

**SENYAWA STEROID PADA DAUN GAYAM (*Inocarpus fagiferus* Fosb) DAN AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN TERHADAP DIFENILPIKRIL HIDRAZIL (DPPH)**

**I Gusti Agung Putu Surya Adi Krisna, Sri Rahayu Santi, dan Ni Luh Rustini**

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbara*  
*Email : suryaadikrisna@gmail.com*

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa steroid daun gayam dan menguji aktivitasnya sebagai antioksidan. Serbuk kering daun gayam (1000 g) diekstraksi dengan 5000 mL etanol 96% menghasilkan 28,05 g ekstrak kental etanol. Fraksinasi ekstrak kental etanol dengan n-heksana dan kloroform berturut – turut menghasilkan 14,18 g fraksi n-heksana dan 2,21 g fraksi kloroform. Hasil uji steroid dengan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa fraksi n-heksana dan kloroform positif mengandung steroid, namun secara kualitatif kandungan steroid pada fraksi n-heksana lebih besar dibandingkan dengan fraksi kloroform. Pemisahan fraksi n-heksana dilakukan dengan kromatografi kolom silika gel menggunakan campuran pelarut n-heksana : etanol (7:3) sebagai fase gerak menghasilkan 4 kelompok fraksi. Fraksi F1 positif steroid dan relatif murni kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer inframerah serta ultraviolet-visible. Hasil identifikasi menunjukkan isolat steroid (F1) fraksi F1 mempunyai gugus fungsi O=H, C=O, C-H, and C=C tak terkonjugasi. Hasil uji antioksidan menunjukkan isolat steroid bersifat antioksidan terhadap difenilpikril hidrazil (DPPH) dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 4 ppm.

Kata kunci : steroid, *Inocarpus fagiferus* Fosb, antioksidan

**ABSTRACT**

This research aimed to identify steroid compound from leaf of gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) and test its antioxidant activity. Dried leaf powder of gayam was extracted with 5000 mL of 96% ethanol to yield 28,05 g concentrated extract. This extract was then fractionated into n-hexane and chloroform to yield 14,18 g n-hexane and 2,21 g chloroform fractions respectively. The test using Liebermann Burchard reagent showed that both fractions contain steroid, but n-hexane fraction contained more steroid than chloroform fraction. Separation of n-hexane fraction was done using silica gel column chromatography with n-hexane : ethanol (7:3) as eluent and four groups of fraction were obtained. Fraction F1 contained steroid and was relatively pure therefore it was then identified. The infrared and ultraviolet-visible spectra suggest that the isolate (F1 fraction) has functional groups such as O-H, C=O, C-H, and unconjugated C=C and showed  $\lambda_{max}$  at 279,407, and 669 nm. The antioxidant test showed that the isolate had antioxidant activity toward DPPH with IC<sub>50</sub> of 4 ppm.

Keywords : steroids, *Inocarpus fagiferus* Fosb, antioxidants

**PENDAHULUAN**

*Biodiversity* hutan tropis seperti di Indonesia merupakan sumber *chemodiversity* akan senyawa-senyawa bioaktif. Senyawa-senyawa kimia tersebut sebagai *lead compounds* atau senyawa model yang sangat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat atau bahan dasar obat yang sangat berguna pada bidang

kesehatan maupun bidang lainnya. Salah satu senyawa metabolit sekunder yang potensial dieksplorasi dari tumbuhan untuk dikaji aktivitasnya adalah golongan steroid (Achmad, 1986).

Menurut Raffauf (1970) ada dua famili dari kelompok *monokotiledon* dan 20 famili dari kelompok *dikotiledon* mempunyai kandungan steroid yang tinggi. *Fabaceae* merupakan salah

satu famili dari tumbuhan *dikotiledon* yang mengandung steroid. Steroid yang terdapat pada beberapa spesies *Fabaceae* banyak digunakan dalam pengobatan tradisional untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Heyne, 1987) diantaranya sebagai analgesik, antihipertensi, antimikrobal, antibakteri dan antioksidan. Data keberadaan senyawa-senyawa steroid pada tumbuhan dari famili *Fabaceae*, menunjukkan masih banyak spesies lain dari genus ini yang belum diselidiki kandungan kimianya (Collins, 1990).

Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) atau di Bali di kenal dengan nama *gatep* adalah salah satu tumbuhan dari famili *Fabaceae* yang diketahui mengandung senyawa steroid hasil dari skrining fitokimia yang telah dilakukan sebelumnya. Pemanfaatan secara tradisional kulit batang tumbuhan ini sebagai obat disentri dan infeksi saluran kencing telah dilakukan masyarakat Bali sejak dahulu (Segatri, 1999). Santi (2000) melaporkan kulit batang gayam mengandung senyawa golongan triterpenoid dan flavonoid yang berpotensi sebagai antibakteri, serta senyawa golongan steroid dengan aktivitas antioksidan terhadap DPPH (Aditya, 2011).

Berdasarkan pendekatan kemotaksonomi bahwa suatu tumbuhan yang berada dalam satu genus atau famili yang sama akan mengandung senyawa kimia yang sama, (Venkataraman, 1976) dan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan tidak terakumulasi pada satu bagian saja tetapi terdistribusi pada semua bagian tumbuhan (Koji Nakanishi, 1987), dengan demikian diduga pada daun gayam juga akan diperoleh senyawa golongan steroid dan memiliki aktivitas antioksidan. Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa steroid yang terdapat pada daun gayam dan menguji aktivitas antioksidan dari isolat steroid tersebut terhadap difenilpicril hidrazil (DPPH).

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb), yang diperoleh dari daerah Padang Sambian Klod Denpasar Barat. Bahan kimia yang digunakan

meliputi etanol, kloroform dengan kemurnian teknis dan pro analisis, silika gel GF<sub>254</sub> untuk kromatografi lapis tipis dan silika gel 60 untuk uji kromatografi kolom, DPPH (Difenilpicril hidrazil), akuades dan pereaksi uji fitokimia steroid Lieberman-Burchard (asam asetat anhidrida dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat).

### Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, gunting, blender, ayakan, neraca analitik, seperangkat alat gelas, pipet mikro, kertas saring, aluminium foil, corong pisah, penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*), seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom, seperangkat alat spektrofotometer UV-vis dan spektrofotometer inframerah (IR).

### Cara Kerja

#### *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Kulit Batang Gayam*

Ekstraksi 1 kg serbuk kering daun gayam dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama  $\pm$  24 jam. Filtratnya disaring, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama sampai senyawa yang terdapat di dalamnya terekstrak habis. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan pada tekanan rendah dan suhu 40<sup>0</sup>C dengan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) sehingga diperoleh ekstrak pekat etanol dan ekstrak pekat etanol yang diperoleh kemudian ditimbang. Ekstrak pekat etanol dilarutkan dengan campuran etanol-air (7:3) kemudian etanolnya diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sampai habis dan hanya tersisa ekstrak air. Ekstrak air ini kemudian difraksinasi berturut – turut dengan n-heksana dan kloroform sehingga diperoleh tiga fraksi yaitu fraksi n-heksana, kloroform dan air. Fraksinasi menggunakan n-heksana dan kloroform dilakukan berulang kali sampai semua komponen senyawa yang bersifat non polar dan semi polar habis terekstraksi. Ketiga fraksi yang diperoleh diuapkan, ditimbang dan diuji steroid dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Fraksi yang mengandung senyawa steroid paling tinggi kemudian dipisahkan dan dimurnikan dengan kromatografi kolom.

Isolat steroid relatif murni yang diperoleh dari pemisahan dan pemurnian secara kromatografi, kemudian diidentifikasi sifat fisiko-kimianya menggunakan spektrofotometer UV-vis dan IR, serta diuji aktivitas antioksidannya terhadap DPPH.

