

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI SENYAWA GOLONGAN STEROID PADA DAUN BERINGIN (*Ficus benjamina* L.)

LUH GEDE SUMAHIRADEWI

UNIVERSITAS 45 MATARAM

ABSTRACT

Steroid extraction from Banyan leaves in this research was conducted. Steroid extract that was gained, was tested for its antifungal activity. Maseration of 1000 g dry powder of Banyan leaf with ethanol yielded 27.13 g ethanol extract and actively impeded the growth of Candida albicans with 4.5 mm zone of resistance on the concentration of 1000 ppm. Ethanol extract that was partiaded with n-hexane resulting 11.39 g of n-hexane thick extract. Subsequently, ethanol thick extract was dissolved into the water with the 7:3 ratio of ethanol-water. Ethanol excess was evaporated, and then partiaded with chloroform to result chloroform extract and water extract with 0.7 g and 2.21 g in weight respectively. The result of antifungal test from each extracts didn't show zone of resistance, whereas the fitochemical test by using Lieberman-Burchard reagent showed that n-hexane thick extract was the most positively contain steroid.

Separation of n-hexane thick extract by using column chromatography yielded 0.0123 g of isolate that positively contain steroid (Fraction F₈). Further separation with respect to fraction F₈ by using preparative thin layer chromatography method, resulted 6 fractions (Fraction F_{8.1}, F_{8.2}, F_{8.3}, F_{8.4}, F_{8.5}, F_{8.6}), with the most positively contain steroid was fraction F_{8.1}, and this fraction didn't show antifungal activity toward Candida albicans.

The result of fraction F_{8.1} identification (isolate) by using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) and infrared spectrophotometer showed that the isolate was probably a mixture of two steroid-alkaloid group compounds, which was an isomer with C₂₄H₂₇O₄N as the chemical formula and possessed characteristic functional groups i.e. free -OH, aldehyde C-H, C≡N stretching, aldehyde C=O, aliphatic N-H, aliphatic C=C, aliphatic C-H bending, C-O-H, C-O-C stretching, and aliphatic C-N.

Keywords: Ficus benjamina L., Steroid, Isolation, and Antifungal.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara berkembang yang mempunyai banyak sumber daya alam, baik sumber daya alam hayati maupun non hayati. Kondisi Indonesia yang cukup subur ini disebabkan oleh letak geografisnya yang dilewati oleh garis khatulistiwa dan memiliki iklim tropis dengan curah hujan rata-rata tinggi sepanjang tahun yang sangat cocok bagi tumbuh dan berkembangnya berbagai macam tumbuhan (Rusmarini, 2003).

Pemanfaatan obat tradisional yang berasal dari tumbuhan untuk meningkatkan derajat kesehatan masyarakat telah dikenal dan berkembang jauh sebelum adanya pengobatan secara modern. Meskipun perkembangan obat di era modern sekarang ini telah banyak menggunakan teknologi tinggi, namun penawaran, permintaan, dan penggunaan obat-obatan tradisional masih tetap ada (Rusmarini, 2003).

Banyak tumbuhan Indonesia bermanfaat sebagai obat tradisional, seperti tumbuhan beringin (*Ficus benjamina* L.). Beringin merupakan salah satu tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia. Di Bali tumbuhan ini merupakan salah satu pohon yang dianggap keramat. Sesuai dengan filsafat Hindu, daun beringin dipakai sebagai sarana upacara ngaben, upacara mamukur (kelanjutan ngaben) dan ritual lainnya, bahkan daun beringin juga wajib ada dalam komponen pembuatan penjor (bambu yang dihias janur pada saat hari raya Galungan) (Anonim, 2007 a).

Secara tradisional beringin memiliki potensi sebagai tumbuhan obat, karena dapat digunakan untuk mengobati penyakit pernapasan, penyakit kulit, penyakit demam tinggi, nyeri rematik sendi, luka terpukul (memar), influenza, radang saluran napas (bronchitis), batuk rejan (pertusis), dan disentri (Anonim, 2005;

Mousa *et al.*, 1994). Menurut Dalimartha (1999) akar udara dan daun beringin berkhasiat sebagai antiperitik, antibiotik, antiradang, peluruh keringat (diaforetik), dan peluruh kencing (deuretik).

