

Karakterisasi Daun Buncis (*Phaseolus Vulgaris L.*) dan Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

¹Risnafiani A.R., ²Endah Rismawati, ³Hilda Aprilia

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Unisba, Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116
e-mail: risnafianiar94@yahoo.com, endah.res@gmail.com, hilda.aprilia@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik dari daun buncis dan mengidentifikasi senyawa steroid yang terkandung di dalamnya. Pada penelitian ini simplisia daun buncis segar dikarakterisasi dengan cara determinasi, uji makroskopik dan mikroskopik, penapisan fitokimia dan penetapan parameter standard simplisia. Adapun ekstrak daun buncis diperoleh dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan kloroform. Pemantauan keberadaan senyawa steroid pada ekstrak dan fraksi daun buncis dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan penampak bercak Liebermann-Burchard (LB), serta Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan senyawa pembanding β -sitosterol. Pemantauan ekstrak dan fraksi menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluena : etil asetat : kloroform (5:1:4). Hasil menunjukkan adanya senyawa steroid yang terdapat di dalam ekstrak dan fraksi n-heksana serta etil asetat yang ditandai dengan reaksi warna positif terhadap penampak bercak LB. Analisis lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi n-heksana dan etil asetat dengan menggunakan KCKT menggunakan fase diam C₁₈ dan fase gerak metanol : aquabidest (85:15), serta pembanding β -sitosterol. Hasil penelitian ini menunjukkan karakteristik dari daun buncis, serta kandungan golongan senyawa kimia yang terdapat pada daun buncis yaitu golongan senyawa steroid, alkaloid, kuinon, tannin, flavonoid, polifenol, monoterpen dan seskuiterpen.

Kata kunci : steroid, daun buncis, KLT, KCKT, β -sitosterol, *Phaseolus vulgaris L.*

A. Pendahuluan

Hingga saat ini bagian tanaman buncis yang banyak dimanfaatkan hanya bagian buah, padahal bagian daun dari buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) juga diketahui memiliki manfaat bagi kesehatan. Daun buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) dapat digunakan sebagai pelancar air susu ibu (ASI) dan penambah zat besi. Dari hasil penapisan fitokimia, daun buncis mengandung senyawa golongan steroid/triterpenoid, tanin katekat dan flavonoid (Yunita, 2007). Distribusi senyawa metabolit sekunder yang terjadi pada tanaman, memungkinkan daun buncis juga mengandung senyawa fitosterol berupa stigmasterol dan β -sitosterol yang merupakan antidiabetes seperti halnya buah buncis. Tetapi sayangnya sejauh ini penelitian mengenai kandungan kimia serta khasiat yang dimiliki daun buncis masih sangat terbatas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid, serta mengetahui karakteristik senyawa steroid yang terkandung di dalam daun buncis (*Phaseolus vulgaris L.*).

B. Landasan Teori

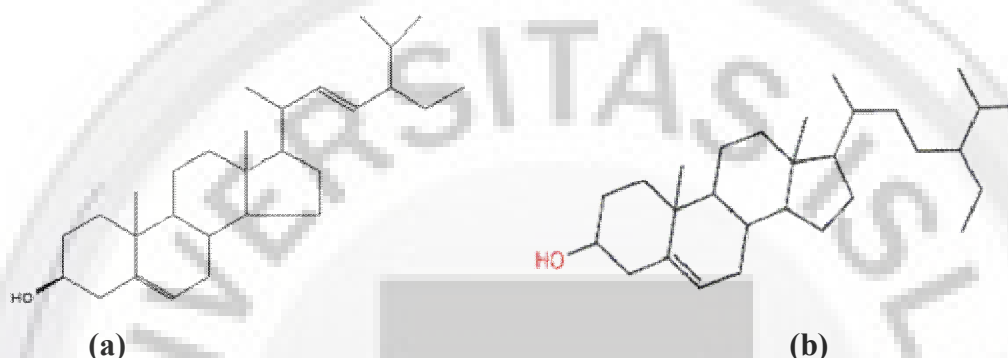
Buah buncis mengandung kalori, protein, lemak, karbohidrat, serat, kalsium, fosfor, zat besi, natrium, kalium, vitamin A, vitamin B₁, vitamin B₂, niacin, vitamin C dan air. Selain itu, buah buncis juga mengandung senyawa fitosterol dengan zat aktif β -sitosterol dan stigmasterol (Andayani, 2003:86).

