



Isolasi, Fabrikasi dan Penentuan Ukuran Nanopartikel Steroid (StrNPs) Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dengan Metoda *Dynamic Light Scattering*

Shelly Wiarsih^a, Dewi Kusriani^a, Pratama Jujur Wibawa^{a,*}

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: pratamajw@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: red ginger, <i>Alpinia purpurata</i>, steroids, steroid nanoparticles.</p>	<p>Research on steroid of red ginger (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) and the fabrication of steroid nanoparticles (StrNPs) has been done. The aim of this research is to isolate steroids from red ginger (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) tissue and then fabricate the isolated steroid to become StrNPs. The associated steroid was isolated as <i>n</i>-hexane fraction through the subsequently works such as maceration, extraction, and column chromatography. While the StrNPs were fabricated by colloidal method under ultrasonic agitation of 40 kHz, 2×50 watt for 10 minute. The molecular structure of the isolated steroid was elucidated based on the molecular structure data base similarity index that generated by <i>gas chromatography-mass spectrometer</i> (GC-MS). The size of the fabricated StrNPs was determined by <i>dynamic light scattering</i> (DLS) method using particle size analyser (PSA) machine. The results show that the isolated steroid can be classified as progesterone group and the particle size of the fabricated StrNPs are about 95,0 ± 12,2 nm for the first group and 670,2 ± 141,1 nm for StrNPs of the second group.</p>
<p>Kata kunci: lengkuas merah, <i>Alpinia purpurata</i>, steroid, nanopartikel steroid.</p>	<p>Abstrak</p> <p>Telah dilakukan penelitian mengenai steroid dari rimpang lengkuas merah (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) dan pabrikasi nanopartikelnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat steroid dari rimpang lengkuas merah (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) dan memperoleh nanopartikel steroid dari hasil isolasi. Senyawa steroid diisolasi dari fraksi <i>n</i>-heksana dengan maserasi, ekstraksi, dan kromatografi kolom. Nanopartikel steroid difabrikasi dengan ultrasonikasi. Struktur molekul steroid diidentifikasi dengan <i>gas chromatography-mass spectrometer</i> (GC-MS). Ukuran nanopartikel steroid dikarakterisasi dengan metoda <i>dynamic light scattering</i> (DLS) menggunakan alat <i>particle size analyzer</i> (PSA). Hasil menunjukkan bahwa isolat steroid mengandung senyawa golongan progesteron. Ukuran rata-rata nanopartikel steroid secara statistik adalah 95,0 ± 12,2 nm untuk nanopartikel steroid (StrNPs) kelompok I dan 670,2 ± 141,1 nm untuk StrNPs kelompok II.</p>

1. Pendahuluan

Rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) merupakan keluarga tanaman *Zingiberaceae* yang secara tradisional luas digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti sakit kepala, rematik, sakit

tenggorokan, dan penyakit ginjal [1, 2]. Selain itu, beberapa penelitian melaporkan bahwa rimpang lengkuas merah juga menunjukkan bioaktivitas sebagai antimikroba [3], antioksidan, antikanker [4] dan antibakteri terutama bakteri *Mycobacterium tuberculosis* penyebab penyakit tuberkulosis (TBC) [5]. Fenomena ini

menarik perhatian para peneliti untuk melakukan penelitian yang lebih mendalam untuk menemukan jenis senyawa kimia, terutama metabolit sekunder yang terdapat di dalam rimpang lengkuas merah. Salah satu penelitian ini melaporkan bahwa rimpang lengkuas merah diketahui mengandung steroid, flavonoid, alkaloid, fenol, tanin, karbohidrat, protein, glikosida, resin, tiol, saponin, dan gula pereduksi [6]. Namun demikian, penelitian-penelitian yang khusus dan fokus untuk mengeksplorasi steroid saja dalam lengkuas merah, dalam pengertian tidak hanya isolasi dan karakterisasi tetapi juga pembentukan nanopartikelnya, masih sangat sedikit yang melakukan. Hal ini ditunjukkan dengan publikasi tentang steroid rimpang lengkuas merah yang masih sangat sulit ditemukan, baik yang berupa jurnal, *proceeding* seminar, maupun buku.

