



Isolation and Testing of Bacteria from Steroid Compounds obtained from Anting-anting Leaf (*Acalypha indica* L.)

Ditya Vega Fauzia^{a*}, Dewi Kusrini^a, Enny Fachriyah^a

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

* Corresponding author: vega.dty@gmail.com

Article Info

Keywords:
 Anting-anting leaves, Steroid, Antibacterial activity

Kata Kunci:
 Daun anting-anting, Steroid, Aktivitas Antibakteri

Abstract

Isolation of steroid compounds from the leaves of the earrings (*Acalypha indica* L.) and the antibacterial test has been performed. This study aims to obtain information about secondary metabolite compound leaves of Anting-anting, obtaining and identifying steroid isolates from the leaves of Anting-anting and knowing the antibacterial activity of the positive fraction of steroid compounds. The research stages include sample preparation, phytochemical test, isolation, separation, purification of steroid compounds, identification of steroid isolates using LC-MS/MS, and antibacterial test by paper disc method. The results of phytochemical screening show that the leaves of the earrings contain alkaloid compounds, flavonoids, steroids, saponins, tannins, and quinones. From the results of steroid isolation, we found steroid isolates weighing 0.0065 grams (0.0058%). Identification of steroid isolates using LC-MS/MS at a retention time of 7.49 min with $[M+H]^+$ 399 m/z indicated the presence of a brassicasterol compound. The results of antibacterial test of fraction A from chloroform extract containing steroid compound showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* bacteria and *Escherichia coli* bacteria.

Abstrak

Isolasi senyawa steroid dari daun anting-anting (*Acalypha indica* L.) dan uji antibakterinya telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi tentang senyawa metabolit sekunder daun anting-anting, memperoleh dan mengidentifikasi isolat steroid dari daun anting-anting serta mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi positif senyawa steroid. Tahap penelitian meliputi preparasi sampel, uji fitokimia, isolasi, pemisahan, pemurnian senyawa steroid, identifikasi isolat steroid menggunakan LC-MS/MS, dan uji antibakteri dengan metode cakram kertas. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa daun anting-anting memiliki kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, tannin, dan kuinon. Dari hasil isolasi steroid, didapatkan isolat steroid seberat 0,0065 gram (0,0058%). Identifikasi isolat steroid dengan menggunakan LC-MS/MS pada waktu retensi 7,49 menit dengan $[M+H]^+$ 399 m/z menunjukkan adanya senyawa brassicasterol. Hasil uji antibakteri fraksi A dari ekstrak kloroform yang mengandung senyawa steroid menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli*.

1. Pendahuluan

Penggunaan tanaman tertentu sebagai obat merupakan warisan turun temurun dari nenek moyang kita. Salah satu tanaman yang berpotensi menjadi

tanaman obat adalah anting-anting (*Acalypha indica* L.). Tanaman anting-anting secara tradisional sudah dimanfaatkan untuk pengobatan disentri, malnutrisi, mimisan, muntah darah, kencing darah dan malaria [1].

Tanaman anting-anting telah diteliti memiliki berbagai macam khasiat seperti obat sakit gusi, memiliki efek anti racun, penyembuhan luka, antioksidan [2], anti inflamasi [3], antimikroba [4], obat antikanker [5] serta antidiuretik [6]. Kandungan fitokimia yang terdapat dalam tanaman anting-anting meliputi alkaloid, tannin, steroid, saponin, senyawa fenolik, dan flavonoid [7]. Senyawa steroid yang berhasil diisolasi pada tanaman anting-anting adalah stigmasterol, γ -sitosterol, dan β -sitosterol [8] dan pada familia *Eurphobiaceae* adalah brassicasterol [9]. pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa steroid fraksi kloroform dari daun anting-anting dan uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

2. Metode Penelitian

Preparasi dan Penapisan fitokimia

Sampel penelitian berupa daun Anting-anting yang diperoleh dari daerah Kota Bekasi. Daun anting-anting yang diperoleh dibersihkan, dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk dan diuji penapisan fitokimia.

Pembuatan Ekstrak Etanol

Sebanyak 1.100 gram serbuk daun anting-anting dimaserasi dengan etanol 96% hingga jernih. Ekstrak yang diperoleh kemudian dievaporasi sampai mendapat ekstrak etanol dan ditimbang. Ekstrak etanol dilarutkan dalam etanol selanjutnya dilakukan penghilangan klorofil dengan menambahkan akuades (1:1) lalu disaring dan diuapkan.