Daun buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) dari hasil penapisan fitokimia oleh Yunita (2007), daun buncis mengandung senyawa golongan steroid/triterpenoid, tanin katekat

dan flavonoid. Adapun hasil isolasi dari daun buncis diketahui mempunyai gugus -OH, gugus -CH alifatik, gugus C=C, serta tidak memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.

Steroid terdapat pada tumbuhan dan hewan. Kata “sterol” ditujukan khusus untuk steroid alkohol, namun karena semua steroid tumbuhan berupa alkohol dengan gugus hidroksil pada C – 3 maka semua disebut sterol. Sterol tidak larut air namun larut dalam hampir semua pelarut organik. Dilihat dari strukturnya, sterol memiliki satu atau dua atom tambahan. Semua sterol alam mempunyai gugus hidroksil C-3 (Robinson, 1995: 155).

Fitosterol merupakan sterol nabati dan termasuk metabolit sekunder. Sterol yang umum terdapat pada tanaman ialah stigmasterol dan β -sitosterol (Pateh *et al.* dalam Jannah *et al.*, 2013:70).



Gambar 1.2 Struktur kimia (a)stigmasterol (b) β -sitosterol (Robinson,1995:156)

Pelarut yang dipilih untuk pengembang disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang dianalisis, data yang diperoleh dari KLT adalah nilai Rf yang nantinya akan digunakan untuk identifikasi senyawa. Nilai Rf didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel 10-30 μm . Penjerap yang sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa. Volume sampel yang ditotolkan pada plat KLT paling sedikit 0,5 μl . jika volume lebih besar maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

Pengembangan sampel dilakukan dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah berisi fasa gerak. Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit, akan tetapi harus mampu mengelusi lempeng hingga ketinggian lempeng yang telah ditentukan.

Deteksi bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimia dan fisika. Cara fisika yang dapat digunakan adalah dengan cara pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet, sedangkan cara kimia dengan penampak bercak.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT atau biasa disebut HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang seperti bidang farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan. Beberapa perkembangan KCKT terbaru antara lain adalah miniaturisasi sistem KCKT, penggunaan KCKT untuk analisis asam nukleat, analisis protein, analisis karbohidrat, dan analisis senyawa -senyawa kiral (Gholib *et al.*, 2011:378).

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan teknik pemisahan komponen campuran senyawa kimia terlarut dengan sistem adsorpsi pada fase diam padat atau sistem partisi diantara fase diam cair yang terikat pada penyangga padat dan fase gerak cair (Satiadarma *et al.*, 2004:201).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*), analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (*non-volatile*), penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun zwiter ion, isolasi dan pemurnian senyawa, pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama, pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gholib *et al.*, 2011:378).

KCKT dapat memisahkan makromolekul, bahan alam yang tidak stabil, ion, polimer dan berbagai gugus polifungsi dengan berat molekul tinggi. Hasil dari pemisahan pada KCKT merupakan hasil antaraksi spesifik antara molekul senyawa dengan fase diam dan fase gerak (Satiadarma *et al.*, 2004:201).

KCKT memiliki kecepatan dan sensitifitas yang lebih baik dari kromatografi lainnya. Digunakan untuk pengujian semua jenis molekul biologi atau dalam teknik pemurnian (Bintang, 2010:169). Komponen utama KCKT adalah : *reservoir* berisi fase gerak, pompa bertekanan tinggi, injektor, kolom, detektor, rekorder atau integrator. KCKT digolongkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase balik.

