

Isolasi dan Karakterisasi Steroid dari Daun Cemara Natal
(*Cupressus funebris* Endl.)

SKRIPSI

Memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar sarjana



Oleh:

NIVI SUCI KURNIA
1101523/2011

PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2016

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI STEROID DARI DAUN CEMARA
NATAL (*CUPRESSUS FUNEBRIS* ENDL.)**

Nama : Nivi Suci Kurnia
NIM/TM : 1101523
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Januari 2016

Disetujui Oleh :

Dosen Pembimbing I

Dra. Suryelita, M. Si
NIP. 19640310 199112 2 001

Dosen Pembimbing II

Dra. Sri Bentika Etika, M.Si
NIP. 19620913 198803 2 002

ABSTRAK

Isolasi dan Karakterisasi Steroid dari Daun Cemara Natal (*Cupressus funebris* Endl.)

Oleh : Nivi Suci Kurnia

Daun Cemara Natal (*Cupressus funebris* Endl.) dimanfaatkan sebagai salah satu bahan obat tradisional di Cina. Hasil uji fitokimia menunjukkan daun tanaman tersebut positif mengandung flavonoid, terpenoid, dan steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi steroid dari daun *Cupressus funebris* Endl. (*C. funebris* Endl.). Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi secara maserasi dengan pelarut metanol dan fraksinasi dengan pelarut n-heksana. Pemisahan komponen dari fraksi n-heksana dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan adsorben silika gel 60 dan eluen n-heksana : etil asetat secara *Step Gradien Polarity* (SGP). Uji kemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan beberapa eluen menghasilkan noda tunggal dan uji titik leleh diperoleh *range* 137,7-139,4°C (1,7 °C) yang menggambarkan senyawa telah murni. Dari isolasi 4 Kg daun *C. funebris* Endl. diperoleh kristal steroid berbentuk jarum berwarna putih sebanyak 0,3726 gram (0,01%) dengan titik leleh 138,6°C. Karakterisasi kristal dengan pereaksi kimia *Lieberman-Burchard* (LB) memberikan warna biru kehijauan menunjukkan (+) steroid, dengan Br₂/CCl₄ memudarkan warna pink tua yang menunjukkan kristal steroid mempunyai ikatan rangkap yang jumlahnya sedikit. Spektra UVdiperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm yang membuktikan kristal steroid mempunyai ikatan rangkap tidak terkonyugasi. Hasil analisis kristal steroid dengan spektroskopi inframerah menunjukkan spektrum serapan pada bilangan gelombang 3.442,43 cm⁻¹; 2.941,82 cm⁻¹; 2.869,38 cm⁻¹; 2.337,64 cm⁻¹; 2.984,17 cm⁻¹; 1.651,38 cm⁻¹; 1.453,76 cm⁻¹; 1.370,62 cm⁻¹; 1.052,73 cm⁻¹; 964,59 cm⁻¹; dan 728,34 cm⁻¹. Berdasarkan data tersebut diketahui kristal steroid memiliki gugus -OH, gugus metil, dan ikatan rangkap.

Kata kunci : daun cemara natal (*Cupressus funebris* Endl.) , karakterisasi, steroid

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid dari Daun Cemara Natal (*Cupressus funebris* Endl.)**”. Skripsi ini diajukan untuk menyelesaikan Mata Kuliah Tugas akhir 2 sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana (S1) pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Negeri Padang (UNP).

Penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, petunjuk, arahan, bimbingan, dan masukan yang berharga dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada yang terhormat:

1. Ibu Dra. Suryelita, M.Si. sebagai pembimbing I dalam proses penelitian dan penulisan skripsi ini serta sebagai pembimbing akademik.
2. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si. sebagai pembimbing II proses penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dra. Yustini Ma'aruf, M.Si dan Ibu Dra. Iryani, M.S sebagai penguji.
4. Bapak Budhi Oktavia, M.Si, Ph.D sebagai Ketua Program Studi Kimia Jurusan Kimia FMIPA UNP sekaligus penguji.
5. Bapak Dr. Mawardi, M. Si sebagai Ketua Jurusan Kimia FMIPA UNP.

6. Bapak Ananda Putra, M.Si, Ph.D yang telah membantu dalam penyiapan sampel penelitian dan memberi dorongan semangat.
7. Kedua Orang Tua penulis yang merupakan motivasi terbesar penulis untuk menyelesaikan penulisan skripsi ini.
8. Bapak dan Ibu Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA UNP.
9. Bapak dan Ibu Staf Laboran Kimia FMIPA UNP.
10. Teman-teman kimia 2011 yang telah membantu tenaga dan dorongan semangat selama proses penelitian dan pembuatan skripsi ini.
11. Semua pihak yang telah ikut serta memberikan bantuan dan dorongan yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu.

Semoga segala kebaikan yang telah diberikan menjadi amal ibadah dan dibalas oleh Allah SWT, amiin.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Padang, 11 Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Pembatasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tinjauan Botani	7
2.1.1 Tinjauan Umum Tanaman <i>Cupressus funebris</i> Endl. (<i>C. funebris</i> Endl.).....	7
2.1.2 Morfologi Tanaman <i>C. funebris</i> Endl.....	8
2.1.3 Kegunaan Tanaman <i>C. funebris</i> Endl.	10
2.2 Steroid	10
2.2.1 Tinjauan Umum Steroid.....	10
2.2.2 Klasifikasi Steroid	12
2.2.3 Tata Nama Steroid	15
2.2.4 Sifat Steroid	17

2.2.5 Kegunaan Steroid.....	18
2.2.6 Biosintesis Steroid	19
2.3 Identifikasi Pendahuluan	21
2.4 Isolasi Steroid.....	22
2.4.1 Ekstraksi.....	23
2.4.2 Fraksinasi	25
2.4.3 Pemisahan Komponen	26
2.4.4 Pemurnian dan Uji Kemurnian	29
2.5 Karakterisasi.....	31
2.5.1 Uji Titik Leleh	31
2.5.2 Pereaksi Kimia.....	31
2.5.3 Spektroskopi UV.....	32
2.5.4 Spektroskopi Inframerah.....	34
BAB III METODE PENELITIAN	40
3.1 Waktu dan Tempat	40
3.2 Alat dan Bahan	40
3.2.1 Alat.....	40
3.2.2 Bahan	41
3.3 Prosedur Penelitian.....	41
3.3.1 Persiapan Sampel.....	42
3.3.2 Uji Fitokimia (Uji Pendahuluan)	42
3.3.3 Isolasi Steroid	44
3.3.4 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	49
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	52
4.1 Hasil	52
4.1.1 Ekstraksi dan Fraksinasi	52
4.1.2 Isolasi Steroid	52
4.1.3 Uji Kemurnian	54
4.1.4 Karakterisasi	55

4.2 Pembahasan.....	57
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	64
5.1 Simpulan.....	64
5.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA.....	65
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hidrokarbon Induk Steroid	15
2. Kelarutan Beberapa garam Steroid dalam Air	17
3. Titik Leleh Beberapa Senyawa Steroid	18
4. Daftar beberapa frekuensi vibrasi gugus fungsi pada spektrum inframerah ..	36
5. Karakteristik Bilangan Gelombang dari Golongan Ikatan C-H Regangan Steroid	37
6. Karakteristik Bilangan Gelombang Golongan Steroid Tak Jenuh	38
7. Karakteristik Golongan Bilangan Gelombang Spektrum O-H regangan	39
8. Perbandingan eluen n-heksan dengan etil asetat secara SGP	53
9. Kelompok-kelompok yang diperoleh dari kromatografi kolom	53
10. Hasil uji kemurnian steroid hasil isolasi dengan KLT	55
11. Hasil Pengukuran Spektra IR Kristal Steroid Hasil Isolasi	63
12. Hasil uji pendahuluan kandungan kimia dari daun <i>C. funebris</i> Endl.	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pohon <i>C. funebris</i> Endl.....	8
2. Daun <i>C. Funebris</i> Endl.....	9
3. 1,2-Siklopenteno perhidrofenantren	11
4. Kerangka dasar karbon steroid	12
5. Ergosterol dan Stigmasterol.....	13
6. β -sitosterol dan Kolesterol	13
7. Asam kolat dan Asam litokolat	13
8. Oestron dan Progesteron	13
9. Kortison dan Aldosteron.....	14
10. Digitoksigenin dan Strofantidin.....	14
11. Diosgenin dan Sarsapogenin.....	14
12. Penomoran kerangka steroid.....	15
13. Struktur umum steroid	16
14. Kolest-5-en-3 β -ol (kolesterol) dan 17 α , 21- Dihidroksipregnan-4-en-3, 11,20-trion (kortison)	16
15. Reaksi Biosintesis Steroid	20
16. Contoh Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menunjukkan cara menghitung Rf	27
17. Reaksi LB pada Uji Fitokimia	32
18. Reaksi alkena dengan Brom	32
19. Kristal Steroid Hasil Isolasi.....	54
20. Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	55
21. Uji LB Kristal Steroid Hasil Isolasi.....	56
22. Spektrum Inframerah Kristal Steroid Hasil Isolasi.....	57
23. Spektrum Ultraviolet Kristal Steroid Hasil Isolasi	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Isolasi Senyawa Steroid dari Daun <i>Cupressus funebris</i> Endl. .	68
2. Hasil Uji Pendahuluan	69
3. Hasil Herbarium Sampel.....	70
4. Biosintesis Lengkap Steroid (untuk Kolesterol).....	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cupressus funebris Endl. (*C. funebris* Endl.) atau di Indonesia lebih dikenal dengan cemara natal merupakan salah satu varietas dari genus cemara (*Cupressus*) yang keberadaannya tersebar luas di Indonesia. Tanaman ini memiliki nama lain seperti *Chinese weeping cypress/ funeral cypress* (Inggris) dan *Mourning cypress* (Cina). *C. funebris* Endl. memiliki batang pohon besar yang dapat tumbuh hingga ketinggian 11-24 m. Batangnya berwarna coklat muda hingga coklat tua dan memiliki percabangan yang banyak. Di Indonesia pemanfaatan tanaman ini masih sebatas tanaman hias, namun di Cina tanaman ini sudah dimanfaatkan sebagai salah satu bahan obat tradisional. Bagian buah dan kulit batang dimanfaatkan untuk menghasilkan minyak esensial yang berfungsi sebagai pestisida, antijamur, antiinflamasi dan antibakteri (Weckerle Cs, et.al, 2006). Daun *C. funebris* Endl. dimanfaatkan untuk membantu menghentikan pendarahan, disentri dan mengobati luka bakar (Xinrong, Y, 2003).

