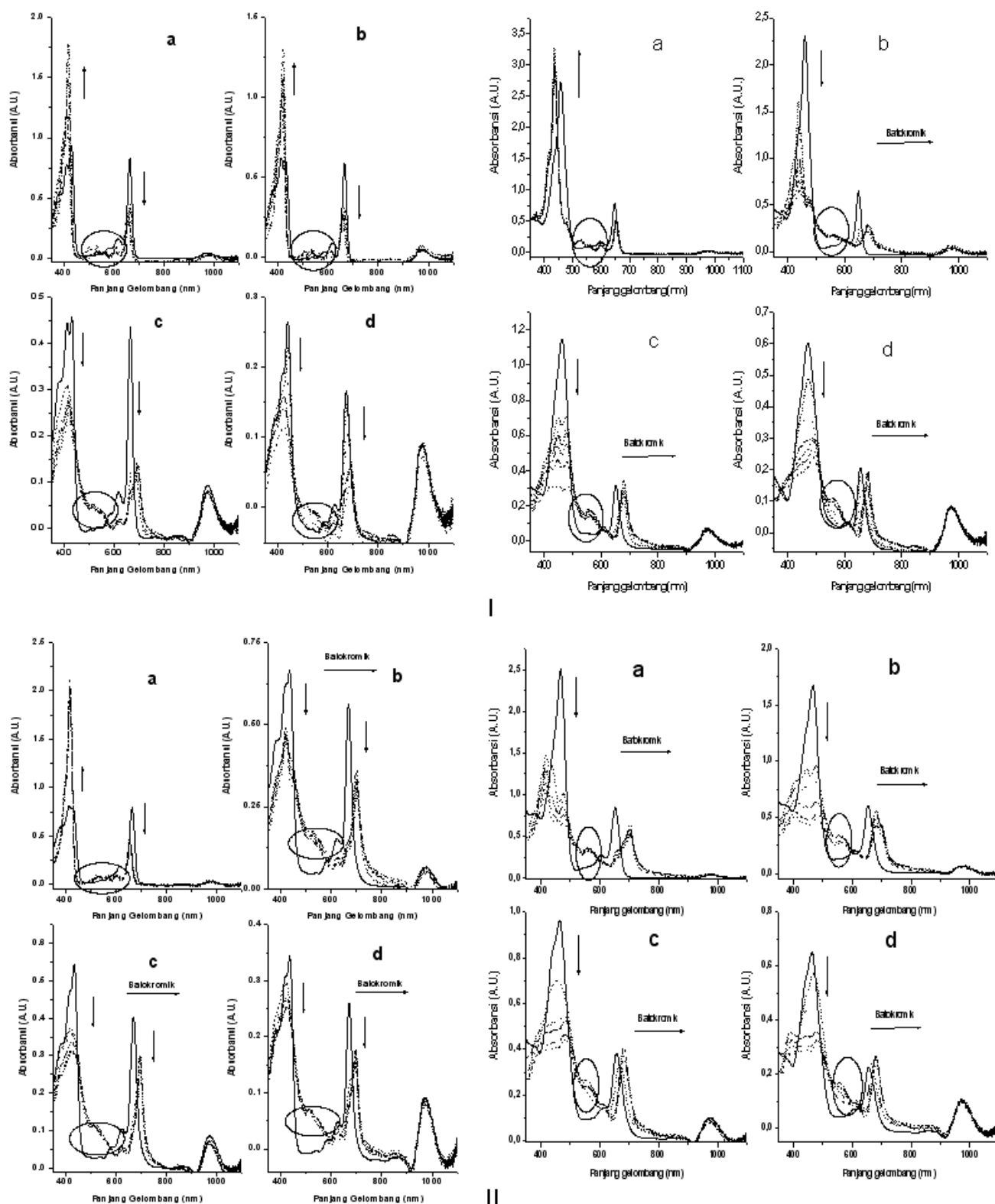
Air adalah nukleofil yang sangat unik bagi klorofil karena tidak hanya dapat berfungsi sebagai donor elektron, tapi juga menghasilkan ikatan hidrogen [18]. Molekul H<sub>2</sub>O bersifat polar dan merupakan pelarut yang sangat baik untuk molekul polar. Kenyataan tersebut dapat terjadi karena H<sub>2</sub>O memiliki kemampuan untuk menurunkan gaya elektrostatis dan melemahkan ikatan hidrogen antara molekul-molekul polar. Dalam kondisi ini air berperan sebagai donor hidrogen dan molekul lain

sebagai akseptor [19]. Katz dkk mengajukan model agregat klorofil dan air sebagai ikatan C=O---O-H-O---Mg, dimana gugus C=O pada cincin ke V suatu molekul klorofil membentuk ikatan koordinasi dengan Mg pada klorofil tetangganya dengan adanya ligan H<sub>2</sub>O [20]. Dengan demikian, semakin banyak air yang ditambahkan maka akan semakin besar pula agregat klorofil yang dihasilkan.