Isolasi, Pemisahan, dan Pemurnian Senyawa Steroid

Ekstak etanol-air sebanyak 60,74 gram dilakukan isolasi steroid dengan kromatografi cair vakum menggunakan fasa diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fasa gerak menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Masing-masing fraksi dilakukan uji kandungan steroid menggunakan KLT dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard. Fraksi kloroform dengan hasil positif steroid dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan fasa diam silika gel 60 dan fasa gerak berupa campuran kloroform : etil asetat (4:6). Eluat-eluat yang dihasilkan dari kolom ditampung setiap 15 mL dalam botol vial. Masing-masing botol vial dianalisis pola noda yang terbentuk dengan KLT. Eluat-eluat yang memiliki pola noda yang sama digabungkan menjadi fraksi-fraksi besar (fraksi besar A, B, dan C) kemudian dilakukan analisis steroid menggunakan metode KLT dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard. Fraksi positif steroid dilakukan pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan fasa diam plat silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 20 cm x 20 cm, ketebalan 0,5 mm–2,0 mm dan fasa gerak berupa campuran kloroform : etil asetat (3:1) hingga didapatkan isolat steroid.

Uji Kemurnian

Uji kemurnian isolat steroid dilakukan dengan KLT berbagai eluen tunggal dan campuran serta KLT dua

dimensi dengan eluen campuran hingga diperoleh noda tunggal.

Identifikasi Struktur

Isolat steroid yang telah murni diidentifikasi strukturnya menggunakan LC-MS/MS.

Uji Aktivitas Antibakteri

Fraksi A hasil kromatografi kolom gravitasi yang positif mengandung senyawa steroid diuji aktivitas antibakterinya dengan menggunakan metode cakram kertas berdasarkan pengukuran diameter zona bening. Kertas cakram yang berdiameter ± 6 mm dimasukkan ke dalam fraksi A ekstrak kloroform dengan masing-masing konsentrasi sebesar 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, larutan kontrol positif dan kontrol negatif. Dalam penelitian ini, Amoxicillin dengan konsentrasi 2000 ppm digunakan sebagai kontrol positif dan aquades yang ditambahkan dengan tween 20 digunakan sebagai kontrol negatif. Kertas cakram yang berisi larutan uji diletakkan pada media agar sebagai media uji. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening di sekitar cakram yang terlihat diukur menggunakan jangka sorong.

3. Hasil dan Pembahasan

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak etanol daun anting-anting. Hasil penapisan fitokimia disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji penapisan fitokimia serbuk dan ekstrak etanol daun anting-anting

Uji	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak Etanol
Flavonoid	+	+
Alkaloid	+	+
Steroid	+	+
Triterpenoid	-	-
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Kuininon	+	+

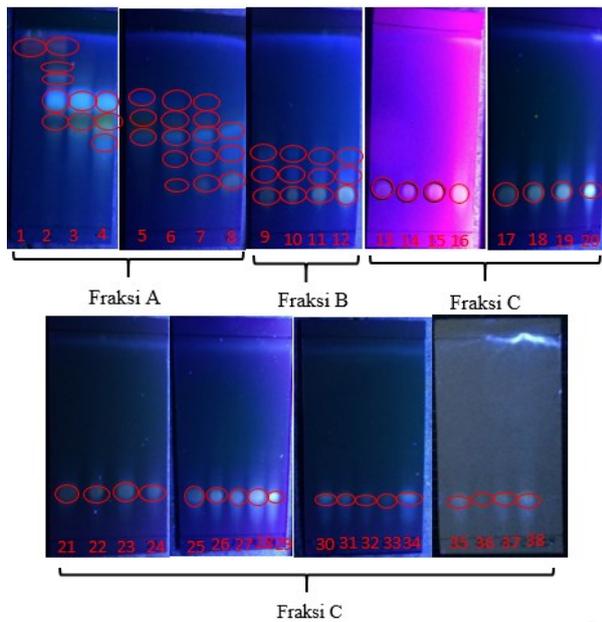
Pembuatan Ekstrak Etanol

Sebanyak 1.100 gram serbuk daun anting-anting dimaserasi dengan pelarut etanol 96%, disaring dan dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental etanol berwarna coklat kehitaman pekat sebanyak 100,56 gram. Ekstrak kental etanol yang didapat kemudian dihilangkan kandungan klorofilnya menggunakan akuades hangat (1:1) yang bertujuan untuk mengikat dan memisahkan klorofil dan didapatkan ekstrak etanol-air dengan massa 60,74 gram.

