



Isolasi, Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Steroid dalam Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (*Terminalia catappa* Linn)

Candra Dewa Pramana Putra^a, Enny Fachriyah^a, Dewi Kusrini^{a*}

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

* Corresponding author: dewi.kusrini@live.undip.ac.id

Article Info

Article history:

Keywords:

steroid, chloroform extract, yellow ketapang leaves.

Kata kunci:
steroid, ekstrak kloroform, daun ketapang berwarna kuning.

Abstract

The isolation, identification and steroid toxicity test of chloroform extract of ketapang leaf (*Terminalia catappa* Linn) has been conducted. Steroids were isolated by the sokletation method of the yellowing of ketapang leaves using chloroform solvent. Separation of chloroform extract was done by TLC method and column chromatography. Toxicity tests were performed using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. Purification was performed using the preparative TLC method. Purity was tested using TLC with various solvents and 2 dimension TLC. Further analysis of steroid compounds was accomplished using GC-MS method. The results obtained showed chloroform extract containing steroids, triterpenoids and flavonoids. Separation by column chromatography method yielded 11 fractions (fractions A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and K). Toxicity test results showed that chloroform extract has potential as a pesticide with LC₅₀ value of 775.90 ppm and the result of fraction of column C potentially as antibacterial with LC₅₀ value of 99.43 ppm. Based on the results of phytochemical screening, C fraction contained steroid compounds. Separation of steroids from fraction C was accomplished by using preparative TLC. The mass spectrogram data from the preparative result of the stain at R_f 0.125 shows the compounds contained therein are norethisterone and drostanolone propionate.

Abstrak

Telah dilakukan isolasi, identifikasi dan uji toksisitas steroid dari ekstrak kloroform daun ketapang (*Terminalia catappa* Linn.). Steroid diisolasi dengan metode sokletasi dari daun ketapang yang sudah menguning menggunakan pelarut kloroform. Pemisahan ekstrak kloroform dilakukan dengan metode KLT dan kromatografi kolom. Uji toksisitas dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Pemurnian dilakukan menggunakan metode KLT preparatif. Kemurnian diuji menggunakan KLT dengan berbagai pelarut dan KLT 2 dimensi. Analisis senyawa steroid lebih lanjut menggunakan metode GC-MS. Hasil yang diperoleh menunjukkan ekstrak kloroform mengandung senyawa golongan steroid, triterpenoid dan flavonoid. Pemisahan dengan metode kromatografi kolom menghasilkan 11 fraksi (fraksi A, B, C, D, E, F, G, H, I, J dan K). Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa ekstrak kloroform mempunyai potensi sebagai pestisida dengan nilai LC₅₀ sebesar 775,90 ppm dan hasil fraksi kolom C berpotensi sebagai antibakteri dengan harga LC₅₀ 99,43 ppm. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia, fraksi C mengandung senyawa steroid. Pemisahan steroid dari fraksi C dilakukan dengan menggunakan KLT preparatif. Data spektrogram massa dari hasil preparatif dari noda pada R_f 0,125 menunjukkan senyawa yang terkandung di dalamnya adalah *norethisterone* dan *drostanolone propionate*.

1. Pendahuluan

Keanekaragaman tumbuhan di Indonesia dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional, yang khasiatnya telah dibuktikan oleh masyarakat luas. Senyawa obat dapat diproduksi dengan berbagai cara, yaitu isolasi langsung dari bahan alam, sintesis sempurna dari bahan sederhana atau melalui sintesis sebagian dari senyawa alam yang berstruktur hampir sama dengan senyawa obat. Pemanfaatan zat-zat kimia dalam tumbuhan sangat penting karena senyawa bahan alam yang aktif farmakologik yang digunakan sebagai obat ini umumnya tidak ada atau ringan efek sampingnya dibandingkan dengan obat dari senyawa hasil sintetik. Selain itu, sebagai bahan awalnya mudah diperoleh dan mudah diperbaharui [1].