Tumbuhan yang digunakan sebagai bahan baku obat berkaitan erat dengan kandungan kimianya terutama senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan biasanya merupakan senyawa metabolit sekunder (Kusuma, T. S, 1988). Metabolit sekunder adalah senyawa-senyawa hasil biosintetik turunan dari metabolit primer yang diproduksi oleh organisme melalui metabolisme sekunder. Contoh dari metabolit sekunder adalah flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid, dan

lain-lain (Murniasih, T, 2003). Beberapa fungsi senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid pada tanaman kebanyakan berperan dalam memberi warna daun dan bunga. Alkaloid pada tumbuhan berfungsi untuk melindungi diri karena bersifat racun bagi organisme lain. Minyak atsiri yang tergolong senyawa terpenoid berfungsi memberi aroma khas pada tumbuhan. Steroid pada tumbuhan ada yang memiliki fungsi untuk menghambat penuaan daun sehingga daun tidak cepat gugur, sedangkan steroid pada hewan pada umumnya dijumpai dalam bentuk hormon yang salah satu fungsinya berpengaruh dalam pertumbuhan dan perkembangbiakan (Harborne, J. B, 1987).

Carroll, J. F. (2011) telah meneliti tanaman *C. funebris* Endl. yaitu pada bagian kulit batang dan buahnya. Penelitian itu menemukan bahwa bagian tanaman tersebut mengandung minyak esensial berupa senyawa α -cedrene, cuparene, cerdinol dan β -cedrene yang merupakan senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid. Berdasarkan studi literatur yang penulis lakukan belum ada penelitian mengenai kandungan metabolit sekunder dari daun *C. funebris* Endl.

Hasil identifikasi pendahuluan (uji fitokimia) yang telah dilakukan terhadap daun *C. funebris* Endl. ditemukan bahwa tanaman tersebut positif mengandung terpenoid, steroid, dan flavonoid. Terpenoid dan steroid diuji dengan menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB) yang dengan uji positif terpenoid terbentuk warna merah dan uji positif steroid terbentuk warna biru, sedangkan flavonoid terbentuk warna kuning dengan pereaksi *sinoda test* (Mg/HCl). Warna yang ditimbulkan dari hasil uji steroid lebih jelas dibandingkan hasil uji terpenoid dan flavonoid. Hal itu mengindikasikan kemungkinan

kandungan steroid dalam daun *C. funebris* Endl. relatif lebih banyak dari pada kandungan terpenoid dan flavonoidnya.

Steroid merupakan senyawa turunan dari hidrokarbon 1,2-Siklopenteno perhidrofenantrena (Achmad, S. A. 1986). Steroid di alam terdapat pada hewan dan tumbuhan. Senyawa steroid pada hewan berhubungan erat dengan beberapa hormon dan keaktifan biologis lainnya, sedangkan pada tumbuhan steroid banyak terdapat baik pada tumbuhan tingkat tinggi maupun tumbuhan tingkat rendah. Steroid pada tumbuh-tumbuhan secara umum terdapat dalam bentuk sterol. Tumbuhan tingkat tinggi biasanya mengandung fitosterol seperti: sitosterol (β -sitosterol), stigmasterol, dan kompesterol (Harbone, J. B, 1987).

Kandungan senyawa steroid dalam tanaman obat telah banyak diteliti oleh para ahli. Daun pepaya (*Carica papaya* L.) merupakan salah tanaman yang telah diteliti. Daun tanaman tersebut mengandung senyawa steroid golongan sterol berupa senyawa ergost-5en-3 β -ol (Suryelita, 2000). Tanaman sidawayah (*Woodfordia floribunda* Salisb.) telah diketahui mengandung steroid jenis stigmasta-7,22-dien-3-ol (Saleh, C, 2009). Mamahit, L, (2009) mengisolasi senyawa steroid berupa β -sitosterol dari daun tanaman gedih (*Abelmoschus manihot* L. Mendik).

Steroid merupakan salah satu golongan senyawa yang cukup penting dalam bidang medis. Lebih dari 150 jenis golongan steroid telah terdaftar sebagai obat (*National Nutritional Food Association*, 2001). Steroid dalam dunia medis digunakan sebagai bahan obat dan kontrasepsi, misalnya: androgen merupakan hormon steroid yang dapat menstimulasi organ seksual jantan, estrogen dapat

menstimulasi organ seksual betina, adrenokortikoid dapat mencegah peradangan dan rematik (Nogrady, T. 1992). Senyawa stigmasterol dapat menurunkan kolesterol darah, menghambat penyerapan kolesterol usus sehingga dapat menghambat perkembangan kanker usus besar dan menekan kolesterol hati (Jones, *at al*, 2000). Selain senyawa-senyawa steroid tersebut masih banyak senyawa lain yang golongan steroid yang dimanfaatkan dalam dunia medis.

Penelitian steroid dari daun *C. funebris* Endl. merupakan salah satu upaya untuk mencari bahan baku steroid di alam. Hal tersebut dilakukan karena kebutuhan steroid dalam bidang medis terus meningkat. Selain itu, *C. funebris* Endl. belum dimanfaatkan masyarakat Indonesia sebagai bahan baku obat, sedangkan masyarakat Cina telah memanfaatkan daun tanaman ini. Berdasarkan penjelasan di atas penulis mengisolasi senyawa steroid dari daun *C. funebris* Endl.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini yaitu:

1. Apakah senyawa steroid dapat diisolasi dari daun *C. Funebris* Endl.?
2. Bagaimana karakteristik dari senyawa steroid hasil isolasi dari daun *C. Funebris* Endl.?

1.3 Pembatasan Masalah

Sesuai dengan permasalahan di atas, maka dalam penelitian ini dilakukan pembatasan masalah sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *C. funebris* Endl. yang diambil secara random dari kawasan Tunggul Hitam, Kota Padang, Sumatera Barat.
2. Ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi senyawa steroid dari sampel dilakukan dengan metoda maserasi, fraksinasi cai-cair, dan kromatografi kolom.
3. Uji kemurnian senyawa steroid hasil isolasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji titik leleh.
4. Karakterisasi senyawa steroid murni hasil isolasi dilakukan dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB), pereaksi Br_2/CCl_4 , penentuan titik leleh, spektroskopi ultraviolet (UV), dan spektroskopi inframerah.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengisolasi senyawa steroid dari daun *C. funebris* Endl.
2. Menentukan karakteristik senyawa steroid hasil isolasi dari daun *C. funebris* Endl.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah manfaat untuk :

1. Menambah ilmu pengetahuan bagi peneliti.
2. Memberi informasi bagi pembaca tentang tanaman yang mengandung senyawa steroid.
3. Memberikan informasi tentang karakteristik steroid yang terdapat dalam daun *C. funebris* Endl.
4. Dapat dijadikan sebagai acuan bagi peneliti selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani

2.1.1 Tinjauan Umum Tanaman *Cupressus funebris* Endl. (*C. funebris* Endl.)

Cupressus adalah suatu genus tanaman yang dalam bahasa Inggris memiliki nama umum *cypress* atau cemara dalam bahasa Indonesia. Banyak spesies tanaman yang telah diketahui tergolong dalam genus *Cupressus*/ cemara, salah satunya adalah *C. funebris* Endl.

C. funebris Endl. juga dikenal sebagai *chinese weeping cypress* atau *funeral cypress* (Inggris) dan *Mourning cypress* (Cina). Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) maka diperoleh klasifikasi tanaman tersebut sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Pinophyta
Kelas	: Pinopsida
Order	: Pinales
Keluarga	: Cupressaceae
Genus	: <i>Cupressus</i>
Spesies	: <i>Cupressus funebris</i>
Varietas	: <i>Cupressus funebris</i> Endl.

2.1.2 Morfologi Tanaman *C. funebris* Endl.

C. funebris Endl. memiliki batang pohon besar yang dapat tumbuh hingga ketinggian 11-24 m. Batangnya berwarna coklat muda hingga coklat tua dan memiliki percabangan yang banyak. Gambar 1 merupakan salah satu pohon *C. funebris* Endl. yang tumbuh di Indonesia :



Gambar 1. Pohon *C. funebris* Endl.

Daun *C. funebris* Endl. bersisik dengan panjang berkisar 0,8-1,2 cm, berbentuk bulat mengerucut pada ujungnya. Warna hijau akan terlihat pada daun yang masih muda dan akan berubah menjadi coklat apabila daun sudah tua.

Percabangan daun pendek dengan jumlah 8 cabang untuk satu tangkai daun seperti pada Gambar 2. Buah yang dimiliki *C. funebris* Endl. seperti belah ketupat dengan kulit buah bersisik. Jumlah sisik pada satu buah antara 6-10 (biasanya 8) sisik dengan jarak antar sisik buahnya relatif dekat (Caius, J. F, 1988).



Gambar 2. Daun *C. Funebris* Endl.

C. funebri Endl. tumbuh subur di tanah yang lembab karena itu kebanyakan tanaman ini hidup di daerah yang memiliki iklim sub tropis. Akan tetapi tanaman ini dapat beradaptasi dengan baik di tanah dan lingkungan yang tidak sesuai dengan habitatnya. Bahkan tanaman ini juga dapat tumbuh di tanah kering dengan kesuburan tanah yang rendah (Caius, J. F, 1988).

2.1.3 Kegunaan Tanaman *C. funebris* Endl.

Batang *C. funebris* Endl. digunakan untuk kayu pembuatan peti mati dan membangun rumah. Cabang dimanfaatkan sebagai pestisida dengan cara menempatkan cabang tersebut di sawah (Dafni, A, 2007). Bagian kulit batang dan buah digunakan untuk menghasilkan minyak esensial yang berguna sebagai antijamur dan antibakteri (Weckerle, CS, et.al, 2006).