Akar udara tumbuhan beringin mengandung senyawa-senyawa aktif seperti asam-asam amino, fenol, dan gula. Selain itu daun, akar dan kulit batang beringin mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, dan polifenol (Anonim, 2007 b). Hasil uji fitokimia ekstrak kental etanol daun beringin diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, steroid, saponin, dan polifenol. Secara kualitatif dilihat dari intensitas warna sebagai reaksi positif dari beberapa pereaksi fitokimia, diduga bahwa senyawa golongan steroid sebagai kandungan utama (mayor) pada daun beringin.

Uji pendahuluan aktivitas antifungi ekstrak kental etanol daun beringin terhadap *Candida albicans* menunjukkan ekstrak ini aktif menghambat pertumbuhan fungi dengan zona hambatan sebesar 4,5 cm pada konsentrasi uji 1000 ppm. Mengingat kandungan senyawa golongan steroid yang mayor dalam ekstrak kental etanol daun beringin serta aktivitasnya sebagai antifungi, untuk itu dalam penelitian ini dilakukan isolasi senyawa golongan steroid dari ekstrak daun beringin dan menguji aktivitas antifungi isolat steroid terhadap *Candida albicans*.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun beringin (*Ficus benjamina* L.) yang diambil di daerah Bukit Jimbaran Atas, Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung, Bali. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu n-heksana (teknis dan p.a), kloroform (teknis dan p.a), etanol teknis 96%, akuades, etilasetat (teknis dan p.a), metanol (teknis dan p.a), kloroform (teknis dan p.a), silika gel GF₂₅₄, silika gel 60, dan pereaksi pendeteksi steroid (Liebermann-Buchard). Bahan uji hayati yang digunakan berupa fungi *Candida albicans* yang diperoleh di Laboratorium Mikrobiologi UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Propinsi Bali.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, penggiling (blender), stoples, seperangkat alat gelas, batang pengaduk, kertas saring, aluminium foil, desikator, botol semprot, neraca analitik, corong pisah, pipet ukur, pipet volum, cawan petri, *hotplate*, seperangkat alat kromatografi kolom, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, lampu UV untuk penampak noda, *rotary vacuum evaporator*, seperangkat alat spektrofotometer Inframerah dan seperangkat alat KG-SM.

Cara kerja

Sebanyak 1 Kg serbuk kering daun beringin dimaserasi dengan pelarut etanol, hingga diperoleh ekstrak kental etanol. Ekstrak kental etanol kemudian dipartisi menggunakan n-heksana hingga diperoleh ekstrak kental etanol dan ekstrak kental n-heksana. Terhadap ekstrak kental etanol kemudian ditambahkan etanol : air (7:3), dan ekstrak airnya kemudian dipartisi dengan kloroform. Hingga diperoleh ekstrak kental air dan kloroform. Ekstrak kental n-heksana, kloroform, dan air kemudian diuji fitokimia dan diuji antifungi, dimana fraaksi yang paling positif mengandung steroid dilanjutkan untuk dipisahkan dan dimurnikan. Pemisahan dan pemurnian senyawa steroid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom sampai diperoleh isolate yang positif steroid yang relative murni yang dapat diuji kemurniannya menggunakan analisis KLT pada berbagai campuran fase gerak. Selanjutnya isolate relative murni diidentifikasi menggunakan kromatografi gas- spektroskopi massa, spektrofotometer infra merah dan diuji antifunginya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan fraksionasi

Hasil maserasi sebanyak 1 Kg serbuk kering daun beringin dengan ± 3,5 L etanol teknis 96% menghasilkan 27,13 g ekstrak kental etanol berwarna hijau pekat. Ekstrak kental etanol ini kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana sehingga diperoleh ekstrak etanol dan ekstrak kental n-heksana yang berwarna hijau pekat sebanyak 11,39 g. Ekstrak etanol hasil partisi kemudian dilarutkan dalam 700 mL campuran etanol-air (7:3), pelarut etanolnya diuapkan kemudian dipartisi dengan kloroform (50x10 mL), sehingga diperoleh ekstrak kental

kloroform yang berwarna hijau pekat sebanyak 0,7 g dan ekstrak kental air sebanyak 2,21 g yang berwarna hijau. Ekstrak kental n-heksana, kloroform, dan air kemudian diuji aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* dan terhadap masing-masing ekstrak kental ini juga dilakukan uji fitokimia. Ekstrak air dan ekstrak n-heksana positif steroid, tetapi ekstrak kental n-heksana yang paling positif dan terbanyak secara kuantitas hingga ekstrak ini yang dilanjutkan untuk dipisahkan dan dimurnikan.