C. Hasil Penelitian

Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik

Pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik berfungsi untuk mengetahui ciri khas yang dimiliki oleh daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) secara fisik serta mengetahui jaringan – jaringan dari daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) . Hasil pemeriksaan makroskopik menunjukkan bahwa daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) memiliki tekstur daun yang kasar dan sedikit berbulu, bentuk daun cenderung lebar.

Hasil pemeriksaan mikroskopik pada sayatan melintang daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) menggunakan reagen kloralhidrat menunjukkan adanya jaringan epidermis, kutikula, kloroplas dan stomata

Penetapan Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak

Penetapan parameter standar simplisia dan ekstrak bertujuan untuk memperoleh gambaran karakteristik simplisia maupun ekstrak sebagai upaya standarisasi bahan yang digunakan. Hasil pemeriksaan parameter spesifik simplisia dan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel V.2.** dan hasil pemeriksaan parameter non spesifik dapat dilihat pada **Tabel V. 3.**

Tabel V.2. Hasil Pemeriksaan organoleptik simplisia dan ekstrak

Pengamatan	Simplisia	Ekstrak
Rasa	tidak berasa	pahit
Warna	hijau	hijau kehitaman
Bau	tidak berbau	harum

Tabel V. 3. Hasil pemeriksaan parameter non spesifik simplisia dan ekstrak

Pengujian	Ekstrak
Senyawa polifenol	+
Flavonoid	+
Tannin	+
Kuinon	+
Monoterpen dan seskuiterpen	+
Triterenoid dan steroid	+
Saponin	-
Alkaloid	+

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada simplisia daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang terkandung dalam simplisia.

Tabel V. 4. Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia

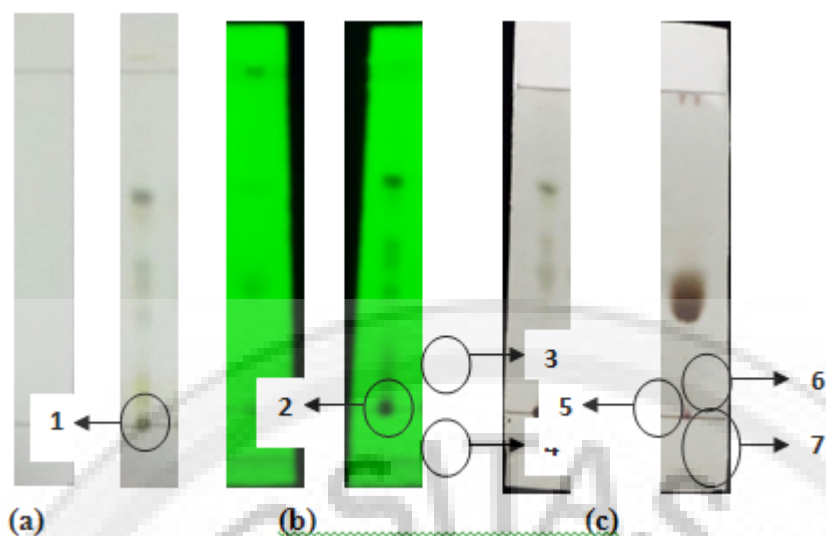
Parameter	Hasil
kadar abu total	20,623
kadar abu tidak larut asam	19,04
kadar sari larut air	8,289
kadar sari larut etanol	2,685
bobot jenis	0,856

Keterangan : (+) : terdeteksi
(-) : tidak terdeteksi

Hasil dari penapisan fitokimia pada simplisia daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) menunjukkan adanya kandungan golongan senyawa kuinon, flavonoid, fenolat, tannin, alkaloid, mono dan seskuiterpen serta steroid. Sedangkan pada ekstrak kental daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) dilakukan penapisan fitokimia golongan steroid dan hasilnya adalah positif.