Di daerah asalnya (Cina) *C. funebris* Endl. digunakan untuk ritual keagamaan. Bagian daun kering dan daun segar yang telah dijadikan bubuk digunakan sebagai salah satu bahan utama untuk membuat kayu dupa. Hal itu karena daunnya memiliki aroma yang khas dan cukup mencolok sehingga digunakan sebagai bahan baku membuat kayu dupa (Weckerle CS, et al, 2006). Selain itu ranting dan daun dari *C. funebris* Endl. (*Cupressaceae*) digunakan sebagai obat tradisional Cina. Khasiat obat dari tanaman tersebut adalah untuk membantu menghentikan pendarahan dan menurunkan panas dari darah untuk mengobati penyakit muntah darah, disentri dengan tinja berdarah dan luka bakar (Xinrong, Y, 2003).

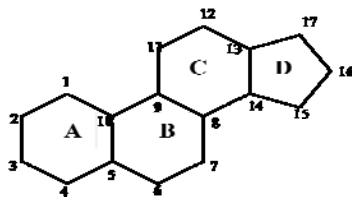
2.2 Steroid

2.2.1 Tinjauan Umum Steroid

Sejarah penemuan steroid bermula dari penelitian Windaus terhadap kolesterol dan dilanjutkan oleh Wieland terhadap asam empedu. Steroid mula-mula ditemukan dalam bentuk batu empedu, steroid yang terdapat dalam batu empedu terdiri dari sebagian besar alkohol yang berwujud kristal putih disebut

dengan kolesterol. Steroid berasal dari bahasa Yunani yaitu *Chole* “empedu” dan steroid “padat” (Achmad, S.A, 1986).

Steroid merupakan suatu senyawa organik yang mempunyai kerangka dasar terdiri dari 3 cincin sikloheksana (ABC) dan satu cincin siklopentana (D) yang sering disebut siklopentena perhidrofenantrena (Fessenden, 1997). Semua atom C yang terdapat dalam struktur diberi nomor 1-17 seperti pada Gambar 3. Umumnya steroid mengandung gugus metil pada atom C-10 dan atom C-13, serta rantai samping pendek pada atom C-17 (Tobing, 1989) dan sebagian besar mengandung gugus hidroksil pada atom C-3 (Ikkan, R. L., 1989).



Gambar 3. 1,2-Siklopenteno perhidrofenantren (Achmad, S.A., 1986)

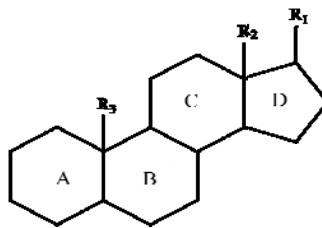
Steroid banyak terdapat dalam jaringan hewan dan tumbuhan. Steroid dalam jaringan tumbuhan terdapat dalam bentuk sterol. Tumbuhan tingkat tinggi umumnya mengandung fitosterol seperti β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Steroid dalam jaringan hewan terdapat dalam bentuk hormon seperti hormon estrogen dan testosteron. Steroid ini umumnya terdapat dalam bentuk bebas dan sebagai glukosida sederhana (Harborne, J. B, 1987).

Perkembangan selanjutnya ditemukan hal-hal menarik dari senyawa steroid. Beberapa senyawa steroid terdapat pada hewan juga ditemukan pada tumbuhan. Salah satunya adalah estrogen hewan yang juga ditemukan pada biji korma dan serbuk sari. Selanjutnya Dean mengemukakan estron juga terdapat pada biji

delima. Gibbons menemukan kolesterol pada korma dan alga merah. Nakanishi meneliti paku-pakuan (*Pteridium aquilinum*) dan menemukan hormon serangga ecdison pada tumbuh-tumbuhan seperti (Harborne, J. B, 1987).

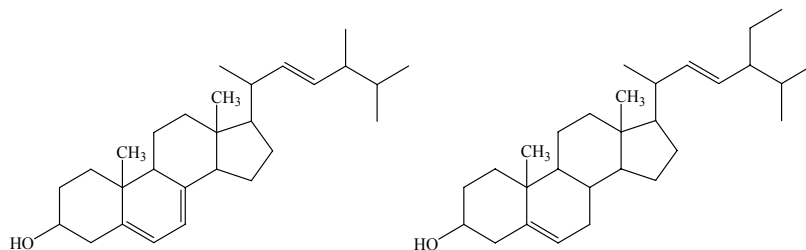
2.2.2 Klasifikasi Steroid

Steroid dikelompokkan berdasarkan pada efek fisiologis yang diberikan oleh masing-masing senyawa. Kelompok-kelompok itu ialah sterol, asam-asam empedu, hormon seks, hormon adrenokortikoid, aglikon kardiak, dan sapogenin. Ditinjau dari segi struktur molekul, perbedaan antara berbagai kelompok steroid ini ditentukan oleh jenis substituen R_1 , R_2 , dan R_3 , yang terikat pada kerangka dasar karbon. Perbedaan antara senyawa satu dengan yang lain dari suatu kelompok tertentu ditentukan oleh panjang rantai karbon R_1 dan gugus fungsi yang terdapat pada substituen. Perbedaan lain yang juga menentukan adalah posisi gugus fungsi dan ikatan rangkap, serta konfigurasi dari pusat-pusat asimetris pada kerangka dasar karbon itu (kerangka dasar karbon dapat dilihat pada Gambar 4) (Achmad, S.A, 1986).

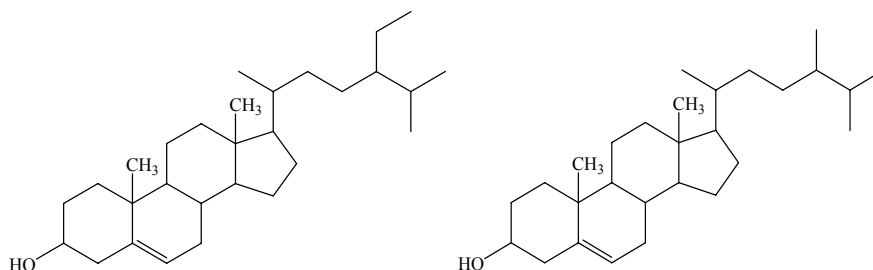


Gambar 4. Kerangka dasar karbon steroid (Achmad, S. A., 1986)

- a. **Sterol**, yaitu steroid yang mengandung gugus -OH seperti ergosterol, stigmasterol, kolesterol dan β -sitosterol. Struktur beberapa senyawa dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6 (halaman 13).

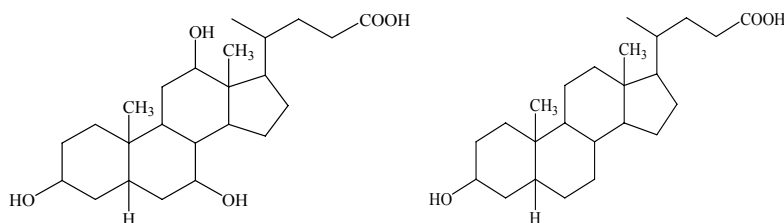


Gambar 5. Ergosterol dan Stigmasterol (Achmad, S. A, 1986)



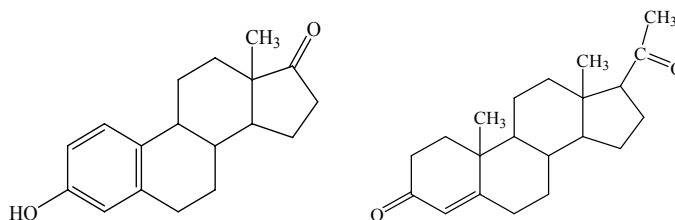
Gambar 6. β -sitosterol dan Kolesterol (Achmad, S. A, 1986)

- b. Asam-asam Empedu**, yaitu steroid yang mengandung gugus asam seperti asam kolat dan asam litokolat, strukturnya dapat dilihat pada Gambar 7.



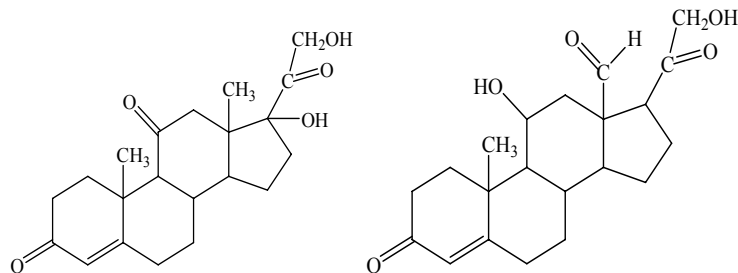
Gambar 7. Asam kolat dan Asam litokolat (Achmad, S. A., 1986)

- c. Hormon seks**, seperti oestron dan progesterone. Struktur hormon seks dapat dilihat pada Gambar 8.



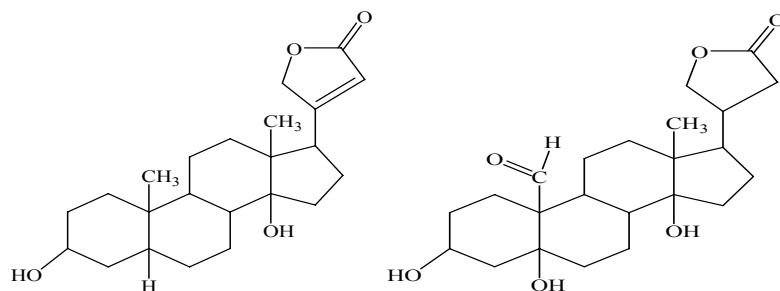
Gambar 8. Oestron dan Progesteron (Achmad, S. A., 1986)

- d. Hormon adrenokortikoid**, seperti kortison dan aldosteron yang ditunjukkan pada Gambar 9.