Terminalia catappa L (tanaman ketapang) telah diketahui dengan baik penggunaannya sejak lama sebagai obat tradisional seperti obat alergi, obat sesak napas, obat peremajaan kulit, obat iritasi dan obat hiperpigmentasi [2], obat penyakit liver [3], obat diare, sakit kepala, penyakit kulit, antioksidan dan pencegah kanker [4]. Selain itu, daun ketapang juga berpotensi memiliki toksisitas antidiabetes [5]. Banyak penelitian-penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman ketapang berfungsi sebagai anti-inflamatori, antikanker, antihepatotoksik, antigenotoksik, antikistogenik [2].

Hasil penelitian mengenai daun ketapang hijau menggunakan pelarut kloroform telah dilakukan uji pendahulunya dengan BSLT sebagai antibakteri [6]. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa daun ketapang yang sudah berwarna kuning memiliki toksisitas sebagai antibakteri lebih besar dibandingkan daun ketapang yang masih menempel di pohon [7] namun senyawa-senyawa kimia yang berperan belum dipaparkan sehingga yang ingin diteliti pada penelitian ini adalah mengisolasi senyawa-senyawa dalam ekstrak kloroform daun ketapang yang sudah berwarna kuning, pemisahan senyawa steroid, uji toksisitas dan mengidentifikasi serta menganalisis komponen-komponen steroid menggunakan alat GC-MS.

Penelitian kali ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan menganalisis senyawa kimia golongan steroid ekstrak kloroform daun ketapang (*Terminalia catappa* Linn) berwarna kuning yang berpotensi sebagai antibakteri, uji toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dan menganalisis komponen kimia dengan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS)

2. Alat, Bahan dan Metode

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu daun ketapang yang sudah berwarna kuning, asam sulfat pekat p.a., kalium iodida p.a., asam klorida pekat p.a., serbuk magnesium p.a., amil alkohol p.a., ferri klorida (FeCl_3) 1%, anhidrida asam asetat p.a., ammonia 25%, kloroform p.a. dan akuades digunakan untuk skrining fitokimia.

Kloroform teknis digunakan sebagai pelarut dalam proses sokletasi. Etil asetat p.a., kloroform p.a. dan n-heksana p.a. digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi lapis tipis (KLT). n-heksana teknis, etil asetat teknis dan kloroform teknis digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan meliputi silika gel 60 GF254 untuk KLT dan silika gel 60 G untuk kromatografi kolom. Plat KLT dengan silika gel 60 (tanpa indikator fluoresen) ukuran 5x20 cm dengan ketebalan silika sebesar 0,25 mm untuk preparatif. BSLT dilakukan dengan menggunakan tween 20 p.a. dan larutan garam laut 3,80%.

Alat

Peralatan yang digunakan yaitu seperangkat alat soklet, shaker, cawan petri (petri dish), timbangan analit, kertas saring, aluminium foil, penguap putar (rotary evaporator) Buchi, peralatan gelas, statif dan klem, kapas, tissue, penangas, pemanas listrik, penjepit, mikropipet, pipa kapiler, plat tetes, lampu UV, chamber KLT, kromatografi kolom, pipet tetes, tabung reaksi, cawan penguapan, botol vial, akuarium, lampu neon 20 watt, labu takar 10 ml, 100 ml dan 1 L serta seperangkat alat analisis GC-MS.

Prosedur Penelitian

Daun ketapang yang sudah berwarna kuning dicuci sampai bersih kemudian diangin-anginkan hingga kering. Setelah kering dihaluskan hingga menjadi serbuk. Sebanyak 80 gram serbuk daun ketapang yang sudah berwarna kuning dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam soklet yang telah dilengkapi dengan kondensor serta pelarut kloroform ke dalam labu alas bulat, proses sokletasi dilakukan selama \pm 8 jam, hasil sokletasi kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator Buchi, selanjutnya ekstrak kloroform yang masih mengandung pelarut diuapkan dengan cara diangin-anginkan. Untuk mengetahui kandungan kimia dari ekstrak kloroform dan fraksinya yang paling aktif dilakukan uji penapisan fitokimia. Penapisan ini meliputi uji golongan senyawa alkaloid, steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, kuinon dan fenolik.

