

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA STEROID EKSTRAK ETIL ASETAT TERIPANG BATU (*Actinopyga lecanora* Jaeger)

Fadillah Maryam B.A¹, Burhanuddin Taebe¹, Uswatun Hasanah¹

¹) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar

Jl. Perintis Kemerdekaan Km.13,7 Daya Telp/Fax. 0411-583190 Makassar 90242

Email: uswatunhasanah2424@gmail.com

ABSTRAK

Teripang merupakan salah satu komoditas unggulan hasil perikanan laut Indonesia dan mempunyai potensi untuk dikembangkan karena mengandung bahan aktif yang sangat berguna bagi manusia. Teripang batu (*Actinopyga lecanora* Jaeger) mengandung senyawa steroid. Teripang batu biasanya dikonsumsi sebagai makanan oleh masyarakat pesisir pantai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi senyawa steroid yang diisolasi dari ekstrak etil asetat teripang batu (*Actinopyga lecanora* Jaeger). Ekstrak diperoleh dari proses refluks menggunakan pelarut etil asetat dengan persen rendamen 0,438 %. Hasil uji kandungan kimia ekstrak etil asetat positif mengandung steroid. Sebanyak 1 gram ekstrak dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom konvensional menghasilkan 5 fraksi. Fraksi 3 dipilih dan dilanjutkan ketahapan kromatografi lapis tipis preparatif dan menghasilkan 2 isolat. Isolat pita 1 yang menunjukkan satu noda tunggal pada profil KLT dengan nilai R_f 0,52 dilanjutkan untuk dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR. Hasil analisis spektrofotometri UV-Vis isolat 1 mempunyai serapan maksimal pada panjang gelombang 252,0 nm. Data FT-IR menunjukkan adanya gugus fungsi C-H, C-O, C=O, C=C, dan O-H yang diduga merupakan senyawa steroid.

Kata kunci : Isolasi, teripang (*Actinopyga lecanora* Jaeger), steroid

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia yang memiliki 13.466 pulau dengan panjang garis pantai mencapai 99.093 km dan luas wilayah perairan 6.3 juta km² (Estradivari dkk., 2017). Hal ini berimplikasi pada kepemilikan sumber daya laut Indonesia yang melimpah yang dapat dimanfaatkan untuk kehidupan. Pemanfaatan biota laut saat ini bukan hanya sekedar konsumtif saja, tetapi mengarah kepada penelitian yang lebih lanjut seperti obat-obat dalam dunia medis yang tujuannya untuk mengangkat nilai ekonomis biota laut (Inayah dkk., 2012).

Salah satu potensi biota laut adalah teripang dengan nama lain sandfish, sea cucumber, dan ginseng laut (Martoyo dkk., 2000). Teripang dapat ditemukan hampir diseluruh perairan, mulai dari daerah pasang surut yang dangkal sampai perairan yang lebih dalam. Salah satu daerah penghasil teripang terbesar adalah Sulawesi

Tengah, disusul Nusa Tenggara Timur dan Sulawesi Selatan (Departemen Kelautan dan Perikanan, 2006). Teripang sejak lama dimanfaatkan sebagai makanan yang dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit, dan meningkatkan kesehatan (Danceet *al.*, 2003).

Menurut Kumar *et al.*, 2006. Antifungi pada teripang (*Actinopyga lecanora* Jaeger) yang diekstrak menggunakan metanol, etil asetat, menunjukkan aktivitas antifungi terhadap 21 fungi.

Salah satu senyawa bioaktif yang terkandung dalam teripang adalah senyawa steroid alami yang sangat potensial. Kandungan steroid dalam jaringan tubuh dan pembuluh darah dapat berupa hormon steroid, asam lemak bebas, trigliserida maupun kolesterol. (Kustiariyah 2006; Nurjanah 2008).

Steroid merupakan hormon kelamin yang dihasilkan oleh kelenjar testis dan adrenal. Selama ini yang

banyak digunakan di industri adalah hormon steroid sintetis, seperti metilttestosteron. Senyawa sintetis ini mempunyai beberapa kelemahan yaitu tidak mudah diuraikan dalam tubuh dan dapat menimbulkan efek samping yang tidak dikehendaki, sedangkan senyawa alami mempunyai kelebihan mudah diserap oleh tubuh dan efek samping yang ditimbulkan sedikit (Wiryowidagdo, 2005).