Di pihak lain, penelitian-penelitian mengenai nanopartikel berkembang begitu pesat dan merambah keberbagai disiplin ilmu pengetahuan. Hal ini terkait dengan salah satu sifat unggul nanopartikel yang tidak dimiliki oleh jenis material yang lain, yaitu rasio luas permukaan terhadap volumenya yang jauh lebih besar dibanding material-material lain pada keadaan normalnya. Situasi ini mengakibatkan sifat-sifat nanopartikel menjadi lebih ditentukan oleh sifat-sifat permukaan dibanding oleh komposisinya. Sifat-sifat permukaan ini memainkan peran yang sangat penting bagi perjalanan suatu obat menuju reseptor atau massa target di dalam sel [7]. Permukaan yang luas akan meningkatkan gaya-gaya adhesi yang dapat mempercepat pelarutan dan mempermudah masuknya sebuah nanopartikel ke dalam membran sel disamping memberikan efek titik kuantum (*quantum dot effect*) yang baik [7, 8]. Fenomena ini dibuktikan oleh Basniwal *dkk.* [9] yang mencatat bahwa sifat antibakteri kurkumin terhadap *B. subtilis* meningkat sekitar 33% setelah dalam bentuk nanopartikelnya (KurNPs) [9]. Fakta ini menginspirasi untuk tidak saja mengisolasi dan mengkarakterisasi steroid lengkuas merah tetapi juga membuat nanopartikel steroid (StrNPs). Selanjutnya, paper ini melaporkan cara isolasi, karakterisasi dan cara membuat nanopartikel steroid (StrNPs) rimpang lengkuas merah.

2. Metode Penelitian

Bahan

Rimpang lengkuas merah lokal Semarang, Jawa Tengah, etanol 96% teknis, akuades, metanol teknis, *n*-heksana teknis, kloroform teknis, pereaksi Liebermann-Burchard, kloroform p.a., *n*-heksana p.a., etil asetat p.a., silika gel 60 G, plat KLT, plat KLT preparatif, aqua bides dan *virgin coconut oil* (VCO) komersial lokal. Bahan-bahan kimia ini diproduksi oleh Merck, Jerman dan digunakan sesuai aslinya tanpa perlakuan lebih lanjut.

Alat

Alat gelas standar penelitian, lampu UV 254 nm dan 365 nm, satu set alat maserasi dan *rotary evaporator Buchii*, neraca analitik, botol vial, kolom kromatografi, *chamber* KLT, *melting point*, pipa kapiler, GCMS-QP2010S

Shimadzu, KRISBOW *Ultrasonic Cleaner*, dan HORIBA *Scientific particle size analyzer*.

Persiapan Bahan dan Skrining Fitokimia

Sampel rimpang lengkuas merah sebanyak 20 kg dibersihkan dengan air, dikeringkan pada temperatur kamar, dan dihaluskan hingga menjadi serbuk. Setelah itu dilakukan skrining fitokimia yang meliputi uji steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, dan kuinon berdasarkan metoda yang dilaporkan oleh Subramanian [6].

Isolasi steroid dan elusidasi struktur

Serbuk lengkuas merah sebanyak 2 kg dimaserasi dengan etanol 96% selama 24 jam kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental dilarutkan kedalam metanol dan difraksinasi menggunakan eluen *n*-heksana. Ekstrak ini kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental *n*-heksana. Terhadap ekstrak *n*-heksana ini dilakukan uji steroid, Sementara itu untuk mendapatkan steroid murni dilakukan kromatografi kolom gravitasi terhadap ekstrak kental *n*-heksana. Fraksi-fraksi yang didapatkan dari proses kromatografi ini kemudian dilakukan KLT dan fraksi dengan pola nada yang sama digabungkan menjadi satu fraksi. Fraksi yang mengandung steroid dipisahkan dengan KLT preparatif, nada yang terlihat dominan dikerok, dilarutkan dengan kloroform, dan diuapkan hingga diperoleh isolat steroid. Isolat steroid diuji kemurnian dengan KLT dua dimensi menggunakan berbagai eluen dan ditentukan titik lelehnya menggunakan *melting point tester*.

Selanjutnya elusidasi struktur steroid dilakukan menggunakan GCMS-QP2010S Shimadzu (kolom AGILENT HP 1MS, panjang 30 m, internal diameter 0,25 mm, gas pembawa helium). GC-MS dioperasikan pada kondisi temperatur injektor 310°C, tekanan 13,7 kPa, aliran total gas pembawa 12,9 mL/menit, temperatur kolom terprogram 200°C selama 5 menit kemudian dinaikkan temperaturnya dengan laju 5°C/menit hingga 300°C. Puncak-puncak kromatogram yang dihasilkan dengan intensitas puncak yang relatif tinggi dilakukan analisis fragmentasi massa dan fragmen-fragmen massa yang dihasilkan dengan kelimpahan lebih dari 25% diambil sebagai dasar penentuan struktur molekul steroid melalui pendekatan basis data indek kemiripan struktur (*molecular structure similarity index*) lebih dari 85%.