Pemisahan dan pemurnian

Pemisahan ekstrak kental n-heksana menggunakan kromatografi kolom dengan eluen kloroform : etilasetat (4:1).

Hasil kromatografi kolom adalah 233 eluat (tiap eluat 3 mL) yang digabungkan menjadi empat belas kelompok fraksi. Masing-masing fraksi diuapkan, ditimbang serta diuji fitokimia untuk mengetahui fraksi yang positif mengandung senyawa steroid.

Berdasarkan uji fitokimia, fraksi F8 merupakan fraksi yang paling positif steroid dilihat dari intensitas warna yang paling tajam. Fraksi F₈ ini kemudian dimurnikan lebih lanjut menggunakan kromatografi lapis tipis preparative, dengan fase gerak kloroform : etilasetat (4:1). Hasil kromatografi kolom preparatif diperoleh 6 fraksi, yang kemudian diuji fitokimianya.

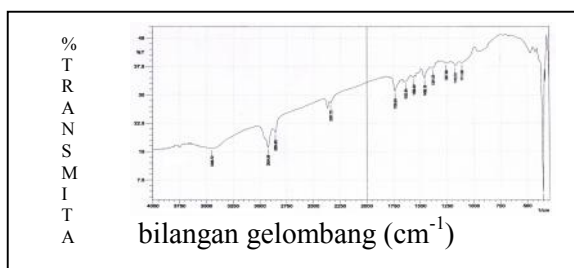
Fraksi F_{8,1} dengan berat ±0.0019 g yang positif mengandung senyawa steroid, kemudian diuapkan dan diuji kemurniannya secara KLT dengan berbagai fase gerak menunjukkan adanya noda tunggal. Jadi senyawa tersebut terdiri dari satu komponen senyawa yang relative murni secara kromatografi lapis tipis.

Data spektrofotometer infra merah

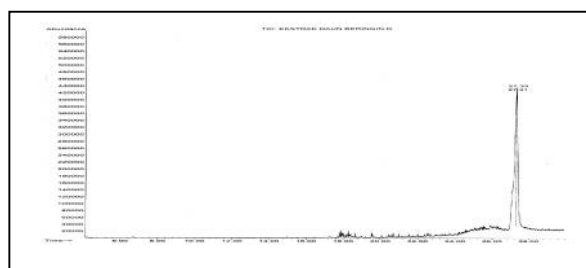
Spektrum infra merah isolat F_{8,1} ekstrak n-heksanan ditunjukkan pada Gambar 1 di bawah .

Spektrum inframerah tampak adanya serapan pada daerah bilangan gelombang 3448,72 cm⁻¹ dengan intensitas sedang dan lebar menunjukkan adanya gugus O-H bebas. Hal ini diperkuat dengan adanya serapan yang sangat lemah dan lebar pada daerah bilangan gelombang 1381,03 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus C-O-H.

Pita serapan di daerah 2924,09 cm⁻¹ dan 2854,65 cm⁻¹ dengan intensitas sedang dan tajam menunjukkan adanya gugus C-H aldehyd. Adanya gugus C-H aldehyd diperkuat dengan adanya serapan di daerah bilangan gelombang 1735,93 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus C=O aldehyd. Sedangkan pita serapan yang sedang dan tajam pada panjang gelombang 2337,72 cm⁻¹ menunjukkan adanya C≡N *strecing*. Hal ini diperkuat dengan adanya pita serapan yang sangat lemah dan tajam pada daerah bilangan gelombang 1635,64 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus N-H alifatik dan pita serapan yang sangat lemah dan lebar pada daerah bilangan gelombang 1172,72 cm⁻¹ dan 1111,00 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus C-N alifatik. Spektrum inframerah juga menunjukkan adanya gugus C=C alifatik *strecing* yang ditunjukkan dengan adanya serapan yang sangat lemah dan tajam di daerah bilangan gelombang 1558,48 cm⁻¹. Gugus lain yang terdapat pada spektrum inframerah yaitu gugus C-H alifatik *bending* dengan serapan sangat lemah dan tajam pada bilangan gelombang 1458,18 cm⁻¹ dan gugus C-O-C *strecing* yang mempunyai serapan sangat lemah dan lebar di daerah bilangan gelombang 1257,59 cm⁻¹. Berdasarkan data spektrum inframerah diatas menunjukkan bahwa isolat mempunyai gugus fungsi -OH bebas, C-H aldehyd, C≡N *strecing*, C=O aldehyd, N-H alifatik, C=C alifatik, C-H alifatik *bending*, C-O-H, C-O-C *strecing*, dan C-N alifatik.