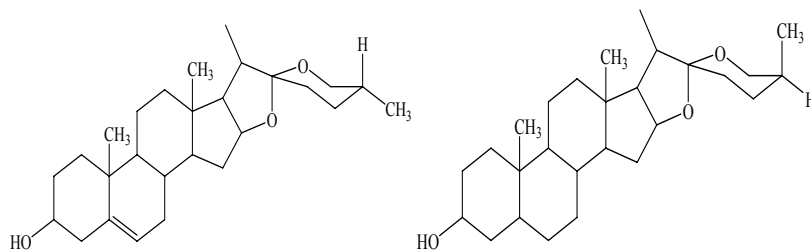
Gambar 9. Kortison dan Aldosteron (Achmad, S. A, 1986)

- e. Aglikon kardiak**, seperti digitoksigenin dan strofantidin. Struktur aglikon kardiak ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10. Digitoksigenin dan Strofantidin (Achmad, S. A, 1986)

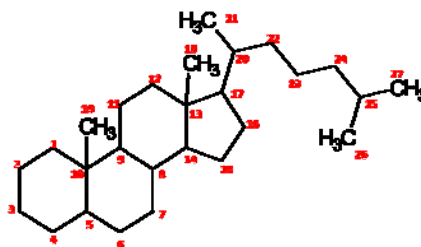
- f. Sapogenin**, seperti diosgenin dan sarsapogenin yang stukturanya dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Diosgenin dan Sarsapogenin (Achmad, S. A, 1986)

2.2.3 Tata Nama Steroid

Tata nama sistematis steroid menurut aturan *Internasional Union of Applied Chemistry* (IUPAC) didasarkan pada struktur dari hidrokarbon steroid tertentu. Nama hidrokarbon steroid itu ditambah awalan atau akhiran yang menunjukkan jenis substituen. Posisi substituen yang terikat ditunjukkan oleh nomor dari atom karbon dimana substituen terikat. Contoh penomoran atom karbon dalam molekul steroid dapat dilihat pada Gambar 12 berikut ini:



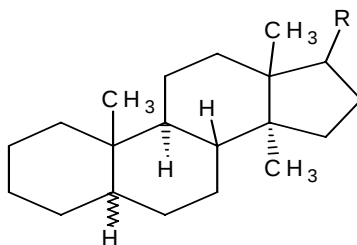
Gambar 12. Penomoran kerangka steroid (Achmad, S. A, 1986)

Berdasarkan struktur umum steroid seperti digambarkan pada Gambar 13 (halaman 16), maka jenis-jenis hidrokarbon induk dari steroid tercantum pada Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Hidrokarbon Induk Steroid

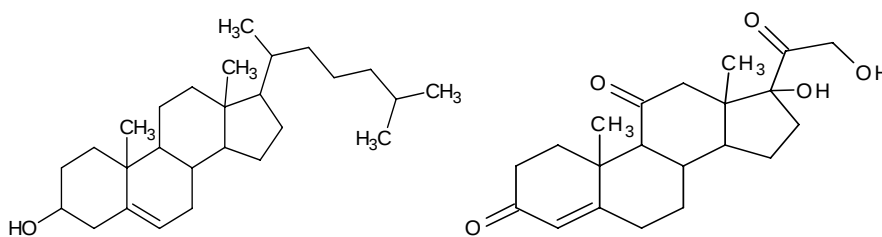
Nama	Jumlah Atom C	Jenis Rantai Samping R
Androstan	C19	-H
Pregnan	C21	-CH ₂ CH ₃
Kolan	C24	-CH(CH ₃)(CH ₂) ₂ CH ₃
Kolestan	C27	-CH(CH ₃)(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂
Ergostan	C28	-CH(CH ₃)(CH ₂) ₂ CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂
Stigmastan	C29	-CH(CH ₃)(CH ₂) ₂ CH(C ₂ H ₅)CH(CH ₃) ₂

Pemberian nama untuk substituen yang terikat pada steroid diberi awalan atau akhiran pada nama hidrokarbon induk. Posisi substituen harus ditunjukkan dengan nomor dari atom karbon tempat terikatnya. Konfigurasi dari substituen ditunjukkan pula dengan huruf Yunani α atau β . Konformasi α apabila substituen berada di bawah bidang molekul dan ikatannya digambarkan dengan garis putus-putus sedangkan konformasi β apabila substituen berada di atas bidang digambarkan dengan ikatan sempurna (Achmad, S. A, 1986).



Gambar 13. Struktur umum steroid (Achmad, S. A, 1986)

Penamaan steroid selain menggunakan nama IUPAC, steroid juga memakai nama trivial seperti kolesterol, oestron, testosteron, kortison, aldosteron, dan sebagainya. Berikut beberapa contoh penamaan IUPAC dan trivial dari senyawa steroid pada Gambar 14.



Gambar 14. Kolest-5-en-3 β -ol (kolesterol) dan 17 α , 21- Dihidroksipregnan-4-en-3, 11,20-trion (kortison) (Achmad, S. A, 1986).

2.2.4 Sifat Steroid

Steroid sebagian besar berwarna putih berbentuk kristal jarum, lempeng atau amorf (Kasel, A. et al, 2010). Atom karbon yang dimiliki steroid berkisar 17 atau lebih mengakibatkan steroid cenderung tidak larut dalam air. Steroid merupakan senyawa non polar, penambahan gugus hidroksil atau pengurangan atom karbon dapat sedikit meningkatkan kelarutan dalam senyawa polar. Senyawa steroid dalam bentuk garam lebih mudah larut dalam air, contohnya dapat dilihat dalam Tabel 2 (Doerge, R. F, 1992).

Tabel 2. Kelarutan Beberapa garam Steroid dalam Air

Senyawa Steroid	Kelarutan g/100mL		
	CHCl ₃	EtOH	H ₂ O
Kolesterol	22,00	1,20	-
Testosteron	50,00	15,00	-
Testosteron propionate	45,00	25,00	-
Asam Dehidrokolat	90,00	0,33	0,02
Estrodiol	1,00	10,00	-
Estrodiol Benzoat	0,80	8,00	-
Hidrokortison	1,00	2,50	0,01
Hidrokortison Asetat	0,50	0,40	-
Hidrokortison garam NaPO ₄	-	1,00	75,00

Titik leleh yang dimiliki steroid berbeda-beda antara steroid yang satu dengan yang lainnya. Berikut ini merupakan beberapa contoh titik leleh dari steroid yang dapat dilihat pada Tabel 3 (Jannah, H, et al, 2013).

Senyawa steroid sebagian besar mengandung gugus fungsi oksigen (=O atau -OH) pada C-3 dan gugus samping pada atom C-17. Senyawa steroid pada umumnya mengandung ikatan rangkap di antara C-4 dan C-5 atau atom C-5 dan C-6 (Tobing, R. I, 1989).

Tabel 3. Titik Leleh Beberapa Senyawa Steroid

Nama Senyawa	Rumus Molekul	Titik Leleh (°C)
Ergosterol	$C_{28}H_{44}O$	168
Stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	160-164
β –sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	136-140
Campesterol	$C_{28}H_{48}O$	147-148
Kolesterol	$C_{27}H_{46}O$	148,5
A-sitosterol	$C_{29}H_{48}O$	166
Asam kolat	$C_{24}H_{40}O_5$	198
Asam litokolat	$C_{24}H_{40}O_3$	184-186
Kortison	$C_{21}H_{28}O_5$	215
Aldosteron	$C_{21}H_{27}O$	99
Oesteron	$C_{18}H_{21}O_2$	251-254
Progesteron	$C_{21}H_{29}O_2$	121
Digitoksigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	253
Sarsapogenin	$C_{27}H_{44}O_3$	200