Pemantauan Ekstrak dengan Menggunakan KLT

Ekstrak kental yang telah didapat dipantau menggunakan KLT dengan eluen toluen : etil asetat : kloroform (5:1:4) dan baku pembanding β -sitosterol, juga disemprot menggunakan penampak bercak spesifik untuk steroid. Hasil pemantauan KLT ekstrak kental daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) dapat dilihat pada **Gambar V. 3.**



Gambar V. 3. Hasil pemantauan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluen : etil asetat : kloroform (5:1:4) diamati (a) di bawah sinar tampak (b) di bawah sinar uv 254 dan (c) disemprot penampak bercak Liebermann Burchard (LB)

Keterangan : 1. Bercak sampel ekstrak daun buncis di bawah sinar tampak

2. Bercak sampel ekstrak daun buncis di bawah sinar uv 254 nm

3. Bercak pembanding β -sitosterol di bawah sinar uv 254 nm

4. Bercak pembanding β -sitosterol di bawah sinar uv 254 nm

5. Bercak sampel ekstrak daun buncis setelah disemprot penampak bercak LB

6. Bercak pembanding β -sitosterol setelah disemprot penampak bercak LB

7. Bercak pembanding β -sitosterol setelah disemprot penampak bercak LB

Dari hasil pemantauan KLT dengan eluen tersebut, dapat dilihat bahwa di bawah sinar tampak hanya terlihat bercak dari sampel daun buncis sedangkan bercak dari pembanding β -sitosterol tidak terlihat. Namun saat dilihat di bawah sinar UV 254 nm bercak pembanding β -sitosterol terlihat. Selanjutnya kromatogram hasil elusi disemprot dengan penampak bercak spesifik steroid Liebermann Burchard agar bercak lebih terlihat. Hasil dari penyemprotan dengan penampak bercak tersebut, bercak dari sampel dan pembanding terlihat lebih jelas. Adapun nilai Rf dari sampel daun buncis ialah 0,7 dan nilai Rf dari pembanding β -sitosterol sebesar 0,5 dan 1. Bercak yang muncul pada sampel diduga β -sitosterol karena nilai Rf dari sampel dan senyawa pembanding berdekatan. Sehingga ekstrak selanjutnya dilakukan fraksinasi untuk analisis lebih lanjut.