Meskipun berbagai manfaat zat aktif teripang telah banyak dilaporkan, tetapi penelitian mengenaikarakterisasi senyawa steroid, khususnya teripang batu(*Actinopyga lecanora* Jaeger) belum dilakukan. Sehubungan dengan hal itu, maka akan dilakukan penelitian isolasi dan karakterisasi senyawa steroid ekstrak etil asetat teripang batu(*Actinopyga lecanora* Jaeger).

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah batang pengaduk, botol vial, cawan porselin, corong, lampu UV 254 dan 366 nm, gelas ukur 10 ml dan 50 ml, chamber, hot plate, kertas saring, klem, kolom kromatografi, penyemprot manual plat KLT, pipa kapiler, pipet tetes, plat KLT preparatif silika gel 60 GF₂₅₄, statif, sentrifus, seperangkat alat refluks, spektrofotometer infra merah (IR), spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, dan timbangan analitik.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah teripang batu segar (*Actinopyga lecanora* Jaeger), aquades, etanol p.a, etil asetat, etil asetat p.a, n-heksan, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfatP, metanol, silika gel G-60 (0,063-0,200 mm).

B. Pengambilan Sampel

Sampel berupa teripang batu segar (*Actinopyga lecanora* Jaeger) diperoleh dari Pulau Barrang Lompo, Kepulauan Sangkarrang, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan.

C. Pengolahan Sampel

Teripang yang telah memenuhi kriteria, pertama-pertama dipisahkan antara kulit, daging, dan jeroan. Bagian kulit dan daging dibersihkan, kemudian dilakukan

proses pengecilan ukuran dengan cara dipotong dengan ukuran 1 cm.

D. Proses Ekstraksi

Teripang segar yang telah dirajang ditimbang sebanyak 1,5 kg. Dimasukkan ke dalam labu alas bulat 150 gram, ditambahkan pelarut etil asetat 300 ml, dengan rasio bahan pelarut (1:2 b/v). Dilakukan proses refluks, 3-4 jam. Disaring hasil refluks, diambil ampas dan diulangi proses refluks dengan cairan penyari baru. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan, hingga diperoleh ekstrak kental.

E. Identifikasi Fitokimia

Uji Steroid

Sebanyak 0,5 g ekstrak kering dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard (0,5 ml kloroform, ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 2 ml asam sulfat P). Apabila terbentuk cincin merah kecoklatan atau ungu pada lapisan kedua sedangkan larutan pada bagian atas menjadi hijau atau ungu, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung steroid (Depkes RI, 1987).

F. Proses Pemisahan

Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan dengan kromatografi lapis tipis dari ekstrak etil asetat teripang batu dilakukan untuk menentukan eluen yang digunakan untuk fraksinasi kromatografi kolom konvensional. Ditandai lempeng dengan batas atas dan batas bawah kemudian diaktifkan dalam oven pada suhu 115°C dalam waktu 15 menit. Kedalam vial dilarutkan ekstrak kental menggunakan pelarut etil asetat dan selanjutnya ditotolkan pada lempeng yang telah diaktifkan. Selanjutnya dilakukan orientasi. Dimasukkan eluen ke dalam chamber, setelah itu dijenuhkan kemudian lempeng dielusi. Dilakukan pengamatan penampakan noda dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Hasil elusi terbaik diperoleh eluen n-heksan : etil asetat (7:3) dipilih untuk proses fraksinasi selanjutnya.

Kromatografi Kolom Konvensional

Seperangkat alat kromatografi kolom konvensional disiapkan. Dimasukkan kapas pada ujung kolom, untuk

mencegah fase diam silika keluar ketika kran dibuka. Kemudian dimasukkan bubuk silika gel (silika gel G-60 + n-Heksan) kedalam tabung kolom sebanyak 30 gram menggunakan metode basah sambil diketuk-ketuk tabung kolom hingga fase diam didalam kolom mampat.