Fabrikasi dan karakterisasi nanopartikel steroid (StrNPs)

Fabrikasi StrNPs dapat dilakukan sebagai berikut, kristal isolat steroid sebanyak 10 mg dicampurkan kedalam 10 mL larutan aquabides/VCO perbandingan volum 9:1 kemudian diultrasonikasi menggunakan KRISBOW *Ultrasonic Cleaner* (frekwensi gelombang ultrasonik 40 kHz, daya 2×50 watt) selama 10 menit. Ukuran partikel StrNPs ditentukan berdasarkan metoda *dynamic light scattering* (DLS) menggunakan Horiba *Scientific particle size analyzer* buatan USA.

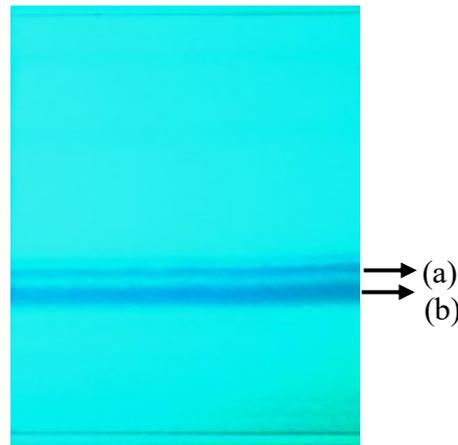
3. Hasil dan Pembahasan

Sekrining fitokimia dan isolasi steroid

Hasil sekrining fitokimia terhadap serbuk lengkuas merah memastikan bahwa beberapa jenis senyawa metabolit sekunder berikut ini positif terdapat didalam lengkuas merah, steroid/triterpenoid, saponin, flavonoid, alkaloid, tanin, dan kuinon. Selanjutnya hasil isolasi steroid dari sejumlah rimpang lengkuas merah tersebut di atas diperoleh ekstrak kental etanol sebanyak 78,98 gram dengan rendemen sebesar 3,95 %. Setelah dilakukan proses fraksinasi terhadap ekstrak etanol ini dengan *n*-heksana dihasilkan ekstrak kental sebanyak 9,88 gram yang positif mengandung senyawa steroid.

Proses pemurnian steroid yang dilakukan dengan KLT memberikan hasil terbaik ketika menggunakan eluen *n*-heksana/kloroform (4:6) yang diterapkan pada kromatografi kolom gravitasi. Pemisahan ekstrak *n*-heksana menghasilkan 220 fraksi yang dikelompokkan ke dalam 8 fraksi besar (A, B, C, D, E, F, G, dan H). Fraksi besar E, F, G, dan H positif terhadap steroid dan digabungkan sebagai fraksi S. Selanjutnya fraksi S dipisahkan dengan KLT preparatif menggunakan eluen *n*-heksana/kloroform (4:6) Dari pemisahan ini dihasilkan tiga pita dominan, yaitu pita S₁ dengan R_f 0,42 (pada λ 365 nm), pita S₂ dengan R_f 0,50, dan S₃ dengan R_f 0,62 (pada λ 254 nm). Pita S₂ kemudian dipisahkan dengan eluen *n*-heksana/kloroform (3:7) dan dihasilkan pita S_{2a} dengan R_f 0,37 dan pita S_{2b} dengan R_f 0,42 pada λ 254 nm. Pita S_{2a} kemudian dipisahkan dengan eluen *n*-heksana/kloroform (4:6) kembali dan dihasilkan pita S_{2a1} dengan R_f 0,43 dan pita S_{2a2} dengan R_f 0,53 yang dapat dilihat pada gambar 1.

Proses KLT lebih lanjut yang meliputi KLT dua dimensi terhadap pita S_{2a1} ini menghasilkan noda tunggal, dan steroid yang diperoleh memiliki titik leleh sebesar 218-220°C.