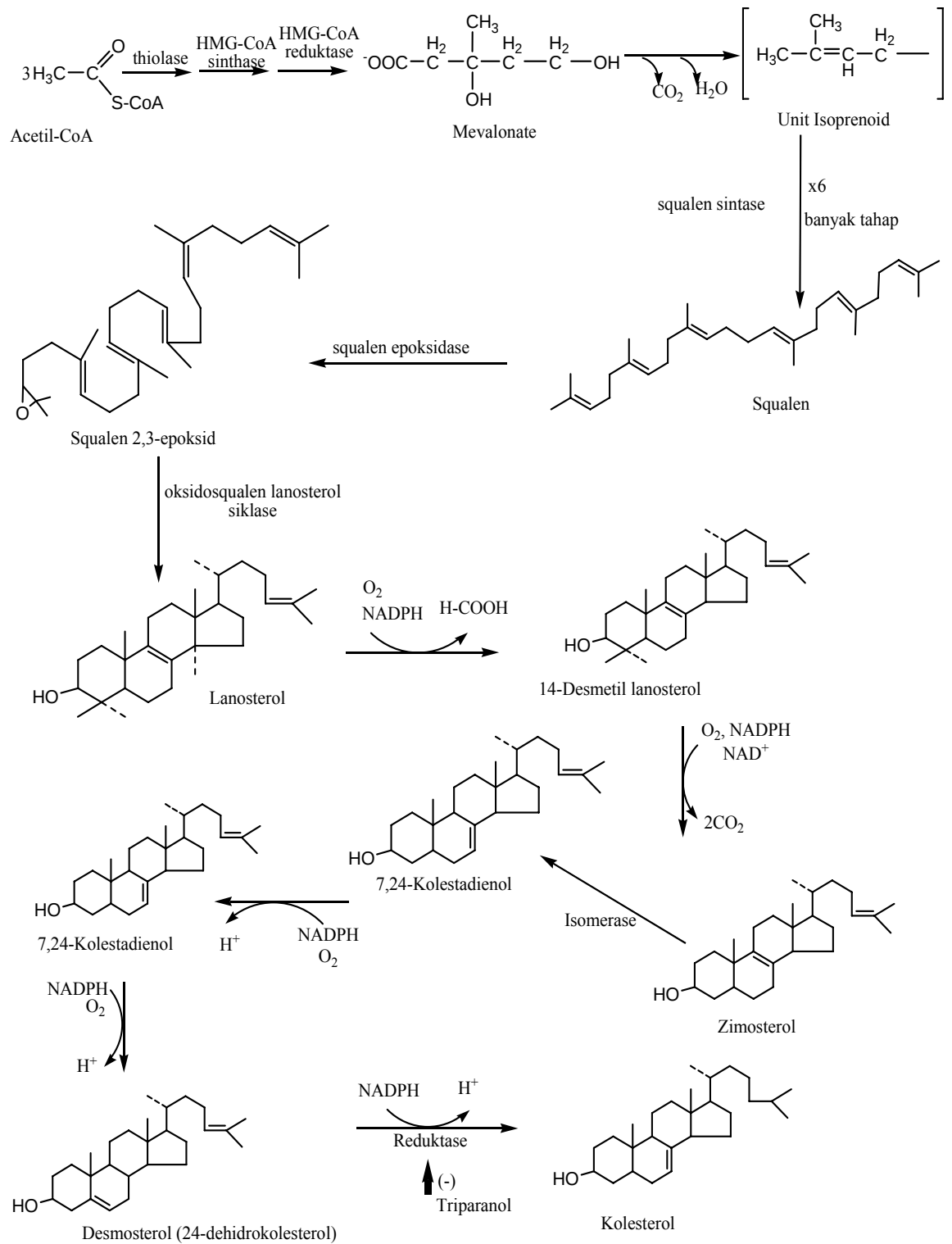
2.2.5 Kegunaan Steroid

Senyawa golongan steroid digunakan secara meluas dalam dunia pengobatan dan kontrasepsi antara lain: androgen merupakan hormon steroid yang dapat menstimulasi organ seksual jantan, estrogen dapat menstimulasi organ seksual betina, adrenokortikoid dapat mencegah peradangan dan rematik. Glukokortikoid sebagai anti inflamasi, alergi, demam, leukemia, dan hipertensi serta kardenolida yang merupakan steroid glukosida jantung digunakan sebagai diuretik dan penguat jantung (Nogrady, T, 1992). Kortikosteroid dalam obat seperti deksametosin, prednisolon, dan prednison umumnya diresepkan untuk peradangan, telah membantu berbagai kondisi peradangan termasuk *rheumatoid arthritis*, PPOK, dan asma. Di sisi lain, secara komersial steroid anabolik yang dijual seperti HGH, Winstrol, TGH, Genabol, Deca Durabolin, Androstenedion, dan Anabol digunakan untuk meningkatkan kinerja dan membangun otot.

Stigmasterol merupakan senyawa steroid dengan induk stigmastan yang memiliki gugus hidroksil pada C-3 dan gugus –ena pada C-22 dan C-23. Stigmasterol pada umumnya terdapat pada tumbuhan, berupa kristal berwarna putih berbentuk jarum dengan rumus molekul $C_{29}H_{54}O$. Menurut Jones, *et al* (2000), senyawa stigmasterol dapat menurunkan kolesterol darah, menghambat penyerapan kolesterol usus sehingga dapat menghambat perkembangan kanker usus besar dan menekan kolesterol hati.

2.2.6 Biosintesis Steroid

Dahulu steroid terutama dianggap sebagai senyawa yang berasal dari satwa (sebagai hormon kelamin, asam empedu, dan lain-lain), tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa tersebut yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Steroid yang terdapat pada tumbuhan disebut sterol, salah satu sterol adalah fitosterol. Fitosterol yang mungkin terdapat pada setiap tumbuhan tingkat tinggi adalah sitosterol (dahulu dikenal sebagai β -sitosterol), stigmasterol, dan kampesterol. Steroid ini umumnya terdapat dalam bentuk bebas dan sebagian glukosida sederhana (Harborne, J.B, 1987). Gambar 15 merupakan reaksi biosintesis senyawa steroid dari hewan (kolesterol), untuk biosintesis lengkap dapat dilihat pada Lampiran 4 (halaman 71).



Gambar 15. Reaksi Biosintesis Steroid

Steroid yang terdapat di dalam jaringan hewan berasal dari triterpen lanosterol, sedangkan yang terdapat dalam jaringan tumbuhan berasal dari triterpen sikloartenol, setelah triterpen ini mengalami serentetan perubahan tertentu. Tahap-tahap awal biosintesis steroid adalah sama bagi semua steroid alam, yakni pengubahan asam asetat menjadi asam mavalonat kemudian skualen (suatu triterpen) menjadi lanosterol atau sikloartenol (Achmad, S. A, 1986).

2.3 Identifikasi Pendahuluan

Identifikasi pendahuluan yang dilakukan menggunakan pendekatan skrining fitokimia. Skrining fitokimia yang merupakan analisis kualitatif kandungan metabolit sekunder dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, bunga, buah, dan biji). Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang diuji fitokimia pada penelitian ini yaitu: alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, dan saponin. Skrining fitokimia dilakukan untuk identifikasi awal keberadaan senyawa steroid dalam sampel (Goad, R. J dan A. Toshihiro, 1997).

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan metoda Culvenor-Fitzgerald. Reaksi positif alkaloid ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih bila sampel ditambahkan pereaksi Meyer. Terbentuk kabut putih menandakan kandungan alkaloid sedikit yang ditandai dengan (+), terbentuk endapan putih menandakan kandungan alkaloid sedang yang ditandai dengan (++), terbentuk gumpalan putih menandakan kandungan alkaloid tinggi yang ditandai dengan (+++) (Harborne, J. B, 1987). Uji positif alkaloid dengan pereaksi Wagner, terbentuknya endapan coklat dan uji positif alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, terbentuknya endapan jingga-merah (Mustikasari, K dan Dahlena. A, 2010).

Uji identifikasi flavonoid dilakukan dengan menambahkan pereaksi *Shinoda test* (Mg/HCl) pada suatu ekstrak sampel memberikan warna pink-merah menunjukan terdapatnya senyawa flavonoid di dalam ekstrak tersebut. Perubahan warna pada penambahan pereaksi *Shinoda test* disebabkan oleh intensitas karakteristik warna tiap partikel senyawa fenolik yang teroksidasi oleh magnesium klorida sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid (Sari, O dan Titik .T, 2006).

Pembentukan busa yang stabil saat mengekstraksi tumbuhan dengan pelarut atau saat memekatkan ekstrak tumbuhan menandakan adanya saponin dalam tumbuhan. Uji tersebut dinamakan uji busa untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa saponin di dalam tumbuhan. Identifikasi lain yang dilakukan adalah kandungan terpenoid dan steroid dalam sampel diuji menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* (anhidrida asetat- H_2SO_4 pekat). Hasil uji positif terpenoid akan memberikan warna merah ungu-coklat, sedangkan steroid warna biru kehijauan (Harborne, J. B, 1987). Hasil identifikasi awal terhadap daun tanaman *C. funebris* Endl. memberikan hasil negatif untuk alkaloid dan saponin. Sedangkan hasil positif untuk flavonoid, terpenoid dan steroid.

2.4 Isolasi Steroid

Isolasi steroid dari daun tanaman *C. funebris* Endl. dikerjakan berdasarkan tahap sebagai berikut: ekstraksi, pemisahan, dan pemurnian. Isolasi senyawa tahap awal dilakukan dengan ekstraksi. Metoda ekstraksi yang digunakan harus sesuai

dengan sifat komponen yang akan diisolasi. Pemilihan metoda yang tidak tepat akan mempengaruhi hasil isolasi senyawa.

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metoda yang digunakan untuk mengisolasi komponen kimia tertentu dalam jaringan tumbuhan atau hewan dengan menggunakan pelarut tertentu sehingga komponen kimia yang diinginkan terekstrak dalam pelarut. Metoda ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu perkolasi, sokletasi dan maserasi (Manjang, Y, 1988).

2.4.1.1 Perkolasi

Teknik perkolasi menggunakan suatu pelarut yang dilewatkan secara perlahan-lahan pada sampel yang akan diekstraksi. Metoda ini digunakan jika kandungan senyawa organik dalam sampel cukup besar. Pelarut yang digunakan pada metoda ini yaitu dengan pelarut tidak mudah menguap (Manjang, Y, 1988).

2.4.1.2 Sokletasi

Metoda sokletasi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang mudah menguap dengan jalan pemanasan. Pelarut dilewatkan secara terus menerus yang menyebabkan kontak antara sampel dan pelarut berlangsung berulang kali sehingga penarikan lebih sempurna. Metoda ini digunakan untuk mengekstrak senyawa yang tahan terhadap suhu yang relatif tinggi (Manjang, Y, 1988).

2.4.1.3 Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel ke dalam pelarut tertentu tanpa menggunakan pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang

dapat melarutkan senyawa organik tertentu sehingga zat yang diinginkan dapat larut dengan baik dalam pelarut tersebut (Manjang, Y, 1988).

Metoda ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi dipilih untuk memisahkan komponen metabolit sekunder dari sampel karena metoda ini merupakan metoda yang sederhana dan tidak menggunakan pemanasan. Caranya dengan merendam sampel yang telah dihaluskan (umumnya dirajang atau berupa serbuk kasar), ditambahkan pelarut dan kemudian disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya) serta dikocok sesekali. Jangka waktu maserasi berbeda-beda untuk sampel yang berbeda, tergantung konsentrasi komponen senyawa yang terdapat di dalam sampel dan banyak sampel yang diekstrak (Voight, R, 1995).

Metoda maserasi digunakan karena metoda ini tidak menggunakan pemanasan dalam proses ekstraksinya, sehingga kemungkinan terjadinya dekomposisi komponen kimia yang terkandung di dalam sampel dapat dihindari. Pemilihan pelarut dalam maserasi didasarkan atas sifat kelarutan zat aktif dalam suatu pelarut. Pelarut yang baik digunakan untuk maserasi adalah senyawa golongan alkohol seperti metanol. Metanol merupakan pelarut yang universal karena melarutkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar hingga non polar, sehingga komponen-komponen tersebut dapat terekstrak. Sifat metanol yang mudah menguap akan memudahkannya terpisah dari komponen ekstrak (Djamal, R, 1988). Maserasi dilakukan sebanyak beberapa kali hingga sampel menunjukkan hasil negative dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB) (Harborne, J. B, 1987).