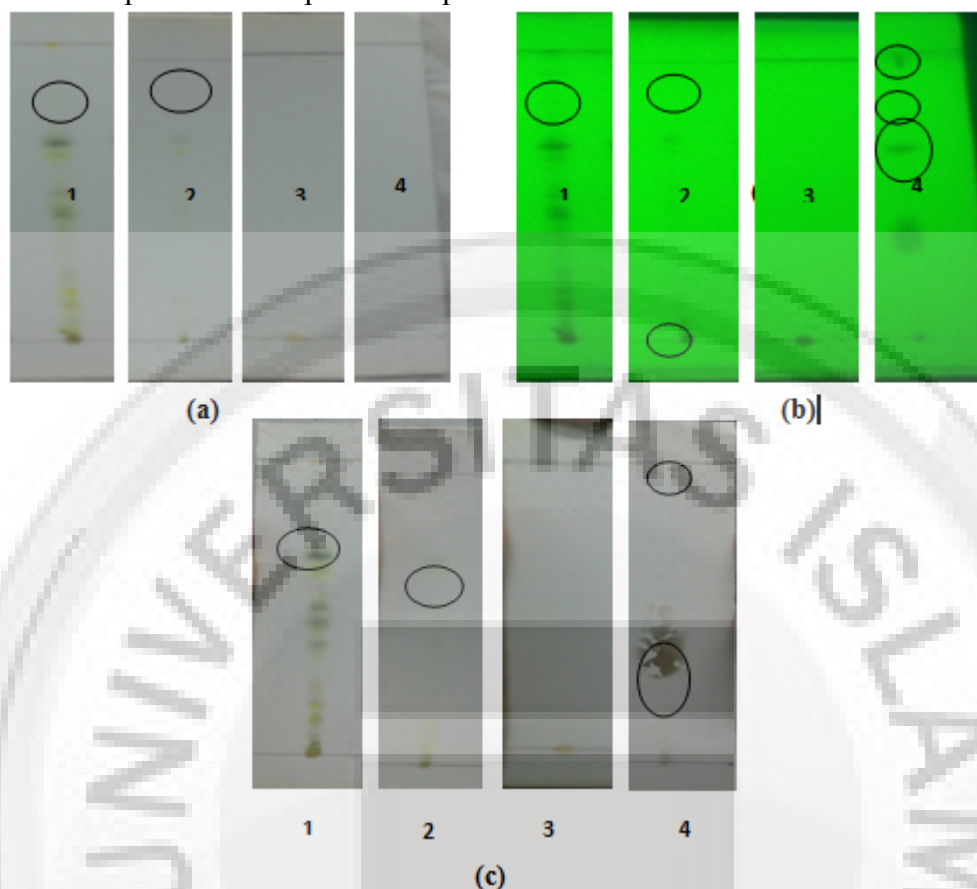
Fraksinasi

Ekstrak pekat daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) yang telah didapat selanjutnya dilakukan ekstraksi cair - cair menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 70% sehingga diperoleh 3 fraksi daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L). Tujuan dilakukannya fraksinasi ini ialah untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya.

Pemantauan Fraksi dengan Menggunakan (KLT)

Terhadap semua fraksi dilakukan pemantauan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menganalisis secara kualitatif keberadaan senyawa steroid. Sebagai fase gerak digunakan toluen : etil asetat : kloroform (5 : 1 : 4) , fase diam silika gel GF₂₅₄ dan

senyawa pembanding β -sitosterol serta penampak bercak spesifik steroid. Hasil identifikasi pada fraksi dapat dilihat pada **Gambar V. 4**.



Gambar V. 4. Hasil pemantauan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluen : etil asetat : kloroform (5:1:4) serta penampak bercak LB (a) dilihat di sinar tampak (b) dilihat di bawah lampu uv 254 nm (c) setelah disemprot penampak bercak

Keterangan :

1. Fraksi n-heksana
2. Fraksi etil asetat
3. Fraksi etanol
4. Pembanding β -sitosterol

Hasil pemantauan KLT dari tiga fraksi daun buncis dan pembanding β -sitosterol menunjukkan bahwa pada fraksi n-heksana bercak terlihat pada sinar tampak, pada sinar UV 254 nm dan setelah disemprot penampak bercak LB, nilai Rf dari fraksi n-heksana sebesar 0,662.

Pada fraksi etil asetat, bercak terlihat pada sinar tampak, sinar UV 254 nm dan setelah disemprot penampak bercak LB. Namun bercak dari fraksi etil asetat ini lebih sedikit dibanding bercak dari fraksi n-heksana sehingga bercak kurang terlihat. Nilai Rf dari fraksi etil asetat ialah sebesar 0,7.

Sedangkan pada fraksi etanol bercak tidak ditemukan, baik pada saat dilihat di bawah sinar tampak, sinar uv 254 nm maupun setelah disemprot penampak bercak LB. Dengan demikian, fraksi etanol tidak bereaksi positif terhadap LB sehingga diduga tidak terdapat senyawa β -sitosterol.

Senyawa pembanding β -sitosterol tidak memiliki bercak saat dilihat di bawah sinar tampak, namun pada saat dilihat di bawah sinar UV 254 nm bercak terlihat dan begitu pun saat disemprot dengan penampak bercak. Nilai Rf dari senyawa pembanding β -sitosterol ialah 0,437; 0,662 dan 0,962.

Dari hasil pemantauan KLT, diduga adanya senyawa β -sitosterol pada fraksi n-heksana dan etil asetat karena adanya pola bercak dari n-heksana dan etil asetat yang mirip dengan pola bercak senyawa pembanding β -sitosterol. Selain itu, nilai Rf dari fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat ada kesamaan dengan nilai Rf dari senyawa pembanding β -sitosterol.

Maka fraksi terpilih untuk selanjutnya dilakukan karakterisasi β -sitosterol menggunakan KCKT ialah fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat. Pada fraksi etanol, tidak terdeteksi adanya senyawa β -sitosterol karena β -sitosterol memiliki sifat yang non polar sedangkan etanol bersifat polar sehingga senyawa β -sitosterol tidak akan tertarik di fraksi etanol.