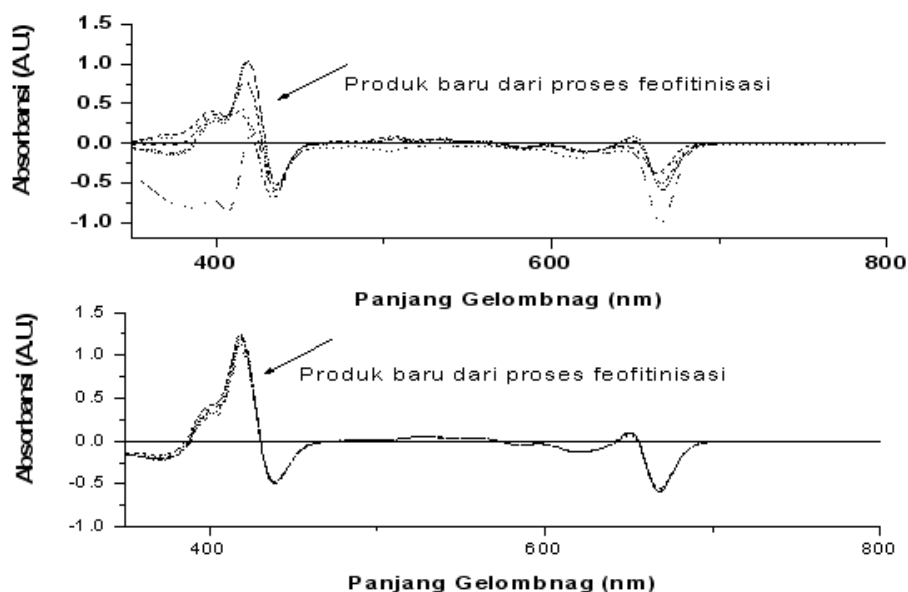
Kehadiran asam dapat menarik inti logam klorofil. Namun, karena inti logam Mg pada klorofil telah berikatan dengan air, maka akan mempersulit pengkelatan asam terhadap Mg. Reaksi agregat klorofil dengan asam identik dengan alkilasi Friedel Craft. Pada reaksi Friedel Craft, asam bersifat elektrofilik karena asam sebagai penarik elektron. Dengan adanya penarik elektron mengakibatkan cincin makrosiklik kekurangan elektron, yang berakibat asam sebagai elektrofilik akan susah menyerang. Jadi, proses feofitinisasi akan terhambat jika klorofil membentuk agregat yang besar dengan air. Selain itu teori dalam model eksiton juga menyatakan bahwa pada elektron terluar  $\pi$  elektron akan dapat bergerak lebih luas atau lebih lama apabila terbentuk agregat. Kenyataan tersebut menyebabkan bentuk agregat lebih stabil dibandingkan bentuk monomer.

### Pengaruh pelarut agregat klorofil *a* dan *b* dalam deagregasi

Jenis pelarut mempunyai kontribusi yang nyata terhadap proses degradasi klorofil menjadi feofitin. Kestabilan klorofil didalam pelarut metanol lebih rendah



**Gambar 3.** Proses feofitinisasi pada klorofil a (kiri) dan klorofil b (kanan) dalam pelarut aseton (I) dan metanol (II) yang berasal dari proses agregasi dengan penambahan air (a) 0,5 mL; (b) 1 mL; (c) 1,5 mL; dan (d) 2 mL, dititrasi dengan (—) 0,05 mL; (---) 0,1 mL; (- · - ·) 0,2 mL; (— · —) 0,3 mL; (— · —) 0,4 mL; dan (·····) 0,5 mL HCl



**Gambar 4.** Produk pembentukan feofitinisasi dari klorofil *a* yang telah ditambah air 0,5 mL dan penambahan (— · · ·) 0,05 mL; (— · —) 0,1 mL; (— · — ·) 0,2 mL; (— · · · ·) 0,3 mL; (— · · · · ·) 0,4 mL; dan (— · · · · · ·) 0,5 mL HCl dalam pelarut aseton (atas) dan metanol (bawah)

daripada klorofil yang dilarutkan dalam aseton [15]. Pernyataan tersebut juga didukung oleh Watanabe dan Kobayashi serta Fiedor bahwa klorofil yang terlarut dalam metanol mempunyai nilai potensial oksidasi yang lebih rendah dibandingkan dengan larutan klorofil dalam aseton, sehingga proses degradasi klorofil dalam pelarut metanol menjadi lebih besar [21-22].