Isolasi, Pemisahan, dan Pemurnian Steroid

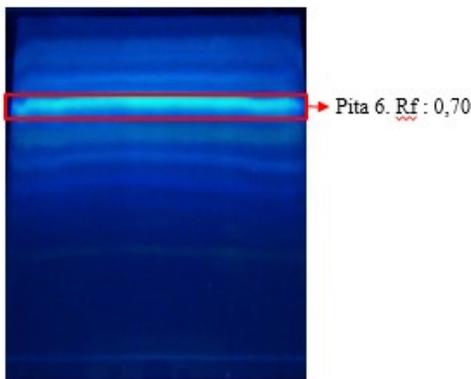
Isolasi senyawa steroid pada ekstrak etanol-air dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum dengan fasa diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fasa

gerak berupa n-heksana, kloroform, dan etil asetat yang dielusi secara berurutan. Dihasilkan fraksi n-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat yang kemudian diuji kandungan senyawa steroidnya dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard. Fraksi kloroform yang positif mengandung senyawa steroid kemudian dipisahkan senyawa steroidnya dengan menggunakan metode kromatografi kolom gravitasi. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60 dan fasa gerak merupakan campuran kloroform:etil asetat (4:6). Eluat yang dihasilkan sebanyak 38 botol vial, kemudian masing-masing botol vial dianalisis dengan KLT menggunakan fasa gerak kloroform : etil asetat (4:6) yang ditunjukkan pada gambar 1.



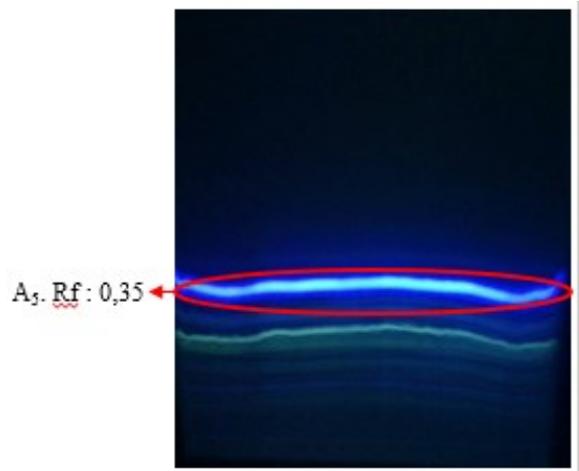
Gambar 1. Profil KLT fraksi kloroform hasil kromatografi kolom gravitasi menggunakan fasa gerak kloroform : etil asetat (4:6) pada UV λ 365 nm

Fraksi A yang positif mengandung senyawa steroid saat disemprot reagen Liebermann-burchard dipisahkan senyawa steroid menggunakan KLT Preparatif dengan fasa diam silika gel 60GF₂₅₄ dan fasa gerak berupa campuran kloroform : etil asetat (3:1). Hasil KLT preparatif fraksi A hasil kromatografi kolom gravitasi ditunjukkan pada gambar 2.



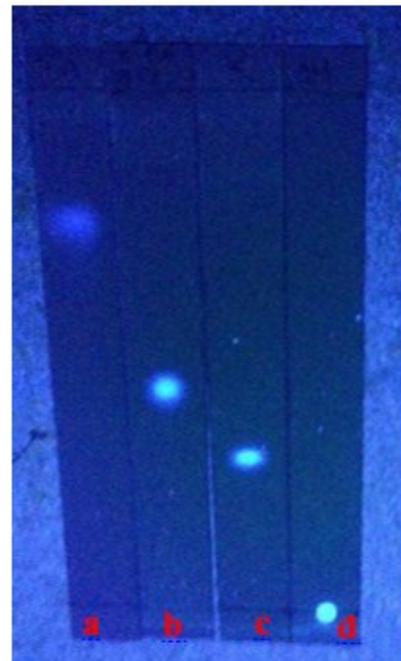
Gambar 2. Profil KLT preparatif fraksi A dengan eluen kloroform : etil asetat (3:1) di bawah lampu UV λ 365 nm

Pita ke-6 kemudian diuji kemurnian menggunakan plat KLT dengan eluen kloroform menghasilkan 5 buah noda. Perlu dilakukan pemurnian kedua untuk memisahkan 5 noda yang teridentifikasi dengan menggunakan KLT preparatif. Pemurnian kedua dilakukan dengan menggunakan plat KLT Preparatif silika gel 60GF₂₅₄ dengan eluen kloroform : etil asetat (9:1).