#### ***Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH***

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara membuat terlebih dahulu larutan induk sampel 100 ppm dengan menimbang 1 mg sampel yang dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan n-heksana sampai tanda batas. Larutan sampel dengan konsentrasi 5, 8, 10 ppm dibuat dengan mengambil larutan induk sebanyak 50  $\mu$ L, 80  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, kemudian dimasukkan ke dalam 4 labu ukur 10 mL. Ke dalam masing – masing labu ukur ditambahkan 2 mL larutan DPPH 1 mM dan diencerkan dengan air sampai tanda batas, kemudian dikocok sampai homogen, dan didiamkan selama kurang lebih 30 menit dan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 515 nm.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Kulit Batang Gayam**

Hasil ekstraksi 1000 g serbuk daun gayam dengan 5000 mL etanol 96% (1500 mL x 3) menghasilkan ekstrak pekat etanol sebanyak 28,05 g. Ekstrak pekat etanol tersebut difraksinasi berturut – turut secara partisi dengan n-heksana dan kloroform, menghasilkan fraksi pekat n-heksana sebanyak 14,18 g dan fraksi pekat kloroform sebanyak 2,21 g. Kedua ekstrak kemudian diuji kandungan steroidnya dengan

pereaksi Lieberman-Burchard dan hasilnya disajikan pada Tabel 1. Hasil uji steroid dengan pereaksi Lieberman-Burchard (Tabel 1) menunjukkan bahwa kedua fraksi yaitu fraksi n-heksana dan fraksi kloroform positif mengandung steroid ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna dari warna hijau menjadi kebiruan, dan fraksi n-heksana memberikan perubahan warna yang lebih jelas dibandingkan fraksi kloroform sehingga secara kualitatif dapat dikatakan kandungan steroid pada fraksi n-heksana lebih besar dibandingkan fraksi kloroform. Oleh karena itu fraksi n-heksana dilanjutkan pada proses pemisahan dan pemurnian.

Tabel 1. Hasil uji steroid fraksi n-heksana dan kloroform

Fraksi pekat	Perubahan warna	Keterangan
n-heksana	hijau menjadi biru terang	+ steroid
Kloroform	hijau menjadi biru	+ steroid

Pemisahan komponen yang terkandung pada fraksi n-heksana dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel sebanyak 80 g dan eluennya berupa campuran pelarut n-heksana – etanol (7:3). Eluen ini digunakan karena memberikan pola pemisahan terbaik dibandingkan dengan campuran eluen yang lain dengan menghasilkan 7 noda yang ditandai dengan kisaran harga Rf yang berjauhan satu sama lain. Hasil pemisahan 2 g fraksi n-heksana menghasilkan 116 eluat yang ditampung setiap 3 mL. Eluat yang mempunyai pola pemisahan yang sama digabungkan sehingga diperoleh empat kelompok fraksi (F1-F4) seperti yang tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemisahan komponen fraksi n-heksana dengan kromatografi kolom

Fraksi (F)	Berat (g)	Warna	Jumlah noda	Harga Rf (cm)
A (1-11)	0,21	Coklat kehijauan	1	0,95
B (12-23)	0,14	Coklat kekuningan	3	0,82 0,40 0,34
C (24-63)	0,13	Kuning kehijauan	2	0,27 0,23
D (63-116)	0,11	Kuning pucat	1	0,21

Keempat kelompok fraksi selanjutnya diuji kandungan steroidnya dengan pereaksi Lieberman Burchard. Hasil uji steroid pada keempat kelompok fraksi seperti dipaparkan pada Tabel 3, yang menunjukkan bahwa fraksi F1 dan F2 positif mengandung steroid dengan menghasilkan perubahan warna dari hijau menjadi biru terang.