Terhadap ekstrak kloroform dilakukan kromatografi lapis tipis untuk mendapatkan pemisahan terbaik dengan fase gerak campuran n-heksana p.a., etil asetat p.a. dan kloroform p.a. dengan perbandingan 2:0,1:3 dan fase diam berupa silika gel 60 GF254. Ekstrak kloroform dilakukan kromatografi kolom dengan fase gerak berupa kloroform:n-heksana dengan perbandingan 1:2. Fraksi kecil hasil kromatografi kolom ditampung setiap 10 mL dalam botol vial. Masing-masing fraksi kecil dianalisis dengan metode KLT. Fraksi-fraksi kecil dengan pola pemisahan noda yang sama digabung menjadi satu fraksi besar, dipekatkan dan diberi notasi A, B, C, D dan seterusnya.

Ekstrak kloroform daun ketapang dan fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom diuji toksisitasnya dengan metode BSLT. Pembuatan larutan konsentrasi 1000, 100 dan 10 ppm dengan penambahan tween 20. Uji toksisitas tersebut dilakukan dengan 3 kali replikasi.

Pemisahan steroid dari fraksi C hasil kromatografi kolom menggunakan KLT preparatif, dengan eluen campuran pelarut n-heksana dan kloroform dengan perbandingan 2:1. Hasilnya kemudian dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui golongannya. Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan metode KLT berbagai pelarut serta menggunakan KLT dua dimensi. Hasil preparatif padatan putih diidentifikasi dengan alat GC-MS.

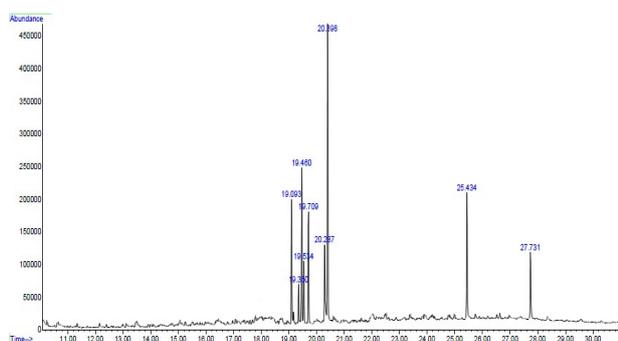
3. Hasil dan Diskusi

Hasil sokletasi serbuk daun ketapang berwarna kuning berupa ekstrak yang berwarna coklat kekuningan dengan randemen 5,832%, dari hasil uji fitokimia menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, steroid dan triterpenoid. Pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom dihasilkan 11 fraksi. Tabel 1 menunjukkan hasil uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT.

Tabel 1 Hasil uji toksisitas menggunakan metode BSLT

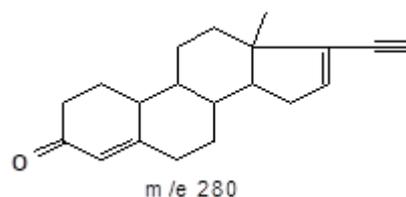
Sampel uji BSLT	LC ₅₀ (ppm)	Aktivitas
Ekstrak Kloroform	775,896	Pestisida
Fraksi A	19,236	Antikanker
Fraksi B	20,837	Antikanker
Fraksi C	99,434	Antibakteri
Fraksi D	17,826	Antikanker
Fraksi E	28,205	Antikanker
Fraksi F	11,011	Antikanker
Fraksi G	55,054	Antibakteri
Fraksi H	45,866	Antibakteri
Fraksi I	542,755	Pestisida
Fraksi J	9,790	Antikanker
Fraksi K	39,484	Antibakteri

Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ada 4 fraksi yang berpotensi sebagai antibakteri (fraksi C, G, H dan K). Masing-masing fraksi tersebut kemudian dilakukan uji fitokimia, hasil dari uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi C mengandung senyawa steroid. Selanjutnya fraksi C dipisahkan dengan menggunakan KLT preparatif. Isolat pada R_f 0,125 yang dihasilkan dari KLT preparatif berupa padatan putih dianalisis dengan menggunakan GC-MS.