Berdasarkan Gambar 4 tampak bahwa pembentukan produk baru dari proses feofitinisasi lebih cepat berlangsung dalam pelarut metanol dibandingkan aseton. Dalam pelarut metanol produk baru yang berupa feofitin tersebut langsung terbentuk pada penambahan HCl 0,05 mL, sedangkan dalam aseton baru terbentuk pada penambahan 0,1 mL HCl.

## KESIMPULAN

Proses feofitinasasi lebih cepat terjadi dengan menggunakan asam kuat (HCl) pada pelarut metanol yang kandungan airnya sedikit. Pembentukan feofitin ditandai dengan pembentukan pita di wilayah sekitar 409,5; 474,7; 506,3; 534,7; 608,9 dan 665 nm, masing-masing pada bagian sores,  $Q_x$  dan  $Q_y$ .

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana penelitian yang diperoleh Lia Kusmita dari Program Beasiswa Unggulan Insan Indonesia Cerdas Departemen Pendidikan Nasional (Depdiknas) dan dana penelitian yang diperoleh Leenawaty Limantara dari Alexander von Humboldt, Jerman.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Jackson, A.H., 1976, *Structure, Properties, and Distribution of Chlorophyll*, in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol.1, T. W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, 1-63.
2. Gross, J., 1991, *Pigments in Vegetables*, Van Nostrand Reinhold, New York.
3. Harttig, U. and Bailey, G. S., 1998, *Carcinogenesis vol. 19*, Oxford University Press.
4. Cho, Y-S., Hong, S-T., Choi, K.H., Chang, Y-H., and Chung, A-S., 2000, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 1.
5. Donalson, M.S., 2004, *Nutrition Journal*, Biomed Central Ltd.
6. Figge, F.H.J., 1948, *Proc. Soc. Exp. Biol & Med*, **68**, 640.
7. Limantara, L., 2004, *Menambang Klorofil, Si Emas Hijau*, Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Sains dan Matematika dalam Industri, FSM-UKSW.
8. Rahayu, P. and Limantara, L., 2005, *Studi Lapangan Kandungan Klorofil In Vivo Beberapa Spesies Tumbuhan Hijau di Salatiga dan Sekitarnya*, Prosiding Seminar Nasional MIPA, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.
9. Limantara, L., Koehler, P., Wilhelm, B., Porra, R.J., and Scheer, H., 2006, *Photochemistry and Photobiology*, **82**, 770-780.
10. Brandis, A.S., Salomon, Y., and Scherz, A., 2006, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, **25**, 485-494.
11. Ziegler, J., 1995, *J. Natl. Cancer Int.*, **87** (1).

12. Nakamura T., *et al.*, 1996, *Fisheries Science*, **62** (6), 923-926.
13. Okai Kiyoka, H., Otani, S., and Okai, Y., 1998, *Food Chemistry*, **129**, 223-228.
14. Chermomorsky, S., Segelman, A., and Porets, R.D., 1999, *Teratog Carcinog Mutagen*, **19** (5), 313-322.
15. Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., and Wright, S.W., 1997, *Escon. Bot.*, UNESCO Publishing, Paris Kephart, J., 9, 3-38.
16. Kusmita, L. and Limantara, L. 2007, *Pengaruh Agregasi pada Spektra Klorofil a dan b*, Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami - Seminar Nasional Pigmen 2007, Salatiga, 24 Agustus 2007, 117-126, ISSN: 979-978-89-2.
17. Katz, J.J., Bowman, M.K., Michalski, T.J., and Worcester, D.L., 1991, *Chlorophylls*, CRC Press, London.
18. Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M., and Janson, T.R., 1978, *The Porphyrins*, 5, Physical Chemistry, Part C, Academic Press, New York.
19. Stryer, L., 1988, *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed, W. H. Freeman and Company, New York.
20. Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M., and Janson, T.R., 1978, *The Porphyrins*, 5, Physical Chemistry, Part C, David Dolphi (Ed.), Academic Press.
21. Watanabe, T. and Kobayashi, M., 1991, *Electrochemistry of Chlorophylls*, in *Chlorophylls*, H. Scheer (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 287-315.
22. Fiedor, J., Fiedor, L., Kammhuber, N., Scherz, A., and Scheer, H., 2002, *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76 (2), 145-152.