Filtrat yang diperoleh dari maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Prinsip dari *rotary evaporator* adalah penguapan putar yang akan memekatkan filtrat menjadi volume kecil (ekstrak pekat) tanpa mendidih pada suhu tinggi (pendidihan terjadi pada $\pm 30\text{--}40^\circ\text{C}$) (Harborne, J. B, 1987). Ekstrak pekat yang diperoleh berupa campuran antara senyawa yang bersifat polar dan senyawa yang bersifat non polar (masih berbentuk campuran senyawa) yang disebabkan penggunaan pelarut metanol, untuk itu dilakukan pemisahan komponen-komponen senyawa untuk memperoleh senyawa yang murni.

2.4.2 Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Jumlah senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan. Metoda fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah.

Ekstraksi cair-cair merupakan prinsip dari fraksinasi menggunakan corong pisah. Ekstraksi cair-cair merupakan pemisahan komponen kimia di antara dua fasa pelarut yang tidak saling bercampur sehingga sebagian komponen akan terlarut pada fasa pertama dan sebagian lainnya larut pada fasa kedua. Kedua pelarut tersebut dikocok kemudian didiamkan sampai terjadi pemisahan sempurna (terbentuk dua lapisan fasa cair), dan komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fasa tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya. Fraksinasi dilakukan beberapa kali hingga diperoleh hasil negatif steroid dengan uji LB pada salah satu fraksi (Ditjen POM, 2000). Masing-masing hasil fraksinasi dipekatkan kembali

dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat dari masing-masing fraksi di uji dengan pereaksi LB. Fraksi yang positif mengandung steroid dilanjutkan pemisahan dengan kolom kromatografi (Krisna, I. G, et.al, 2014).

2.4.3 Pemisahan Komponen

Pemisahan komponen kimia yang terdapat dalam ekstrak fraksi yang positif LB dilakukan dengan teknik kromatografi. Kromatografi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom (Harborne, J. B, 1987).

2.4.3.1 Kromatografi Lapis Tipis

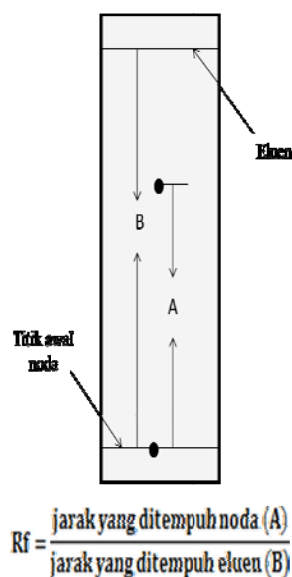
Kromatografi lapis tipis (KLT) dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa organik yang terdapat di alam serta senyawa organik sintesis. Pemisahan terjadi karena perbedaan daya serap dari adsorben tertentu terhadap komponen-komponen kimia yang akan dipisahkan. Kromatografi lapis tipis dapat dipakai untuk memperoleh hasil kuantitatif yang merupakan langkah awal untuk mencari pelarut dalam kromatografi kolom (Mochamad, A, 1997).

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi adsorpsi yang mempunyai dua fasa yaitu fasa diam (adsorben) dan fasa gerak (eluen). Fasa diam berupa serbuk halus. Senyawa yang biasa digunakan untuk fasa diam adalah silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kieselguhr (tanah diatom), dan selulosa. Serbuk tersebut ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam, atau penyangga lainnya yang cocok. Fasa gerak dapat berupa segala macam

pelarut atau campuran pelarut. Pelarut yang digunakan harus mempunyai kepolaran yang sama dengan senyawa yang akan dipisahkan (Gritter, R. J, 1991).

Komponen yang akan dipisahkan terlebih dahulu ditotolkan pada bagian plat dengan memakai kapiler berdiameter kecil, kemudian plat dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan. Fasa gerak akan naik berdasarkan azas kapilaritas sambil membawa komponen yang dipisahkan. Setiap komponen akan bergerak sepanjang plat dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan kecocokannya dengan fasa diam dan fasa gerak. Hasil elusi dapat diamati dalam bentuk noda atau bercak yang saling terpisah satu sama lainnya pada plat KLT yang disebut kromatogram.

Penentuan besarnya retensi suatu komponen pada plat kromatografi dapat dinyatakan dengan nilai R_f (*Retention factor*). Nilai R_f diperoleh dengan membandingkan jarak titik pusat noda akhir dengan jarak yang ditempuh eluen dari awal. Contoh cara menghitung R_f dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Contoh Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menunjukkan cara menghitung R_f (Gritter, R. J, 1991)

Noda yang tidak terlihat dapat dimunculkan dengan menggunakan uap iodine, sinar ultraviolet (UV), dan reagen-reagen penampak noda tertentu untuk membantu mendeteksi noda pada kromatogram (Gritter, R. J, 1991) atau modifikasi pereaksi LB untuk golongan terpenoid dan steroid (Manjang, Y, 1985). Menurut Hestetman, et al (1995), KLT dalam bidang organik dapat digunakan untuk, a) menentukan dua senyawa identik atau tidak, b) menghitung jumlah komponen dalam suatu campuran, c) menentukan pelarut yang baik dalam pemisahan pada kromatografi kolom, d) memonitoring hasil pemisahan pada kromatografi kolom, e) memeriksa kemurnian suatu senyawa organik.

2.4.3.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan suatu metoda partisi padat-cair yang didasarkan pada adsorbtivitas senyawa penyusun campuran terhadap fasa diam (fasa padat) dan kelarutannya terhadap fasa gerak (eluen) yang digunakan. Adsorbennya merupakan suatu materi yang tidak larut dalam fasa cair. Adsorben yang lazim digunakan adalah silica gel ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) dan alumina ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Senyawa-senyawa ini digunakan dalam bentuk *powder* dengan kehalusan yang baik biasanya 200-400 mesh (Gritter, R. J, 1991).

Kromatografi kolom merupakan suatu teknik pemisahan yang didasarkan pada perbedaan migrasi masing-masing komponen melalui fasa diam di bawah pengaruh eluen sebagai fasa gerak. Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan interaksi masing-masing komponen terhadap fasa diam. Komponen yang berinteraksi lemah dengan fasa diam akan keluar lebih cepat pada proses

pengoloman dibandingkan dengan komponen yang berinteraksi kuat dengan fasa diam. Sistem elusi yang digunakan pada kromatografi kolom tersebut adalah sistem *step gradient polarization* (SGP) yaitu teknik elusi dengan kepolaran eluen bertingkat (Moore, J. A, 1985).

2.4.4 Pemurnian dan Uji Kemurnian

Pemurnian dilakukan untuk memperoleh senyawa murni hasil isolasi dari proses yang telah dilakukan sebelumnya. Metoda yang digunakan untuk pemurnian tersebut adalah metoda rekristalisasi. Pengujian KLT dan uji titik leleh dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa hasil isolasi telah murni.

2.4.4.1 Pemurnian

Metode rekristalisasi dilakukan jika senyawa hasil isolasi sudah diperoleh dalam bentuk kristal padat. Proses rekristalisasi ini dilakukan dengan cara melarutkan suatu padatan dengan pelarut dan kemudian dapat dibuat kembali menjadi padatan kristal dengan cara pengendapan. Pemurnian secara rekristalisasi didasarkan pada perbedaan kelarutan antara senyawa dengan pengotor dalam pelarut. Pelarut yang baik adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan maksimum dalam keadaan panas dan minimum dalam keadaan dingin, dapat memisahkan kotoran dan kembali mengkristal, mudah dipisahkan dari kristal yang terbentuk, dan tidak bereaksi secara kimia dengan zat yang dimurnikan (Manjang, Y, 1988).

2.4.4.2 Uji Kemurnian

Senyawa hasil isolasi yang telah dimurnikan perlu dilakukan pengecekan kembali untuk menguji kemurniannya sebelum dilakukan karakterisasi. Kemurnian senyawa hasil isolasi dapat diketahui melalui noda yang dihasilkan plat KLT. Jika noda yang dihasilkan sudah tunggal maka senyawa hasil isolasi sudah murni. KLT dapat dilakukan dengan beberapa variasi pelarut pengelusi untuk memastikan kemurnian senyawa hasil isolasi (Manjang, Y, 1988).

Uji titik leleh dilakukan untuk memastikan kemurnian senyawa hasil isolasi yang telah dimurnikan tersebut. Titik leleh senyawa organik mudah untuk diamati karena temperatur dimana pelelehan mulai terjadi hampir sama dengan temperatur dimana zat telah habis meleleh semuanya. Titik leleh adalah temperatur dimana zat padat berubah wujud menjadi zat cair pada tekanan satu atmosfer, dengan kata lain titik leleh merupakan suhu ketika fasa padat dan cair sama-sama berada dalam kesetimbangan. Kemurnian suatu senyawa dapat diketahui dengan mengetahui titik lelehnya. Zat-zat murni pada umumnya memiliki titik leleh yang lebih tinggi dibandingkan ketika zat tersebut telah tercampur dengan zat lain. Jika zat padat yang diamati tidak murni, maka akan terjadi penyimpangan dari titik leleh senyawa murninya. Penyimpangan itu berupa penurunan titik leleh dan perluasan range titik leleh (Chang, R, 2004).

Pengukuran titik leleh senyawa hasil isolasi digunakan untuk mengetahui kemurniannya. Senyawa hasil isolasi dapat dikatakan murni apabila selisih suhu dari zat meleleh hingga habis meleleh kecil dari 2°C, selain itu dapat juga dengan membandingkan data yang ada pada literatur (Manjang, Y, 1988).