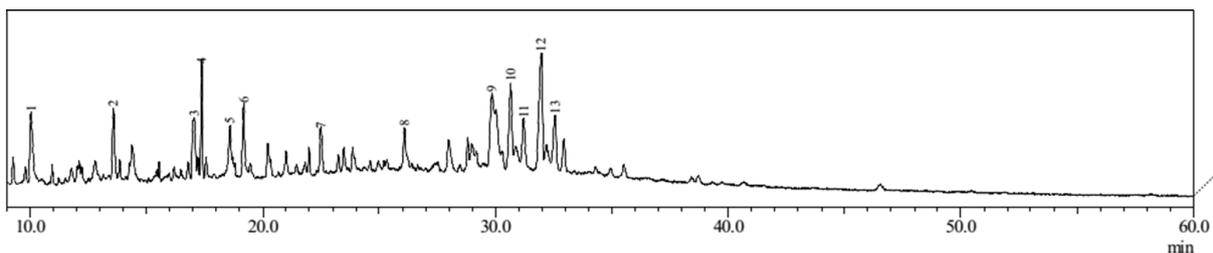


Gambar 1: Pita noda pemisahan steroid (a) fraksi S_{2a2}, (b) fraksi S_{2a1}

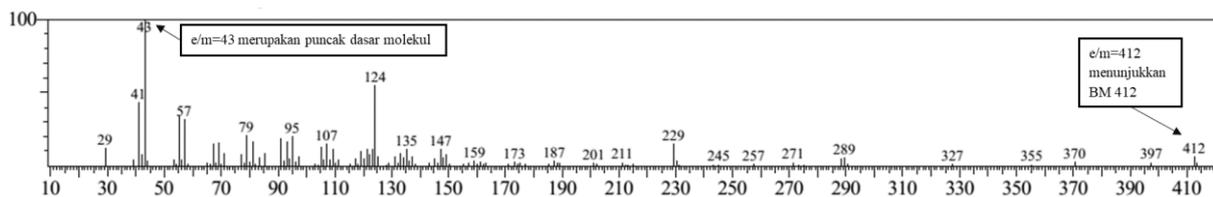
Elusidasi struktur steroid

Kromatogram hasil analisis isolat steroid pita S_{2a1} yang dilakukan dengan GC ditampilkan pada gambar 2. Gambar ini memperlihatkan 13 puncak yang merepresentasikan terdapat 13 jenis senyawa di dalam isolat S_{2a1}.

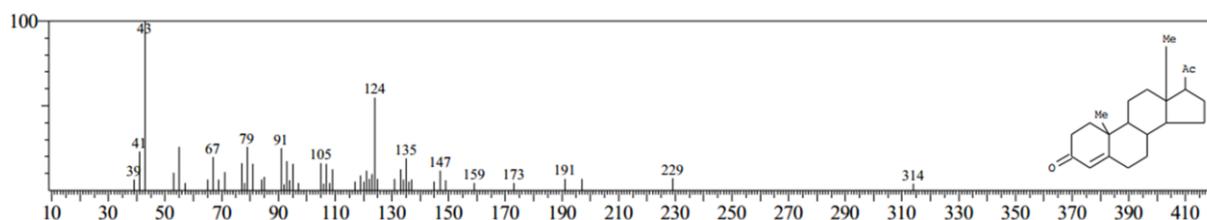
Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat steroid S_{2a1} sesungguhnya belum merupakan senyawa murni untuk tingkat kualitas analisis GC meskipun sudah merupakan senyawa tunggal untuk tingkat kualitas analisis KLT dua dimensi. Dari 13 senyawa ini selanjutnya dipilih satu senyawa yang memberikan intensitas puncak tertinggi, yaitu puncak ke-12 untuk difragmentasi lebih lanjut guna mengetahui struktur molekul senyawa yang memberikan puncak ke-12 ini. Hasil fragmentasi massa senyawa puncak ke-12 ini ditampilkan pada gambar 3.



Gambar 2: Kromatogram GC isolat steroid S_{2a1}



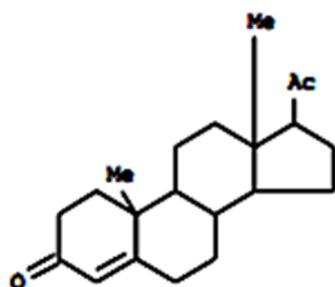
Gambar 3: Fragmentogram massa molekul puncak ke-12 kromatogram isolat S_{2a1}



Gambar 4: Spektogram pola fragmentasi massa senyawa/molekul basis data yang paling mendekati pola fragmentasi massa senyawa puncak ke-12 isolat S_{2a1} yang ditampilkan pada gambar 3 dengan indeks kemiripan 87%.