Gambar 1. Spektrum inframerah hasil pengukuran Isolat F_{8,1}



Gambar 2. Kromatogram fraksi isolat (F_{8,1}) dari daun beringin

Data Kromatografi Gas- Spektroskopi Massa (KG-MS)

Kromatogram hasil analisis isolat ($F_{8.1}$) dengan spektrofotometer KG-SM memperlihatkan dua puncak seperti dipaparkan pada Gambar 2 di atas

Kedua puncak tersebut memiliki waktu retensi berturut-turut 27,291 dan 27,329 menit. Puncak-puncak tersebut kemudian dianalisis untuk mendapatkan spektrum massa. Hasil spektrum massa masing-masing puncak kemudian dibandingkan dengan spektrum massa *database* Wiley7 sehingga dapat diduga senyawa-senyawa yang terkandung pada fraksi $F_{8.1}$ (isolat) dari ekstrak n-heksana daun beringin. Berdasarkan kromatogram Gambar 2. diketahui bahwa fraksi $F_{8.1}$ (isolat) mengandung dua komponen senyawa mayor yang sulit dipisahkan pada kondisi alat yang digunakan.

Identifikasi senyawa pada puncak 1 (t_R 27,329 menit) dan puncak 2 (t_R 27,291 menit)

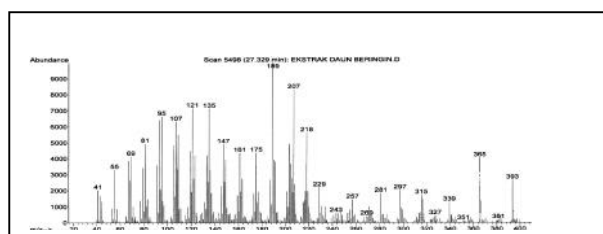
Puncak 1 dengan waktu retensi 27,329 menit dan puncak 2 dengan waktu retensi 27,291 menit menghasilkan spektrum massa seperti dipaparkan pada Gambar 3.

Berdasarkan spektrum massa di atas dapat dilihat bahwa senyawa pada puncak 1 dan puncak 2 menunjukkan ion molekul (M^+) dengan m/z 393 dengan puncak ($M+1$) pada m/z 394 dan puncak ($M+2$) pada m/z 395. Dilihat dari spektrum massa dan berat molekul yang sama menunjukkan bahwa kemungkinan kedua senyawa tersebut adalah senyawa yang saling berisomer. Dimana senyawa isomer adalah senyawa yang memiliki rumus molekul yang sama tetapi susunan atomnya berbeda.

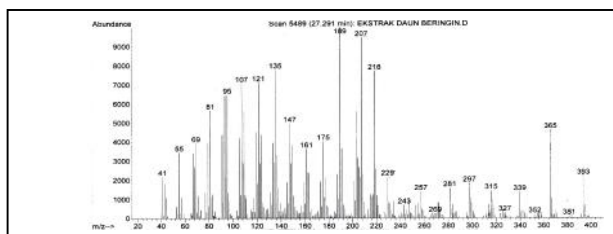
Kelimpahan/intensitas $\%(M+1)$ sebesar 26,58% dan $\%(M+2)$ sebesar 5% diperoleh dengan menggunakan rumus perhitungan intensitas seperti yang dipaparkan pada Lampiran 16. Menurut hasil perhitungan kelimpahan/intensitas ($M+1$) sebanding dengan jumlah atom C yaitu sebanyak 24 dan kelimpahan ($M+2$) sebanding dengan 4 atom O. Berat molekul yang ganjil mengindikasikan senyawa tersebut kemungkinan mengandung atom N. Adanya atom N disini dipertegas dengan data yang terdapat pada spektrum inframerah yaitu pada bilangan gelombang $1635,64\text{ cm}^{-1}$ dan $2337,72\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus $-N-H$ dan $C\equiv N$.