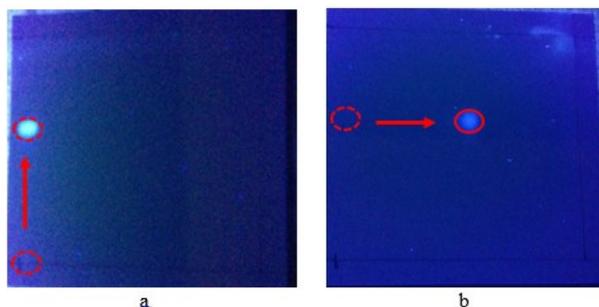
Gambar 3. Hasil KLT preparatif ke-2 pita ke-6 dengan eluen kloroform : etil asetat (9:1) dibawah lampu UV λ 365 nm

Pita A₅ selanjutnya dikerok, dilarutkan, dan disaring hingga didapat isolat steroid. Isolat steroid kemudian diuji kemurniannya dengan metode KLT berbagai eluen tunggal dan campuran seperti kloroform, n-heksana, dan etil asetat. Hasil uji kemurnian isolat steroid ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji kemurnian isolat steroid dengan eluen tunggal dan campuran di bawah lampu UV λ 365 nm. Keterangan: Fasa gerak (A) = etil asetat, (B) = kloroform : etil asetat (7:3), (C) = kloroform, (D) = n-heksana

Uji kemurnian dilanjutkan menggunakan metode KLT dua dimensi dengan eluen (a) kloroform : etil asetat (6:4). Setelah diputar 90°, eluen kedua yang digunakan adalah (b) kloroform : etil asetat (4:6). seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.

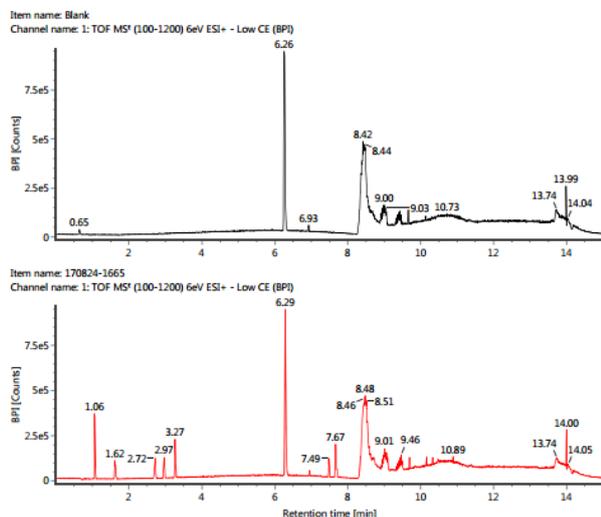


Gambar 5. Hasil uji kemurnian KLT dua dimensi isolat steroid di bawah lampu UV λ 365 nm

Berdasarkan analisis menggunakan KLT dua dimensi, didapatkan satu noda yang menunjukkan bahwa isolat steroid relatif murni. Isolat yang didapat kemudian diuapkan dan diperoleh isolat steroid sebesar 0,0065 gram.

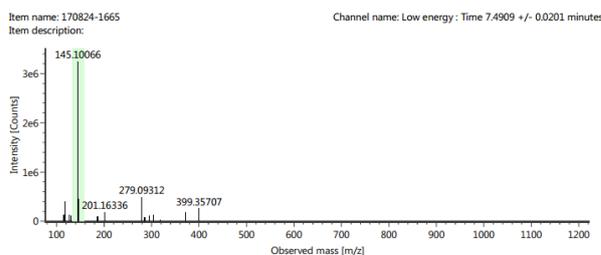
Analisis Isolat Steroid

Isolat steroid selanjutnya dianalisis dengan instrumen LC-MS/MS untuk mengetahui perkiraan jenis serta struktur senyawa yang terdapat pada isolat berdasarkan berat molekul yang teridentifikasi. Kromatogram LC isolat steroid ditunjukkan pada gambar 6.