Terlihat pada gambar 3 bahwa senyawa/molekul yang memberikan puncak ke-12 itu memiliki berat molekul (BM) sekitar 412 gram/mol sebagaimana yang direpresentasikan oleh rasio massa/muatan (m/e) = 412. Disamping itu, molekul ini juga memberikan fragmen massa yang paling stabil yang merupakan puncak dasar (base peak) dengan $m/e=43$. Berdasarkan BM dan puncak dasar ini selanjutnya struktur molekul senyawa tersebut ditentukan melalui matching basis data indeks kemiripan molekul > 85%, yang hasilnya ditampilkan pada gambar 4.

Terlihat pada gambar 4 bahwa senyawa yang terdapat didalam isolate S_{2a1} dan memberikan puncak ke-12 pada analisis GC adalah mirip dengan senyawa pregn-4-ena-3,20-dion yang memiliki struktur molekul seperti yang terlihat pada gambar 4 itu (direproduksi kembali dan ditampilkan pada gambar 5), yang termasuk golongan steroid khususnya progesteron.

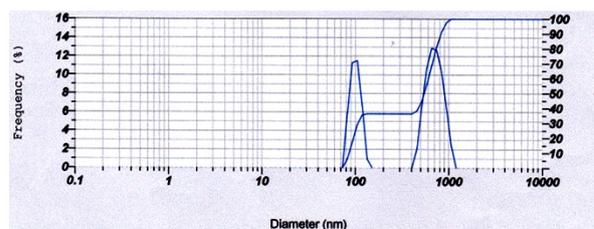
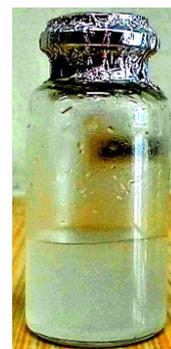


Gambar 5: Struktur molekul steroid yang paling mendekati steroid yang terdapat di dalam isolate S_{2a1} dan memberikan puncak ke-12 pada analisis GC

Fabrikasi dan karakterisasi nanopartikel steroid (StrNPs)

Hasil fabrikasi StrNPs adalah berupa koloid steroid di dalam media air/VCO berwarna putih susu seperti yang ditampilkan pada gambar 6a. Sedangkan grafik hasil penentuan ukuran partikel StrNPs menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) ditampilkan pada gambar 6b dan analisis statistik ukuran rata-rata partikel ditampilkan pada tabel gambar 6c. Gambar 6b menunjukkan bahwa koloid StrNPs tersusun oleh dua kelompok partikel steroid yang berukuran diameter rata-rata kurang dari 100 nm dan satunya lagi kurang dari 1000 nm (1 μ m). Perhitungan secara statistik menggunakan *Horiba scientific PSA software* menemukan bahwa ukuran diameter rata-rata kelompok partikel StrNPs yang pertama adalah 95,0 nm dengan standar deviasi (SD) sebesar 12,2 nm. Ini berarti ukuran partikel StrNPs dalam kelompok I berkisar dari 82,8 nm hingga

107,2 nm ($95,0 \pm 12,2$ nm) sebagaimana yang ditunjukkan pada tabel 1.



Gambar 6: Hasil fabrikasi StrNPs (a) berupa koloid steroid di dalam media air/VCO yang berwarna putih susu, (b) grafik hasil penentuan ukuran StrNPs menggunakan PSA

Tabel 1. Tabel hasil perhitungan ukuran rata-rata statistik partikel StrNPs

Peak No.	S.P Area Ratio	Mean	S.D	Mode
1	0,36	95,0 nm	12,2 nm	96,5 nm
2	0,64	670,2 nm	141,1 nm	622,6 nm