2.5 Karakterisasi

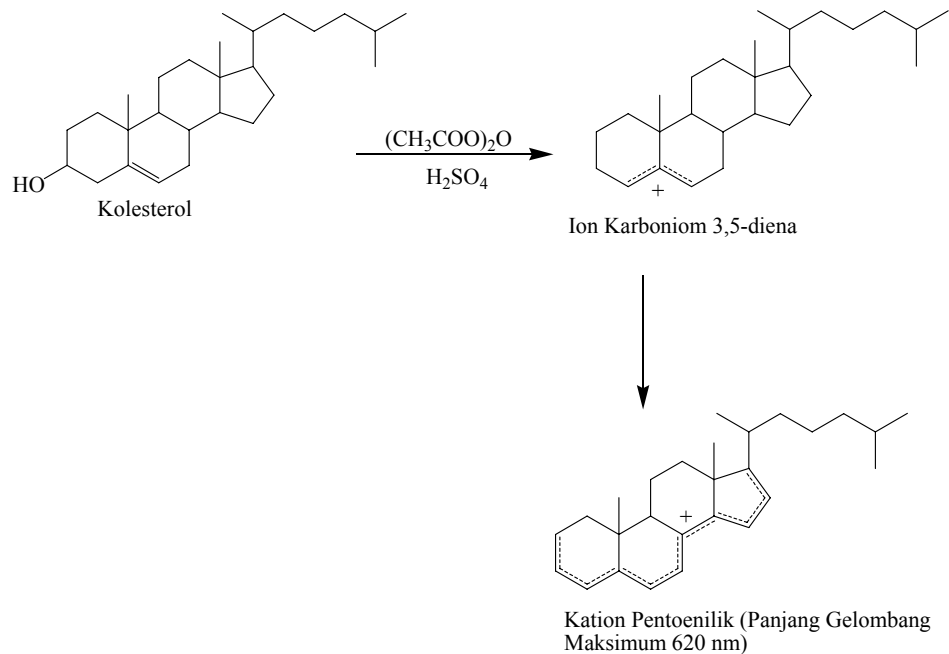
2.5.1 Uji Titik Leleh

Suatu zat memiliki titik leleh yang sudah ditetapkan oleh ilmuwan yang telah menelitinya ataupun oleh para ahli pakar kimiawan. Karakterisasi dengan menggunakan uji titik leleh dapat dilakukan dengan membandingkan hasil pengujian zat isolasi murni dengan referensi standar untuk titik leleh steroid. Suhu awal kristal mulai meleleh dijumlahkan dengan suhu kristal meleleh seluruhnya kemudian dirata-ratakan. Suhu rata-rata tersebut merupakan titik leleh kristal steroid murni hasil isolasi (Martin, A, 1990).

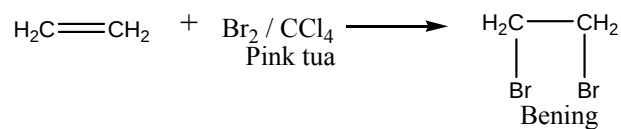
2.5.2 Pereaksi Kimia

Pereaksi kimia yang digunakan untuk reaksi pengenalan secara sederhana adalah pereaksi LB. Senyawa hasil isolasi yang direaksikan LB akan memberikan warna biru kehijauan jika merupakan steroid (Harborne, J. B, 1987). Gambar 17 (halaman 32) merupakan persamaan reaksi yang terjadi antara reagen LB dengan senyawa golongan steroid.

Pereaksi pengenalan yang juga dapat digunakan untuk karakterisasi senyawa hasil isolasi adalah Br_2/CCl_4 yang berfungsi untuk mengetahui adanya ikatan rangkap ($\text{C}=\text{C}$). Hilangnya warna pink tua dari Br_2/CCl_4 setelah direaksikan dengan sampel menandakan adanya ikatan rangkap pada sampel tersebut. Persamaan reaksinya dapat dilihat pada Gambar 18 (halaman 32).



Gambar 17. Reaksi LB pada Uji Fitokimia (Siadi, Kusoros, 2012)



Gambar 18. Reaksi alkena dengan Brom (Fessenden, R. J, 1982)

2.5.3 Spektroskopi UV

Spektroskopi ultraviolet (UV) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui adanya ikatan rangkap (ikatan rangkap terkonyugasi) yang terdapat dalam suatu senyawa. Absorpsi cahaya UV menghasilkan transisi elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi tinggi. Transisi ini memerlukan energi 40-300 kkal/mol. Molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi

elektron akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek sedangkan molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang (Fessenden, R. J, 1997).

Ketika senyawa organik menyerap radiasi UV, akan terjadi transisi induksi sinar UV dari elektron di antara tingkat energi yang berbeda. Transisi yang menarik terutama dari daerah orbital π ke orbital π yang kosong dengan energi lebih tinggi yang disebut orbital π antibonding, dan ditunjuk oleh simbol π^* . Setelah menjalani transisi ini dengan penyerapan energi foton yang tepat, molekul dikatakan dalam keadaan tereksitasi (Kasel, A. et al, 2010).

Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan energi dari orbital-orbital yang bersangkutan. Pemisahan yang paling tinggi diperoleh bila elektron-elektron dalam ikatan σ tereksitasi yang menimbulkan serapan dalam daerah dari 120-200 nm. Daerah ini dikenal sebagai daerah ultraviolet vakum dan relatif tidak banyak memberikan keterangan. Panjang gelombang di atas 200 nm eksitasi elektron dari orbital-orbital p, d, dan π terutama sistem konjugasi π segera dapat diukur dan spektra yang diperoleh memberikan banyak keterangan. Spektrometri ultraviolet dalam prakteknya digunakan terbatas pada sistem-sistem terkonyugasi. Transisi elektronik dalam orbital dapat terjadi antara σ - σ^* , π - π^* , n - σ^* , dan n - π^* (Silverstein, R. M, 1986). Daerah yang paling berguna dari spektrum ultraviolet (UV) adalah daerah dengan panjang gelombang 200-400 nm yaitu transisi π - π^* untuk senyawa dengan ikatan rangkap berkonyugasi serta beberapa transisi n - σ^* , dan n - π^* .

Senyawa yang dapat dengan mudah menjalani transisi $\pi - \pi^*$ termasuk diena terkonyugasi, triena, dan α,β keton tak jenuh terkonyugasi, ester atau lakton, dengan tanda struktural dari jenis $=C-C=C$, $C=C-C=C-C=C$, atau $C=C-C=O$, masing-masing. Mereka juga termasuk cincin aromatik, seperti cincin fenolik A dari estrogen. Semua senyawa terkonyugasi menyerap radiasi UV sangat kuat dalam panjang gelombang ≥ 270 nm. Panjang gelombang (λ) biasanya dinyatakan dalam nanometer (nm), satuan yang lebih lama seperti amstrong ($\text{\AA}$) dan milimikron (m μ) tidak digunakan lagi. Data lama dapat dihitung ulang dengan mengkonfersikan satuan, $1 \text{ nm} = 10 \text{ \AA} = 0,001 \text{ m}$.

Bagian molekul yang menyerap sinar UV disebut kromofor. Istilah kromofor berasal dari zat berwarna, yang mengandung gugus fungsional (kromofor) *Chromos* adalah warna dalam bahasa Yunani untuk penyerapan radiasi dalam daerah *visible* dalam spektrum elektromagnetik (400-800 nm). Steroid dengan struktur diena homoanular memiliki daerah serapan pada panjang gelombang 260-285 nm, sebagai contoh adalah ergosterol dengan serapan maksimum 282 nm. Steroid dengan diena heteroanular seperti 3,5-kholestadiena, memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 220-250 nm (Kasel, A. et al, 2010).

2.5.4 Spektroskopi Inframerah

Spektrum inframerah dapat digunakan untuk menyatakan jenis ikatan apakah yang terdapat di dalam suatu molekul (dengan menggunakan daerah gugus fungsi) dan untuk menyatakan dua zat identik atau berbeda (dengan menggunakan derah sidik jari). Frekuensi inframerah biasanya dinyatakan dalam satuan bilangan

gelombang (*wavenumber*), yang didefinisikan sebagai banyaknya gelombang per sentimeter. Instrumen biasa memindai (*scan*) pada ikatan sekitar $700\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Kisaran frekuensi ini sama dengan energi sekitar $2\text{-}12\text{ kkal/mol}$. Jumlah energi ini cukup untuk mempengaruhi getaran (vibrasi) ikatan (gerakan seperti peregangan atau pembengkokan ikatan) tetapi sangat kurang untuk memutuskan ikatan (Hart, 2003).

Proses penyerapan inframerah terjadi bila frekuensi vibrasi sama dengan frekuensi sinar atau energi sinar inframerah sama dengan energi vibrasi molekul. Spektrum inframerah merupakan gambaran yang menyatakan hubungan antara intensitas serapan (transmitan atau absorban) berbanding dengan bilangan gelombang atau panjang gelombang (Mon, I, 2007).

Penggunaan spektroskopi inframerah memberikan informasi tentang gugus fungsi yang terdapat pada senyawa uji. Analisis spektrum inframerah steroid tergantung pada puncak yang merupakan ciri khas dari tanda struktural. Sebagian besar pita absorpsi yang berguna berada di atas 1.500 cm^{-1} . Daerah di bawah bilangan gelombang 1.500 cm^{-1} disebut daerah “sidik jari”. Daerah ini sering mengandung puncak-puncak yang tidak dapat diidentifikasi untuk vibrasi tertentu. Pola mereka tertentu untuk karakteristik dari steroid tertentu, dan mungkin berguna untuk identifikasi senyawa dengan perbandingan spektrum dengan sampel yang mirip. Gugus tertentu dari puncak sidik jari telah terdaftar sebagai karakteristik dari tanda struktural tertentu, terutama gugus hidroksil dan karbonil di lokasi yang lebih penting dalam steroid (C-3,-17 dan -20). Hal ini sering jadi bahan pertimbangan para ahli apakah puncaknya pada daerah sidik jari yang dapat

diuji memiliki struktural signifikan, banyak yang lebih baik diabaikan, kecuali sebagai rincian sidik jari untuk tujuan perbandingan (Kasel, A. et al, 2010).