Ekstrak sebanyak 1 gram dilarutkan dengan 1 ml n-Hexan, kemudian dimasukkan ke dalam kolom dibagian atas penjerap. Setelah itu dielusi dengan eluen campuran n-Heksan dan etil asetat dengan perbandingan (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9) dalam 50 ml. Hasil yang keluar ditampung dalam vial masing-masing 10 ml berupa fraksi. Fraksi tersebut kemudian digabungkan berdasarkan kesamaan profil KLT dan nilai Rf. Setelah itu fraksi-fraksi tersebut dikeringkan kemudian ditimbang bobot fraksinya.

G. Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi

Semua fraksi ditotolkan pada lempeng, dimasukkan dalam chamber yang telah dijenuhkan, kemudian dielusi menggunakan eluen n-hexan : etil asetat (7:3). Keringkan dan disemprot menggunakan pereaksi penampak bercak Lieberman-Burchard (asam asetat anhidrat sebanyak 2 ml, 2 ml asam sulfat P dan 16 ml etanol p.a). Lempeng yang telah disemprot, kemudian dipanaskan menggunakan hot plate.

H. Isolasi dan Pemurnian

Fraksi terpilih dari kromatografi kolom konvensional dilanjutkan pada Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Ditotolkan fraksi pada plat silika gel 60 GF₂₅₄ kemudian dielusi menggunakan fase gerak eluen n-hexan : etil asetat (7:3). Selanjutnya pita pada plat KLTP ditandai dan dikerok kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etil asetat p.a sebanyak 2 ml, kemudian disentrifus pada kecepatan 6 (6.000 rpm) selama 15 menit. Dipisahkan supernatan

dan pelet. Ulangi proses sentrifus pada pelet seperti proses sebelumnya sebanyak 2 kali. Supernatan digabungkan, lalu diuapkan.

Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan KLT Dua Dimensi dan multi eluen n-hexan : etil asetat (7:3) dan kloroform : aseton (9:1). Jika isolat menunjukkan noda tunggal pada plat kromatografi maka isolat tersebut relatif murni secara KLT.

I. Karakterisasi Isolat

Karakterisasi isolat murni dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan karakterisasi gugus fungsional dan struktur kimia dilakukan menggunakan spektrofotometer Fourier Transform Infra Red (FTIR).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa steroid ekstrak etil asetat teripang batu (*Actinopyga lecanora* Jaeger). Teripang diperoleh dari pulau Barrang Lompo, Kepulauan Sangkarrang, Kota Makassar. Penelitian ini diawali dengan proses ekstraksi sampel sebanyak 2,4 kg dengan metode refluks dengan menggunakan pelarut etil asetat. Metode refluks dipilih karena pemanasan material secara refluks 2-12 jam dengan pelarut yang kepolarannya rendah, efektif dalam menarik senyawa steroid (Goat and Toshihiro, 1997). Menurut Meydia, dkk 2016 penggunaan pelarut etil asetat dalam ekstraksi senyawa steroid menghasilkan rendamen paling banyak dibanding pelarut n-heksan dan metanol dan dapat menarik senyawa steroid secara efektif. Berdasarkan proses tersebut dihasilkan berat ekstrak 10,52 g dengan % rendamen sebanyak 0,438. Ekstrak kering yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji kandungan kimia. Uji kandungan kimia bertujuan untuk memberikan gambaran awal komposisi kandungan senyawa pada ekstrak (Depkes R.I., 2000).

Tabel 4. Identifikasi steroid ekstrak etil asetat teripang batu (*Actinopyga lecanora* Jaeger)

Skrining	Hasil	Literatur	Pustaka	Ket.
Uji Steroid	Larutan Merah kecoklatan pada lapisan bawah dan lapisan atas berwarna bening. Menjadi: Batas kedua larutan terbentuk cincin merah kecoklatan, larutan bagian atas berwarna hijau	Batas kedua larutan terbentuk cincin merah, larutan bagian atas berwarna hijau	Depkes, RI (1987)	+

Dari uji identifikasi steroid menunjukkan bahwa ekstrak teripang positif mengandung steroid, perubahan warna dari merah perlahan menjadi hijau menunjukkan keberadaan golongan sterol disebabkan karena dalam komponen organik diindikasikan keberadaan dua atau lebih karbon-karbon rantai ganda yang terkonjugasi (Dence, 1980) dan adanya polimerisasi lemak tidak jenuh dalam medium asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat.