Tabel 3. Hasil uji steroid pada keempat kelompok fraksi (F1-F4)

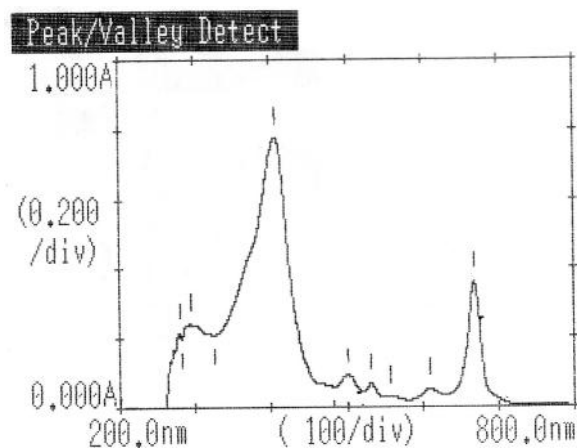
Fraksi	Perubahan warna	Keterangan
F1	hijau menjadi biru terang	+ steroid
F2	hijau menjadi biru	+ steroid
F3	hijau menjadi hijau pudar	- steroid
F4	hijau menjadi hijau pudar	- steroid

Fraksi F1 terdiri dari satu komponen senyawa maka pada isolat fraksi F1 dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan beberapa campuran eluen seperti n-heksana ; n-heksana : etanol (3:2) ; n-heksan : kloroform : etanol (3:1:2) ; n-heksana : etanol (3:1) ; n-heksana : etanol (1:1) yang menunjukkan bahwa fraksi F1 memberikan noda tunggal yang artinya fraksi F1 relatif murni secara KLT.

Hasil identifikasi isolat (fraksi F1) dengan spektrofotometer inframerah (Gambar 1) menunjukkan adanya serapan gugus fungsi karakteristik seperti OH pada  $3444,87\text{ cm}^{-1}$ , C-O alkohol pada  $1166,93\text{ cm}^{-1}$ , C-H alifatik pada  $2926,09\text{ cm}^{-1}$  yang diperkuat dengan munculnya serapan pada  $1454,33\text{ cm}^{-1}$ ,  $1373,32\text{ cm}^{-1}$  dan serapan kuat pada  $839,03\text{ cm}^{-1}$  karena vibrasi tekuk C-H alifatik keluar bidang dari cincin yang bukan aromatis. Selain itu terdapat gugus karakteristik C=O pada  $1739,79\text{ cm}^{-1}$ , C=C yang tidak terkonjugasi dalam kerangka dasar steroid pada  $1614,42\text{ cm}^{-1}$  yang didukung dengan munculnya serapan pada daerah  $977,91\text{ cm}^{-1}$  karena vibrasi tekuk dari C-H ikatan rangkap pada cincin (Silverstain *et al.*, 1991).

Identifikasi dengan spektrofotometer UV-vis (Gambar 2) menghasilkan tiga serapan utama pada panjang gelombang 407; 502 dan 610 nm. Serapan yang terjadi pada panjang gelombang 407 nm kemungkinan disebabkan oleh terjadinya transisi elektronik  $n \rightarrow \pi^*$  dari suatu kromofor C=C. Dugaan ini diperkuat dari data spektrum