Identifikasi Senyawa Steroid dengan KCKT

Optimasi sistem KCKT dilakukan dengan tujuan mengetahui fase gerak yang sesuai untuk analisis senyawa β -sitosterol. Fase gerak yang digunakan adalah metanol dan aquabidest dengan perbandingan yang berbeda – beda, yaitu 75 : 25, 70 : 30, 85 : 15, 80 : 20, 90 : 10 dan metanol 100%. Fase diam Zorbax C-18, detektor UV 220 nm dan laju alir 0,7 mL/menit.

Dari hasil pengujian beberapa fase gerak tersebut terpilih satu fase gerak yang memiliki puncak paling baik diantara semuanya, yaitu metanol : aquabidest dengan perbandingan 85 : 15.

Uji kesesuaian sistem merupakan salah satu metode validasi, uji kesesuaian sistem dilakukan dengan tujuan memastikan sistem kromatografi yang akan digunakan dapat beroperasi dengan baik. Larutan stok baku pembanding yang telah dibuat 1000 ppm, diinjeksikan ke dalam KCKT sebanyak 7 kali. Hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada **Tabel V. 5**.

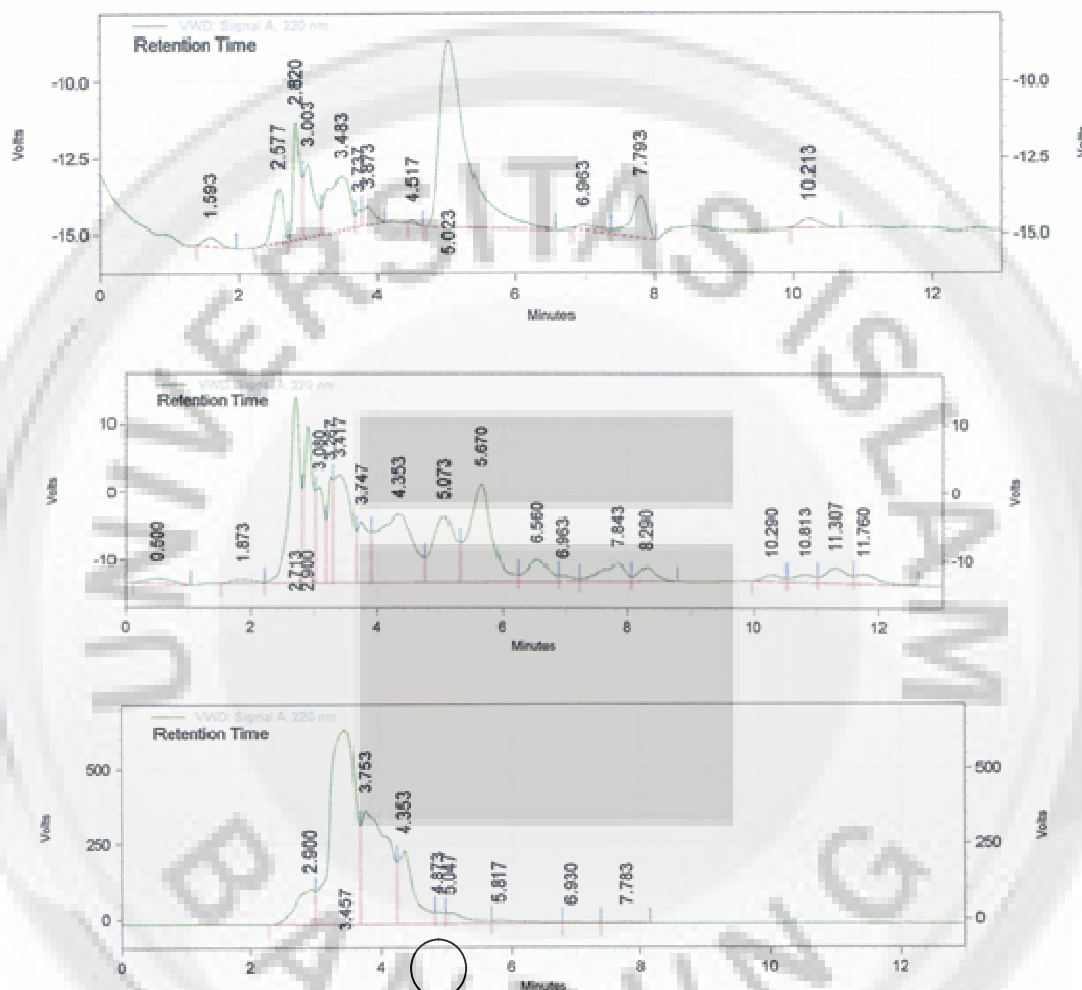
Tabel V. 5. Hasil uji kesesuaian system

Penyuntikan ke	Waktu retensi	Luas area
1	5.03	2597720
2	5.04	2531849
3	5.043	2515491
4	5.043	2527104
5	5.053	2500459
6	5.053	2595454
7	5.05	2531443
\bar{x}	5.044571429	2542788.57
SD	0.008263517	38345.9281
SBR	0.163810091	1.5080266

Nilai SBR yang diperoleh dari uji kesesuaian system ialah sebesar 1,508 % untuk luas area dan 0,163 % untuk waktu retensi. Maka sistem memenuhi syarat karena nilai SBR tidak lebih dari 2%.

Hasil kromatogram yang diperoleh dari baku pembanding dan sampel uji pada pengujian ini tidak memiliki pola dan puncak yang sama. Hal ini bisa terjadi karena sampel merupakan fraksi yang masih terdapat banyak senyawa di dalamnya.

Spiking kromatografi dilakukan untuk meyakinkan pola/puncak yang dihasilkan sampel, yaitu dengan cara menginjeksikan kembali fraksi yang telah dicampur dengan baku pembanding β -sitosterol ke dalam KCKT. Kromatogram hasil pengujian dan adisi dapat dilihat pada **Gambar V. 5.** dan **V. 9.**