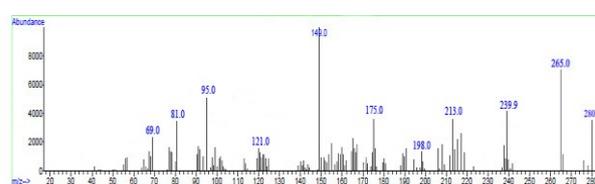
Gambar 1 Kromatogram hasil GC padatan putih hasil KLT preparatif.

Dari hasil kromatografi GC, ternyata ada 9 puncak yang menunjukkan bahwa padatan putih yang dihasilkan belum murni.

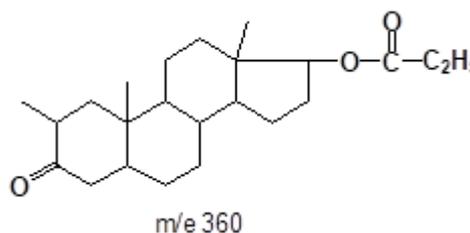


Gambar 2 Senyawa Norethisterone

Spektrogram massa yang ditampilkan pada gambar 2 menunjukkan bahwa puncak pada waktu retensi 20,398 menit dengan kelimpahan sebesar 24,08% dan memiliki kemiripan dengan spektrogram massa dari pusat data GC-MS sebesar 96% merupakan senyawa norethisterone dengan pola fragmentasi sebagai berikut:

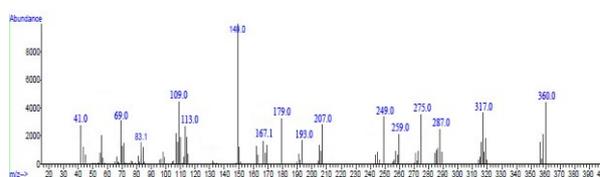


Gambar 3. Spektrogram massa puncak pada waktu retensi 20,398 menit



Gambar 4. Senyawa Drostanolone propionate

Sedangkan spektrogram massa yang ditampilkan pada gambar 3 menunjukkan bahwa puncak pada waktu retensi 25,434 menit dengan kelimpahan sebesar 10,17% dan memiliki kemiripan dengan spektrogram massa dari pusat data GC-MS sebesar 98% merupakan senyawa drostanolone propionate dengan pola fragmentasi sebagai berikut:



Gambar 5. Spektrogram massa puncak pada waktu retensi 25,434 menit

4. Kesimpulan

Ekstrak kloroform daun ketapang yang sudah berwarna kuning mengandung senyawa flavonoid, steroid dan triterpenoid serta berpotensi sebagai pestisida dengan harga LC₅₀ sebesar 775,896 ppm. Fraksi C hasil kromatografi kolom ekstrak kloroform mengandung senyawa steroid dan berpotensi sebagai antibakteri dengan harga LC₅₀ sebesar 99,434 ppm. Hasil

analisis dengan GC-MS menunjukkan bahwa noda pada Rf 0,125 hasil preparatif pada fraksi C diduga mengandung dua senyawa steroid yaitu norethisterone dan drostanolone propionate.

5. Daftar Pustaka

- [1] P Tarigan, Beberapa Aspek Kimia Sapogenin Steroid pada Tumbuhan di Indonesia, *Alumni, Bandung*, (1980)
- [2] Rahmanullah Siddiqi, Syed Asad Sayeed, In vitro antibacterial activity of the extracts derived from *Terminalia catappa*, *Research Journal of Microbiology*, 2, 2, (2007) 180-184
- [3] Nien-Yung Chiu, Kuang-hsiung Chang, The illustrated medicinal plants of Taiwan, Southern Materials Center, 1992.
- [4] H Babayi, I Kolo, JI Okogun, UJJ Ijah, The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms, (2004)
- [5] K Anam, RM Widharna, D Kusrini, α -Glucosidase inhibitor activity of *Terminalia* species, *IJP-International Journal of Pharmacology*, 5, 4, (2009) 277-280
- [6] Indri Mandasari, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.), *Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro, Semarang*, hal, 33, (2006)
- [7] Elin Yulinah Sukandar, Asep Gana Suganda, Gemi Utami Pertiwi, Uji aktivitas antijamur salep dan krim ekstrak daun ketapang *Terminalia catappa* L. pada kulit kelinci, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17, 2006, (2006)