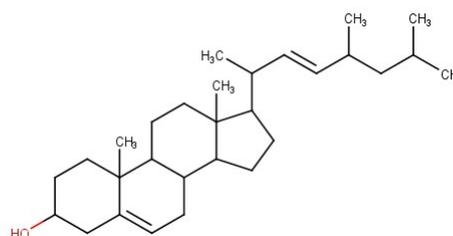
Gambar 6. Kromatogram LC isolat steroid (bawah)

Hasil kromatogram LC terdapat tujuh puncak. Salah satu puncak dengan waktu retensi 7,49 menit yang menunjukkan adanya senyawa steroid yang akan teridentifikasi struktur dan berat molekulnya dengan melihat spektrogram massa yang dihasilkan. Spektrogram pada waktu retensi 7,49 menit ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Spektrogram massa isolat steroid pada waktu retensi 7,49 menit

Pada spektrogram dengan waktu retensi 7,49 menit terdapat ion molekular [M+H]⁺ 399 m/z sehingga memiliki berat molekul 398 g/mol. Berdasarkan hasil LC-MS/MS di atas diusulkan senyawa hasil isolasi adalah senyawa golongan steroid yaitu Brassicasterol. Berdasarkan kemotaksonomi, penelitian yang telah dilakukan mengenai isolasi senyawa golongan steroid dari tanaman *Euphorbia hirta* yang merupakan salah satu tanaman dari familia *Euphorbiaceae* dengan berat molekul 398 g/mol adalah Brassicasterol^[9]. Tanaman anting-anting merupakan salah satu tanaman dari familia *Euphorbiaceae*, sehingga kemungkinan senyawa yang teridentifikasi dengan berat molekul 398 g/mol pada tanaman anting-anting adalah Brassicasterol.



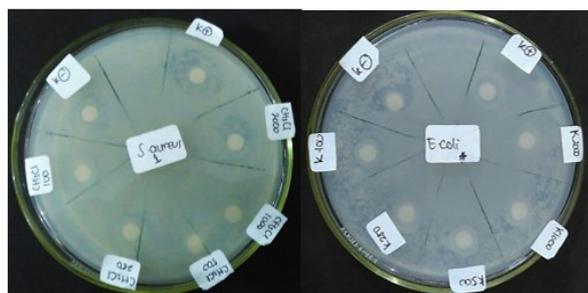
Gambar 8. Struktur Brassicasterol

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui bioaktivitas suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan suatu jenis bakteri. Penelitian ini dilakukan dengan metode difusi cakram kertas, dimana kertas saring berdiameter 6 mm yang berisi sejumlah senyawa aktif ditempatkan pada permukaan medium padat yang telah diinokulasi bakteri uji pada permukaan medianya. Setelah inkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan senyawa aktif tersebut terhadap organisme uji [10]. Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap fraksi A hasil kromatografi kolom gravitasi yang positif mengandung senyawa steroid. Konsentrasi fraksi A dari ekstrak kloroform yang digunakan adalah 100, 250, 500, 1000 dan 2000 ppm dengan kontrol positif yang digunakan adalah larutan amoxicillin 2000 ppm dan kontrol negatif berupa aquades yang ditambahkan tween 20. Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan terhadap fraksi A hasil kromatografi kolom gravitasi yang positif mengandung senyawa steroid ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengukuran diameter zona hambat uji antibakteri

Konsentrasi (ppm)	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
2000	10	7,5
1000	9	6
500	9	6
250	9	5
100	7	5
Kontrol negatif	0	0
Kontrol positif	10	10

**Gambar 8.** Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi A ekstrak kloroform hasil kromatografi kolom gravitasi

Pada tabel 2 terlihat bahwa diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* lebih besar dibandingkan dengan bakteri *Escherichia coli*. Bakteri gram positif cenderung lebih sensitif terhadap komponen antibakteri. Hal ini disebabkan oleh struktur dinding selnya yang lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Pada bakteri gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks berupa lipoprotein, lipopolisakarida, dan peptidoglikan [11]. Dengan demikian, bakteri *Escherichia coli* memiliki pertahanan yang lebih kuat terhadap komponen antibakteri dibandingkan dengan bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga memiliki daerah zona hambat yang lebih kecil.