Gambar V. 9. Pola kromatogram adisi fraksi etil asetat

Hasil identifikasi menggunakan metode KCKT menunjukkan bahwa baku pembanding β -sitosterol memiliki waktu retensi 5,023 dengan luas area 2882929. Pada waktu retensi kedua sampel fraksi n-heksana dan etil asetat yang relatif sama dengan baku pembanding, tidak ditemukannya pola/puncak yang sama dengan baku pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa pada kedua sampel yakni fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat diduga tidak terdapat kandungan senyawa β -sitosterol.

Hasil adisi menunjukkan bahwa pada adisi fraksi n-heksana memiliki waktu retensi sebesar 5,073 dengan luas area 3936817 dan adisi fraksi etil asetat memiliki waktu retensi sebesar 4,950 dengan luas area 15795132. Dari hasil pengujian sampel menggunakan KCKT, senyawa steroid yang terdeteksi diduga bukan merupakan β -sitosterol.

Daftar Pustaka

- Andayani, Yayuk. (2003). *Mekanisme Aktivitas Antihiperqlikemik Ekstrak Buncis (Phaseolus vulgaris Linn) pada Tikus Diabetes dan Identifikasi Komponen Aktif* [disertasi], Institut Pertanian Bogor, Bogor. .
- Bintang, Maria. (2010). *Biokimia Teknik Penelitian*, Erlangga, Jakarta.
- Gholib, Ibnu et al. (2011). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka pelajar, Yogyakarta.
- Jannah, Hilyatul et al. (2013). *Analisis Senyawa fitosterol dalam ekstrak buah buncis (Phaseolus vulgaris L)*, Universitas Mataram, Mataram.
- Robinson, Trevor. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Penerjemah : Prof. Dr. Kosasih Padmawinata, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Satiadarma, Kosasih et al. (2004). *Asas Pengembangan Prosedur Analisis*, Edisi Pertama, Airlangga University Press, Surabaya.
- Yunita, Selvia. (2007). *Telaah Kandungan Kimia Daun Buncis (Phaseolus vulgaris Linn)* [skripsi], Institut Teknologi Bandung, Bandung.