Serapan penting beberapa gugus fungsi ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Daftar beberapa frekuensi vibrasi gugus fungsi pada spektrum inframerah

Ikatan	Tipe Senyawa	Daerah Serapan (cm^{-1})	Intensitas
C – H	Alkana	2.850-2.970	Kuat
		1.340-1.470	Kuat
C – H	Alkena	3.010-3.095 675-995	Sedang Kuat
C – H	Alkuna	3.300	Kuat
C – H	Cincin Aromatik	3.010-3.100 690-900	Sedang Kuat
O – H	Fenol, monomer alkohol, alkohol ikatan hidrogen, fenol	3.590-3.650 3.200-3.600	Berubah-ubah Berubah-ubah, terkadang melebar
	Monomer asam karboksilat, ikatan hidrogen asam karboksilat	3.500-3.650 2.500-2.700	Sedang Melebar
N – H	Amina, Amida	3.300-3.500	Sedang
C = C	Alkena	1.610-1.680	Berubah-ubah
C = C	Cincin Aromatik	1.500-1.600	Berubah-ubah
C $\equiv$ C	Alkuna	2.100-2.660	Berubah-ubah
C – N	Amina, Amida	1.180-1.360	Kuat
C $\equiv$ N	Nitril	2.210-2.280	Kuat
C – O	Alkohol, Ester, Asam Karboksilat, Ester	1.050-1.300	Kuat
C = O	Alkohol, Ester, Asam Karboksilat, Ester	1.690-1.760	Kuat
NO ₂	Senyaw Nitro	1.500-1.570	Kuat
		1.300-1.370	Kuat

Spektrum inframerah dari kelompok sterol memperlihatkan pita serapan $3.400\text{-}3.500\text{ cm}^{-1}$ yang dapat memberikan indikasi gugus hidroksil pada atom C-3. Ikatan rangkap terisolasi dapat diamati pada daerah sekitar 1.640 cm^{-1} , tetapi terkadang pita serapan ini muncul begitu lemah sehingga sulit dalam karakterisasi gugus fungsi. Karakteristik beberapa bilangan dari golongan C-H regangan dalam

senyawa steroid di tampilkan pada Tabel 5 dan pada Tabel 6 (halaman 38) yang merupakan karakteristik beberapa bilangan gelombang golongan steroid tak jenuh.

Tabel 5. Karakteristik Bilangan Gelombang dari Golongan Ikatan C-H Regangan Steroid

Grup	Bilangan gelombang (cm^{-1})
-C=C-H	3.340-3.300
C-H aromatic	3.100-3.000
C=CH ₂ dalam 17-vinil steroid	-3.085
C=C-H dalam 17-etenil steroid	-3.300
C=C-H dalam steroid 14-enes	3.055-3050
C=C-H dalam anggota lingkaran enam	3.040-3.010
Grup CH ₃ dan CH ₂	2.970-2.850
Grup CH ₃ O	2.830-2.815
O=C-H dalam aldehid	2.750-2.700
C-D adjacent to Karbonil	2.275-2.100
C-D dalam posisi lainnya	2.180-2.100

Golongan hidroksil adalah ikatan O-H regangan di wilayah $3.625\text{-}3.200\text{ cm}^{-1}$ yang biasanya paling menonjol dalam spektrum steroid. Bentuk dan posisi spektrumnya tergantung pada keadaan ikatan hidrogen dalam senyawa sampel. Suatu golongan hidroksi yang tidak berikatan memberikan pita yang sangat tajam pada bilangan gelombang $3.625\text{-}3.600\text{ cm}^{-1}$, tetapi ikatan hidrogen antar atau intermolekular bergeser dan memperluas pita serapan. Ikatan hidrogen intermolekular antar kelompok hidroksil yang berdekatan, atau antar hidroksil dan karbonil, memberikan pita medium-tajam ($3.600\text{-}3.450\text{ cm}^{-1}$), sedangkan intramolekul ikatan hidrogen, baik dalam struktur kristal atau dalam larutan, memberikan pita yang lebih luas ($3.550\text{ - }3.200\text{ cm}^{-1}$). Pita serapan O-H regangan untuk asam karboksilat menjadi sangat luas dan menyebar dan memperpanjang hingga sejauh 2.500 cm^{-1} . Tabel 7 (halaman 39) menunjukkan bilangan gelombang O-H regangan.

Tabel 6. Karakteristik Bilangan Gelombang Golongan Steroid Tak Jenuh

Grup	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	
	2	3
1	C=C atau C=C regangan	C-H bengkokan ^a
C≡C	2.150-2.100 ^b	
17-etenil		
C=C		
1-ena	1.644 ^c	754-752
2-ena	1.657-1.654 ^c	774-772 dan 663
3-ena	1.647 ^c	773 dan 761
4-ena	1.657 ^c	
5-ena	1.672-1.667 ^c	840 dan 800
6-ena	1.639-1.633 ^c	772, 739, 729, dan 710-740
7-ena	1.672-1.664 ^c	830 dan 800
9(II)-ena	1.645-1.635 ^c	828-821
14-ena	1.648-1.646 ^c	825-822, 810-808, dan 801-800
16-ena	1.630-1.621 ^c	800
22-ena (trans)	1.666-1.664 ^c	715-710
3,5-diena	1.618 dan 1.578	974-970
5,7-diena	1.655-1.650 dan 1.600	
1-en-3-on	1.609-1.604	840-835 dan 808
4-en-3-on	1.620-1.612	
5-en-7-one	1.633	880-860
9(II)-en-12-on	1.607	
	1.592-1.587	
16-en-20-on	1.636-1.632 dan 1.608-	
1,4-dien-3-on	1.603	88-887
4,6-dien-3-on	1.619-1.616 dan 1.587	875-874
3,5-dien-7-on	1.627-1.598	
Enol asetat (anggota lingkaran atau side-chain)	1.697-1.660	
Enol asetat (lingkar D)	1.620-1.615	
3,5-dien-3-ol asetat	1.670 dan 1.639	
Bufa-20,22-dienolid	1.638-1.636 dan 1.602	
Card-20(22)-enolid	1.624-1.619	
Cincin aromatic	1.613-1.610, 1.590-1.589, dan 1.503-1.490	
Aromatik A; OH di 3	1.625-1.623 dan 1.503-	
Aromatik A; OH di 2,3 dan 3,4	1.490	
Cincin aromatik A dan B	1.625, 1.606, dan 1.573	
Benzoat	1.604-1.603 dan 1.586-1.584	708-703

Sumber: Kasel, A. et al, 2010

Keterangan:

^a Ikatan intensitas menengah, ^b Ikatan yang lemah dan tajam, ^c Lemah, tidak ada dalam ikatan konjugasi.

Beberapa hal perlu diperhatikan dalam menginterpretasikan spektrum inframerah yaitu: a). Intensitas, *weak* (w/lemah), *medium* (m/sedang), *strong* (s/kuat), *variable* (v/berubah-ubah); b). Bentuk/shape, *broad* (lebar) dan *sharp* (tajam); c). Pita lemah yang bertumpang tindih dengan pita kuat, *shoulder/sh* (bahu); d). Posisi (cm^{-1}) dalam spektrum (Sastrohamidjojo, H, 1992).

Tabel 7. Karakteristik Golongan Bilangan Gelombang Spektrum O-H regangan

Golongan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
O-H (hidroksil)	
O-H tidak terikat	3.625-3.600 (pita tajam)
O-H terikat intramolekul	3.600-3.450 (medium-tajam)
O-H terikat intermolekular	3.550-3.200 (pita lebar)
O-H ikatan hidrogen dalam asam karboksilat	3.330-2.500 (pita yang sangat luas)
O-D (deuterohidroksil)	
O-D tidak terikat	2.630-2.620 (pita tajam)
O-D terikat	2.600-2.400 (pita lebar)

Sumber: Kasel, A. et al, 2010

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa steroid hasil isolasi dari 4 Kg sampel adalah berupa kristal berbentuk jarum berwarna putih dengan massa 0,3726 gram.
2. Kadar senyawa steroid dari daun cemara natal (*Cupressus funebris* Endl.) adalah 0,01 %.
3. Titik leleh kristal steroid murni hasil isolasi adalah 138,6°C.
4. Karakterisasi struktur senyawa steroid hasil isolasi dengan pereaksi kimia, spektrofotometer UV-Vis, dan spektrofotometer inframerah menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa steroid yang mengandung gugus OH, gugus metil, dan memiliki ikatan rangkap yang tidak terkonyugasi.

5.2 Saran

Senyawa steroid hasil isolasi belum dapat diketahui strukturnya karena itu disarankan melanjutkan karakterisasi menggunakan Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (RMI) dan Spektroskopi Massa (MS) untuk mengetahui strukturnya. Kemampuan bioaktivitas dari senyawa hasil isolasi juga disarankan untuk diuji agar dapat diketahui kemampuan obatnya seperti pengujian aktifitas antibakteri dan antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Agoes, G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung : ITB. 11a. 166h. 615.18.
- Caius, J. F. 1988. *The Medicinal and Poisonous Plants of India*. Jodhpur : Scientific Publisher (India)
- Carroll, J. F, et al. 2011. "Essential oils of *Cupressus funebris*, *Juniperus communis*, and *J. chinensis* (Cupressaceae) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitoes" *Journal of Vector Ecology*. Vol.36. no.2. 258-268.
- Chang, R. 2004. *Kimia Dasar "Konsep – konsep Inti Jilid I Edisi Ketiga"*. Jakarta: Erlangga.
- Dafni A. 2007. *Rituals, ceremonies and customs related to sacred trees with a special reference to the Middle East*. *Journal of Ethnobiology and Etnomedicine*. 3:28.
- Ditjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstraksi Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 82-84.
- Djamil, R. 1988. *Tumbuhan Sebagai Bahan Obat*. Padang: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI, Pusat Penelitian Unviversitas Andalas.
- Doerge, R. F, 1992. *Kimia Farmasi dan Medisinal Organik* Edisi Kedelapan Bagian II. Terjemahan Achmad Mustafa Fatah. Philladelphia: Tomtom, J. B. Lippincott.
- Etika, S. B dan Suryelita. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Jurnal Kimia*. Padang: UNP. Vol. 1 Tahun XV.
- Fessenden, R. J dan Fessenden J. S. 1997. *Kimia Organik*. Terjemahan oleh A. Hadatana P. Jilid I, Edisi Ketiga. Jakarta: Elrlangga.
- Fessenden, R. J dan Fessenden J. S. 1997. *Kimia Organik*. Terjemahan oleh A. Hadatana P. Jilid II, Edisi Ketiga. Jakarta: Elrlangga.
- Goad L. J, and A. Toshihiro. 1997. *Analysis of Sterol*. London: Blackie Academic & Propesional.
- Gritter, R. J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi Kedua. Bandung: ITB
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia* "diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro". Bandung: Penerbit ITB, Hal 47-49, 97, 102-103, 234-235.