Berdasarkan berat molekul sebesar 393, jumlah atom C sebanyak 24, jumlah atom O sebanyak 4, dan jumlah atom N sebanyak 1, maka kemungkinan jumlah atom H dari senyawa ini adalah 27. Dengan demikian diduga rumus molekul untuk senyawa puncak 1 dan 2 adalah $C_{24}H_{27}O_4N$ dengan kemungkinan kerangka dasarnya yaitu kolestan (C_{24}) dan jumlah ikatan rangkap (*Double Bond Equivalents/DBE*) sebanyak 12.

Berat molekul yang ganjil pada spektra KG-SM dan adanya gugus $-N-H$, dan $C\equiv N$ pada spektrum inframerah menunjukkan bahwa senyawa steroid yang diperoleh kemungkinan termasuk golongan steroid-alkaloid. Hal ini dipertegas dengan adanya warna floursensi merah yang terdapat pada plat KLT hasil KLT preparatif isolat ($F_{8.1}$) setelah dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Dimana senyawa dikatakan positif alkaloid apabila pada plat KLT memberikan warna floursensi kuning, biru, violet, dan merah (Wagner, *et. al.*,1984).



Gambar 3. a. Spektrum massa puncak 1 dengan waktu retensi 27,329 menit



Gambar 3. b. Spektrum massa puncak 2 dengan waktu retensi 27,291 menit

Uji aktivitas antifungi

Berdasarkan data menunjukkan bahwa isolat ($F_{8.1}$) tidak memberikan zona hambat pada pertumbuhan *Candida albicans* pada konsentrasi 1000 ppm yang berarti bahwa isolat tidak memberikan aktivitas sebagai antifungi, tetapi justru pada gabungan beberapa komponen seperti steroid, flavonoid, alkohol, saponin, dan

polifenol pada ekstrak kental etanol mempunyai aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans*. Efek sinergis dari beberapa senyawa inilah yang berperan menghambat aktivitas sebagai antifungi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa : isolat (F_{8.1}) ekstrak n-heksana daun beringin merupakan campuran dari 2 senyawa yang saling berisomer, yang kemungkinan merupakan golongan steroid-alkaloid dengan rumus molekul C₂₄H₂₇O₄N dan nilai DBE sebesar 12, serta mempunyai gugus-gugus fungsi karakteristik yaitu -OH bebas, C-H aldehyd, C≡N *strecing*, C=O aldehyd, N-H alifatik, C=C alifatik, C-H alifatik *bending*, C-O-H, C-O-C *strecing*, dan C-N alifatik.

Isolat (F_{8.1}) yang positif steroid dari daun beringin tidak menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans*.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disarankan : Perlu dilakukan penelitian dan identifikasi lebih lanjut menggunakan teknik spektroskopi yang lain seperti NMR untuk memastikan struktur molekul dari isolat (F_{8.1}) dan perlu dilakukan uji aktivitas antifungi terhadap kandungan metabolit sekunder lain seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan polifenol yang terdapat dalam daun beringin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2005, Tanaman Obat Indonesia : Beringin, Iptek Net, <<http://www.beringin/sentra/informasi/iptek.Htm>> , 16 Juli 2008.
- Anonim, Mei, 24, 2007a, *Kenapa Pohon Beringin ??* , <<http://baliguide.bl2/?p=293>> , 23 Juli 2008.
- Anonim, 2007 b, *Ficus benjamina* L, <http://bebas.vlsm.org/v12/artikel/ttg_tanaman_obat_depkes/buku3/3-028.pdf> , 22 September 2008
- Dalimartha, S., 1999, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia* Jilid I, Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Mousa, O., Vuorela, P., Kiviranta, J., Abdel Wahab, S., Hiltuner, R., and Vuorela, H., 1994, Bioactivity of Certain Egyptian Ficus Species, *Journal of Ethnopharmacology*, 41, (1-2), 71-76.
- Rusmarini, I. A., 2003, *Pengobatan Tanaman Obat Tradisional Bali*, Edisi 2, Puri Damai, Denpasar.
- Wagner, H., Bland, S., Zgainski., 1984, *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, Translated by Th. A. Colored Photographs, Spinger-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 292.