Lebih lanjut kurva integrasi pada gambar 6b menunjukkan bahwa sekitar 40% dari jumlah partikel StrNPs yang terdapat pada kelompok I berukuran dibawah rata-rata (*mean*) keseluruhan partikel 95,0 nm. Sementara tabel gambar 6c (kolom *mode*) lebih lanjut menunjukkan bahwa partikel StrNPs yang berukuran 96,5 nm adalah partikel yang paling sering terdeteksi oleh detektor PSA. Hal yang sangat kontras diperlihatkan oleh partikel-partikel StrNPs yang tergabung kedalam kelompok II (lihat gambar 6b dan tabel gambar 6c) dimana rata-rata diameternya berukuran 670,2 nm dengan SD sebesar 141,1 nm. Ini sebuah ukuran yang cukup besar untuk skala nanopartikel. Kisaran ukuran partikel StrNPs dalam kelompok II ini adalah dari 529,1 nm hingga 811,3 nm ($670,2 \pm 141,1$ nm). Kurva integrasi pada gambar 6b untuk partikel-partikel kelompok II menunjukkan bahwa sekitar 80 % jumlah partikel tersebut berukuran lebih kecil dari 670,2 nm. Dapat pula

ditambahkan bahwa partikel-partikel dalam kelompok II yang berukuran 622,6 nm merupakan partikel yang paling sering terdeteksi oleh detektor PSA (lihat tabel gambar 6c kolom *mode*).

Fakta-fakta ini menunjukkan bahwa nanopartikel steroid (StrNPs) terbukti dapat terbentuk melalui sistem dispersi koloidal menggunakan media air/VCO (rasio volum 9:1) dibawah pengaruh gelombang ultrasonik.

4. Kesimpulan

Berdasarkan uraian tersebut di atas, dapat disimpulkan bahwa steroid yang diisolasi dari rimpang lengkuas merah dapat dibuat menjadi nanopartikel steroid (StrNPs) berukuran $95,0 \pm 12,2$ nm untuk kelompok I dan $670,2 \pm 141,1$ nm untuk kelompok II. Lebih lanjut dapat disimpulkan bahwa tujuan penelitian ini secara keseluruhan berhasil dicapai dengan baik.

5. Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Bapak Hari, teknisi alat *particle size analyzer* (PSA) Laboratorium Fisika Farmasi Universitas Islam Indonesia (UII) Yogyakarta yang telah mengerjakan analisis sampel StrNPs.

6. Daftar Pustaka

- [1] Nurliani Bermawie, Susi Purwiyanti, Melati Melati, Nurlaila Wahyuni Meilawati, Karakter morfologi, hasil, dan mutu enam genotip lengkuas pada tiga agroekologi, Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, 23, 2, (2016) 125-135 <http://dx.doi.org/10.21082/bullitro.v23n2.2012.%25p>
- [2] Narayan Das Prajapathi, S. S. Purohit, Arun K. Sharma, Tarun Kumar, A handbook of medicinal plants: A complete source book, Agrobios, India, 2003.
- [3] KP Kochuthressia, S John Britto, MO Jaseentha, L Joelri Michael Raj, SR Senthilkumar, Antimicrobial efficacy of extracts from *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. against human pathogenic bacteria and fungi, Agriculture and Biology Journal of North America, 1, 6, (2010) 1249-1252 <http://dx.doi.org/10.5251/abjna.2010.1.6.1249.1252>
- [4] Chinthamony Arul Raj, Paramasivam Ragavendran, Dominic Sophia, Muthaiyan Ahalliya Rathi, Velliur Kanniappan Gopalakrishnan, Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer activity of *Alpinia purpurata*, Chinese Journal of Natural Medicines, 10, 4, (2012) 263-268 [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(12\)60053-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(12)60053-3)
- [5] Oliver Villaflores, Allan Patrick Macabeo, Dietmar Gehle, Karsten Krohn, Scott Franzblau, Alicia Aguinaldo, Phytoconstituents from *Alpinia purpurata* and their in vitro inhibitory activity against Mycobacterium tuberculosis, Pharmacognosy Magazine, 6, 24, (2010) 339-344 <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.71785>
- [6] Vadivel Subramanian, Evaluation of antioxidant activity of *Alpinia purpurata* rhizome (Vieill), International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 2, 4, (2016) 601-607

- [7] Rainer H. Müller, Sven Gohla, Cornelia M. Keck, State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 78, 1, (2011) 1-9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
- [8] Matthew N. Rhyner, Andrew M. Smith, Xiaohu Gao, Hui Mao, Lily Yang, Shuming Nie Nie, Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging, Nanomedicine, 1, 2, (2006) 209-217 <http://dx.doi.org/10.2217/17435889.1.2.209>
- [9] Rupesh Kumar Basniwal, Harpreet Singh Buttar, V. K. Jain, Nidhi Jain, Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 5, (2011) 2056-2061 <http://dx.doi.org/10.1021/jf1044402t>