Selanjutnya ekstrak kering teripang sebanyak 1 gram dipisahkan dengan metode kromatografi kolom dengan fase diam silica gel G-60 dan fase gerak n-hexan : Etil Asetat yang sebelumnya telah diuji kelarutannya dilakukan secara kontinyu dari kepolaran yang rendah hingga kepolaran yang tinggi. Kromatografi kolom merupakan metode yang bagus untuk memisahkan komponen kimia yang jumlahnya sedikit dan hasilnya cepat diperoleh. Sebanyak 5 fraksi gabungan diperoleh dari 44 vial yang didasarkan atas profil nilai Rf dan pola pemisahan pada hasil kromatogram KLT. Hasil kromatografi kolom konvensional dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 5. Data Hasil Perhitungan Rf Pada Fraksi

Fraksi	UV 254 nm	UV 365 nm
Fraksi 1	-	$Rf_1 = 0,48$
Fraksi 2	-	$Rf_1 = 0,44$ $Rf_2 = 0,64$ $Rf_3 = 0,84$
Fraksi 3	-	$Rf_1 = 0,44$ $Rf_2 = 0,52$

Dari data hasil perhitungan Rf pada fraksi 1-5, fraksi 3 yang dilanjutkan pada tahap pemurnian karena memiliki pola pemisahan yang paling baik, dan nilai Rf yaitu 0,44, 0,52 positif mengandung steroid setelah disemprot menggunakan pereaksi penampak bercak Lieberman-Burchard. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Afriza, 2008 yang mengisolasi senyawa triterpenoida/steroid dari ekstrak n-heksana daun tumbuhan ruku-ruku (*ocimum sanctum* l.) dengan nilai Rf 0,50.

Tabel 6. Berat Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Konvensional

Fraksi	Berat (mg)
F1	15
F2	98
F3	187
F4	39
F5	27

Pemurnian pada teknik kromatografi lapis tipis preparatif dilakukan pada fraksi 3 dengan berat 187 menggunakan eluen n-hexan : etil asetat (7:3). Hasil kromatografi lapis tipis preparatif, diperoleh 2 pita. Pita 1 dan 2 dikerok dan dilarutkan dengan etil asetat

p.a lalu dilakukan pemisahan isolat dari gel silika menggunakan teknik sentrifugasi. Isolat 1 dan 2 dilakukan pengujian dengan menggunakan pereaksi penampak bercak Lieberman-Burchard. Dari hasil pengujian, isolat 1 positif mengandung steroid.

Isolat yang diperoleh kemudian dilanjutkan uji kemurnian dengan metode kromatografi lapis tipis dua dimensi dan multi-eluen yaitu n:heksan : etil asetat (7:3), kloroform : aseton (9:1). Hasil elusi multi eluen ini tetap menunjukkan adanya noda tunggal. Berdasarkan hal tersebut, diduga isolat yang diperoleh telah murni.

Isolat pita 1 yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan instrumen UV-Vis dan IR (Lampiran 11 dan 12). Dari hasil spektrum UV-Vis panjang gelombang maksimum pada 252 nm diduga terjadi karena adanya eksitasi elektron yang berasal dari adanya ikatan rangkap dua dari cincin senyawa steroid. Transisi pada panjang gelombang senyawa isolat menunjukkan pergeseran batokromik yang disebabkan oleh perubahan pelarut atau adanya suatu ausokrom (Sudjadi, 1983 dan Mulja, 1995).

Tabel 7. Hasil Pembacaan Spektrum IR pada Isolat 1

No.	Bilangan Gelombang Isolat (cm ⁻¹)	Daerah Frekuensi (cm ⁻¹)		Prediksi Gugus Fungsi
		Pustaka Silverstein	Pustaka Harmita	
1.	798,53	675-870	1000-650	=CH (Alkena)
2.	2854,64	2960-2850	3000-2850	C-H (Alkana)
3.	2924,09	2960-2850	3000-2850	C-H (Alkana)
4.	1091,71	1300-1080	1300-1000	C-O (Ester)
5.	1741,72	1760-1690	1730-1750	C=O (Ester)
6.	1544,98	1600-1500	-	C=C (Aromatik)
7.	1647,21	1680-1640	1680-1600	C=C (Alkena)
8.	3444,87	3600-3000	3500-3200	O-H (Bebas)
9.	3610,74	3640-3610	3650-3600	O-H (Terikat)