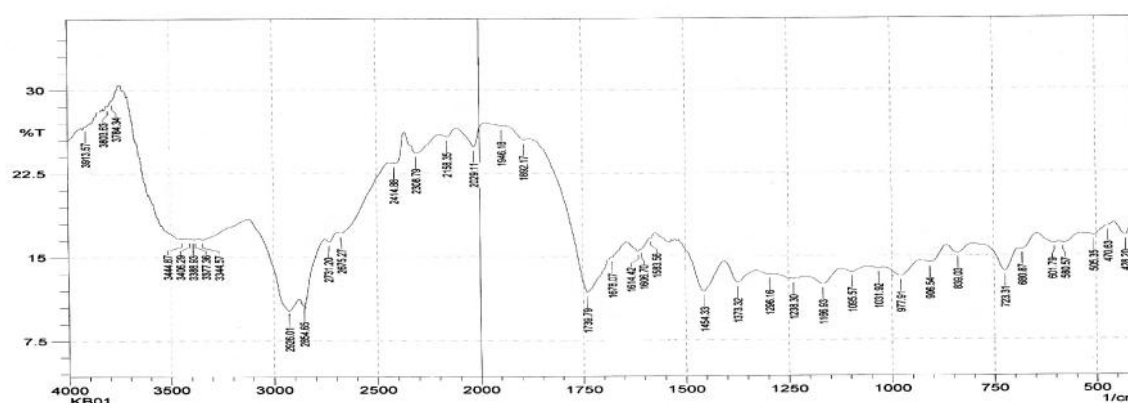
inframerah dengan munculnya serapan dari C=C alifatik pada daerah bilangan gelombang  $1614,42\text{ cm}^{-1}$ . Serapan pada panjang gelombang 502 nm kemungkinan disebabkan terjadinya transisi elektronik  $n \rightarrow \pi^*$  dari suatu aoksokrom O-H yang mempunyai elektron non bonding. Dugaan ini diperkuat dari data spektrum inframerah dengan munculnya serapan dari gugus O=H alkohol pada daerah bilangan gelombang  $3444,87\text{ cm}^{-1}$  (Silverstain *et al.*, 1981; Sastrohamidjojo, 1991). Serapan pada panjang gelombang 610 nm kemungkinan disebabkan terjadinya transisi elektronik  $n \rightarrow \pi^*$  dari suatu kromofor yang mempunyai elektron non bonding seperti pada kromofor C=O. Dugaan ini juga diperkuat dari data spektrum inframerah dengan munculnya serapan dari gugus karbonil pada daerah bilangan gelombang  $1739,79\text{ cm}^{-1}$ .



Gambar 2. Spektrum UV-vis dari isolat F1

### Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

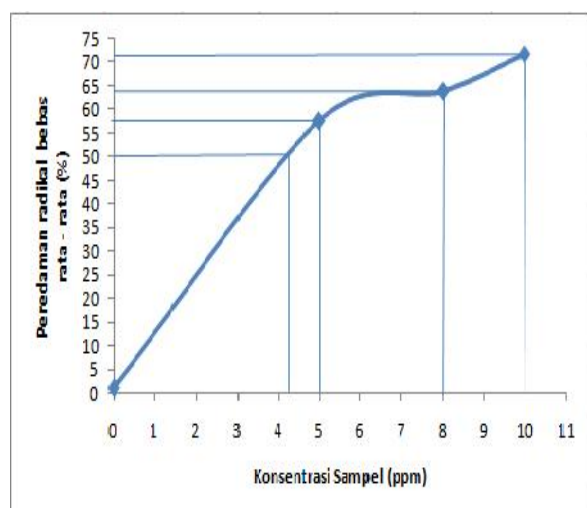
Antioksidan adalah suatu senyawa inhibitor yang bekerja menghambat proses oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang relatif stabil (Sofia, 2008). Suatu senyawa dikatakan memiliki sifat antioksidan bila senyawa tersebut mampu mendonasikan satu atau lebih elektron kepada senyawa prooksidan, kemudian mengubah senyawa oksidan menjadi senyawa yang lebih stabil (Winarsi, 2005).