Menurut [12], kategori daya hambat uji antibakteri adalah diameter zona hambat <10 mm dikatakan kurang efektif, diameter 11-15 kategori lemah, diameter 16-20 mm dikatakan kategori sedang, dan diameter >20 mm dikatakan kategori tinggi. Pada diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* dengan berbagai konsentrasi diketahui bahwa respon penghambatan pertumbuhan bakterinya merupakan respon lemah, sedangkan untuk diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* diketahui respon penghambatan bakteri pada konsentrasi 100 ppm sampai konsentrasi 1000 ppm termasuk kedalam respon kurang efektif dan untuk konsentrasi 2000 ppm cenderung lemah. Senyawa steroid bekerja sebagai senyawa aktif antibakteri dengan cara berinteraksi dengan membran sel [13]. Senyawa steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel sehingga menyebabkan integritas membran sel menurun, morfologi membran sel berubah dan akhirnya

dapat menyebabkan membran sel rapuh dan akhirnya lisis [14].

4. Kesimpulan

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak etanol daun Anting-anting (*Acalypha indica* L.) meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, dan steroid. Isolat steroid dari daun anting-anting (*Acalypha indica* L.) yang diperoleh adalah 0,0065 gram dengan rendemen 0,0058% dan identifikasi senyawa steroid menggunakan instrumen LC-MS/MS diduga senyawa brassicasterol. Fraksi A ekstrak kloroform hasil kromatografi kolom gravitasi dengan kandungan senyawa steroid memiliki bioaktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

5. Daftar Pustaka

- [1] Arief Pambudi, Syaefudin, Nita Noriko, Risa Swandari, Purwanti Rara Azura, Identifikasi Bioaktif Golongan Flavonoid Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.), *Jurnal AL-AZHAR INDONESIA SERI SAINS DAN TEKNOLOGI*, 2, 3, (2014) 178-187
- [2] Anirban Mullick, Sunanda Mandal, Rituparna Bhattacharjee, Anindita Banerjee, In-Vitro Assay of Antioxidant and Antibacterial Activity of Leaf Extract and Leaf Derived Callus Extract of *Acalypha indica* L., *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IJPBS)*, 3, 1, (2013) 504-510
- [3] D. Jagatheeswari, J. Deepa, H. Sheik Jahabar Ali, P. Ranganathan, *Acalypha indica* L - an Important Medicinal Plant: a Review of Its Traditional Uses, and Pharmacological Properties, *International Journal of Research in Botany*, 3, 1, (2013) 19-22
- [4] J. Rajaselvam, J. M. Benila smily, R. Meena, A Study of Antimicrobial Activity of *Acalypha indica* Against Selected Microbial Species, *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 3, 9, (2012) 473-476
- [5] Rajeshwari Sivaraj, Pattanathu K. S. M. Rahman, P. Rajiv, S. Narendhran, R. Venckatesh, Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, (2014) 255-258
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.027>
- [6] P. Vijayarekha, N. Sangottaiyan, A. Noorjahan, S. Ambiga, Antibacterial Activity of *Acalypha indica* Linn, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 6, (2015) 1133-1138
- [7] Chandra Mohan, S. Dinakar, Anand Thirupathi, R. Elayaraja, B. Sathiyapriya, Phytochemical, GC-MS analysis and Antibacterial activity of a Medicinal Plant *Acalypha indica*, *International Journal of PharmTech Research*, 4, 3, (2012) 1050-1054
- [8] Manisha Masih, Tanushree Banerjee, Bhaskar Banerjee, Anita Pal, Antidiabetic Activity of *Acalypha indica* Linn. on Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 3, (2011) 51-54
- [9] Ewelina Pióro-Jabrucka, Anna Pawełczak, Jarosław L. Przybył, Katarzyna Bączek, Zenon Węglarz,

- Accumulation of phenolic and sterol compounds in *Euphorbia hirta* (L.), *Herba Polonica*, 57, 2, (2011) 30-36
- [10] E. Jawetz, Mikrobiologi Kedokteran, 23rd ed., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 2007.
- [11] Michael J. Pelczar, E. C. S. Chan, Dasar-dasar mikrobiologi, R.S. Hadioetomo, Universitas Indonesia Press, Jakarta, 1988.
- [12] David Greenwood, Antimicrobial Chemotherapy, 3rd ed., Oxford University Press, 1995.
- [13] Mohamed Sham Shihabudeen, Hansi Priscilla, D. Kavitha Thirumurugan, Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants, *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 1, 10, (2010) 430-434
- [14] Audrey M. Glauert, J. T. Dingle, J. A. Lucy, Action of Saponin on Biological Cell Membranes, *Nature*, 196, (1962) 953 10.1038/196953a0