Data spektrofotometri infra merah (IR) menunjukkan adanya serapan dengan intensitas kuat pada frekuensi 798,53 cm⁻¹, 2854,64 cm⁻¹, dan 2924,09 cm⁻¹ mengindikasikan adanya gugus C-H. Kemudian adanya serapan dengan intensitas kuat pada frekuensi 1091,71 cm⁻¹ mengindikasikan adanya gugus C-O. Terdapat intensitas sedang-lemah pada frekuensi 1741,72 cm⁻¹ dan 1647,21 cm⁻¹ menunjukkan adanya ikatan C=C. Terdapat intensitas sedang pada panjang gelombang 3444,87 yang mengindikasikan adanya gugus O-H terikat dan serapan pada frekuensi

3610,74 mengindikasikan adanya gugus O-H bebas (Harmita, 2014 dan Silverstein, 2005).

Dari hasil analisis data spektrofotometri Infra Red (IR) diduga isolat pita 1 merupakan senyawa steroid dengan adanya gugus fungsi C-H, C-O, C=O, C=C, dan O-H. Keberadaan senyawa steroid pada isolat pita 1 diduga karena adanya gugus fungsi penciri steroid dan didukung oleh data spektrofotometri UV-Vis dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 252 nm yang menunjukkan adanya steroid.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian isolasi dan karakterisasi senyawa steroid ekstrak etil asetat teripang batu, isolat pita 1 yang diperoleh diduga merupakan senyawa steroid yang didukung oleh uji golongan senyawa pada ekstrak yang menunjukkan hasil positif mengandung steroid, hasil identifikasi isolat menggunakan pereaksi spesifik positif mengandung steroid dan didukung oleh data spektrofotometri UV-Vis yang mempunyai absorbansi maksimal pada panjang gelombang 252 nm dan data spektrofotometri FT-IR yang menunjukkan gugus fungsi C-H, C-O, C=C, dan O-H.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M., 1997, *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan*, Edisi I, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Afriza, A., 2008, *Isolasi Senyawa Triterpenoida/Steroid dari Ekstrak n-Heksana Daun Tumbuhan Ruku-ruku (Ocimum sanctum L.)*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Bernard, F and Joseph, S., 1999, *Thin Layer Chromatography*, 4th Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.
- Dance, S.K., Lane and Bell. J.D., 2003, *Variation in Short-term Survival of Cultured Sandfish (Holothuria Scabra) Released in Mangrove-seagrass and Coral Reef Flat Habitats in Solomon Islands Aquaculture*, **220** : 495-505.
- Dence, J.B., 1980, *Steroids and Peptides*, John Willey and Sons. New York.
- Departemen Kelautan dan Perikanan, 2006, *Statistik Kelautan dan Perikanan Indonesia 2005*, Departemen Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1987, *Analisis Obat Tradisional*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989, *Materia Medika Indonesia*, Jilid V, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Estradivari, Handayani, C., Firmansyah, F., Yusuf, M. dan Santiadji, V., 2017, *Kawasan Konservasi Perairan: Investasi Cerdas untuk Perlindungan Keanekaragaman Hayati Laut dan Membangun Perikanan Indonesia*, WWF, Jakarta, Indonesia.
- Fessenden, 2003, *Kimia Organik*, Erlangga, Jakarta.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2012, *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, Indonesia.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2008, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Goat, L.J. and Toshihiro, A. 1997. *Analysis of Sterols*. Blackie Academic & Profesional. London.
- Gosner, K.L., 1971, *Guide to Identification of Marine and Estuarine Invertebrates*, John Wiley & Sons, New York.
- Gritter, R.J. dan Bobbits, J.M., 1991, *Pengantar Kromatografi*. Edisi II, Penerbit ITB, Bandung.
- Gritter, R.J., Arthur, M.B., dan Schwarting, E., 1985, *Pengantar Kromatografi*, Edisi ke-2, Institut Teknologi Bandung : Bandung.
- Harmita, 2014, *Analisis Fisikokimia*, Departemen FMIPA UI, Depok.
- Hostettman, K.M. dan Marston, A., 1995, *Cara Kromatografi Preparatif*, Institute Teknologi Bandung, Bandung