Gambar 1. Spektrum Inframerah dari isolat F1

Tabel 4. Data absorbansi dan perhitungan % peredaman radikal bebas DPPH

Konsentrasi	Absorbansi (A)	% Peredaman radikal bebas (%)	Rata-rata % Peredaman radikal bebas (%)
Kontrol	0,5859	-	-
	0,5163	-	
	0,4981	-	
10 ppm	0,1563	73,32	71,51
	0,1501	70,93	
	0,1480	70,29	
8 ppm	0,1989	66,05	63,73
	0,1921	62,79	
	0,1875	62,36	
5 ppm	0,2343	60,01	57,42
	0,2297	55,51	
	0,2154	56,75	



Gambar 3. Grafik hubungan antara konsentrasi sampel dengan aktivitas peredaman radikal bebas rata – rata

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan metode hitung  $IC_{50}$ . Uji ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi yang dibutuhkan untuk bisa meredam 50% radikal bebas DPPH yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari plot grafik hubungan antara konsentrasi senyawa uji dengan persentase peredaman radikal bebas rata – rata, seperti ditunjukkan pada Gambar 3.

Grafik pada Gambar 3 menunjukkan bahwa isolat memberikan  $IC_{50}$  pada konsentrasi sekitar 4 ppm. Nilai  $IC_{50}$  yang kecil menunjukkan bahwa senyawa uji tersebut mempunyai efektivitas penangkap radikal yang baik. Aktivitas antioksidan yang dihasilkan isolat kemungkinan diakibatkan karena adanya gugus O-H pada kerangka dasar steroid.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer UV-vis dan spektrofotometer inframerah menunjukkan isolat steroid (fraksi F1) kemungkinan mengandung gugus fungsi O-H, C=O, C-H, dan C=C yang tidak terkonjugasi. Hasil uji antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa isolat steroid yang terdapat pada daun gayam dapat digunakan sebagai antioksidan karena memberikan nilai IC<sub>50</sub> pada konsentrasi 4 ppm.

### Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menganalisis senyawa steroid lain yang masih terdapat pada fraksi n-heksana daun gayam, dan menguji aktivitas antioksidannya untuk mengetahui apakah semua senyawa steroid yang terkandung pada fraksi n-heksana daun gayam dapat digunakan sebagai antioksidan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada bapak Dr. Drs. Manuntun Manurung, ibu Dra. Iryanti Eka Suprihatin, M.Sc., Ph.D., dan bapak Drs. Made Arsa, M.Si. yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Achmad, S.A., 1986, *Kimia Organik Bahan Alam*, Universitas Terbuka, Jakarta

- Aditya, 2011, Penelusuran Senyawa Antioksidan pada Kulit Batang Gayam, *Skripsi*, Jurusan Kimia, F MIPA, Universitas Udayana
- Collins, R. H., 1990, *Inventarisasi Tanaman Obat Indonesia*, Edisi III, Depkes RI Badan Pengembangan dan Penelitian Kesehatan, Jakarta
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid 3, Departemen Kehutanan, Jakarta
- Koji, N. and Griffin, W.J., 1987, *Natural Products of Chemistry, A Comparison of Four Species of Scientific, Planta Meica*, Tokyo
- Raffauf, R.F., 1970, *A Handbook of Alkaloids and Alkaloid Containing Plants*, Willey-Interscience, New York
- Santi, S. R., 2000, Isolasi dan Karakterasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*), *Tesis*, Pasca Sarjana, Prodi Ilmu Kimia, Universitas Padjadjaran, Bandung
- Sastrohamidjojo, H., 1991, *Kromatografi*, Edisi Kedua, Liberty, Yogyakarta
- Segatri Putra, 1989, *Taru Premana, Khasiat Tanam-tanaman Untuk Obat Tradisional*, Upada Sastra, Denpasar
- Silverstein, R. M., Basler, G.c., and Morrill, T.C., 1991, *Spectrometric Identification of Organic compound*, John willey & Sons, Inc., Singapore
- Sofia, D., 2008, Antioksidan dan Radikal Bebas, available from: <http://www.chem-is-try.org/?sect=artikel&ext=81>, 5 November 2012
- Venkataraman, K., 1976, *A Synopsis of The Genus Natural Phenolic Pigments*, Missouri Botanical Garden, USA
- Winarsi, H., 2005, *Isoflavon*, Gadjah Mada Universitas Press, Yogyakarta