

**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI JAMUR ENDOFIT RS-1  
PADA RANTING TUMBUHAN SAMBILOTO  
(*Andrographis paniculata*)**

**SKRIPSI**

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*



**Oleh:  
MELISA YOLANDA  
NIM.18036132/2018**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2022**

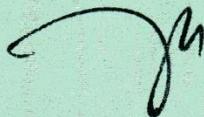
## PERSETUJUAN SKRIPSI

### ISOLASI SENYAWA STEROID DARI JAMUR ENDOFIT RS-1 PADA RANTING TUMBUHAN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*)

Nama : Melisa Yolanda  
NIM : 18036132  
Program Studi : Kimia  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, November 2022

Mengetahui  
Ketua Jurusan Kimia



Budhi Oktavia, S.Si., M.Si., Ph.D.  
NIP. 19721024 199803 1 001

Disetujui Oleh  
Pembimbing



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

## PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Melisa Yolanda  
NIM : 18036132  
Program Studi : Kimia  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

### ISOLASI SENYAWA STEROID DARI JAMUR ENDOFIT RS-1 PADA RANTING TUMBUHAN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*)

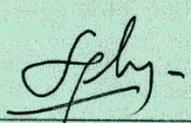
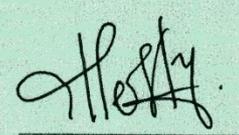
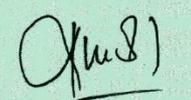
Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Padang

Padang, November 2022

#### Tim Penguji

No	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Dra.Sri Benti Etika, M.Si.	
2. Anggota	: Hesty Parbuntari, S.Pd., M.Sc	
3. Anggota	: Trisna Kumala Sari, M.Si., Ph.D	

## SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

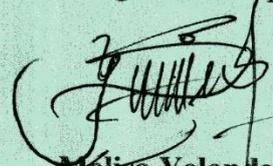
Nama : Melisa Yolanda  
NIM/TM : 18036132 / 2018  
Tempat/Tanggal Lahir : Lubuk Basung / 16 Juli 1999  
Program Studi : Kimia  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Alamat : Kandang Payo Jorong Kubu Nan Limo  
No. HP/Telp : 085283466641  
Judul Skripsi : Isolasi Senyawa Steroid dari Jamur Endofit RS-1 pada Ranting Tumbuhan Sambilo (*Andrographis panicula*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Karya tulis/skripsi ini adalah hasil karya saya dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik (sarjana) baik di Universitas Negeri Padang maupun perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis/skripsi ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan tim pembimbing.
3. Karya tulis/skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali tertulis dengan jelas dicantumkan pada kepustakaan.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangani **Asli** oleh tim pembimbing dan tim penguji.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh – sungguh dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran di dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima **Sanksi Akademik** berupa pencabutan gelar akademik yang telah diperoleh karena karya tulis/skripsi ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Padang, November 2022  
Yang membuat pernyataan

  
Melisa Yolanda  
NIM. 18036132

**Isolasi Senyawa Steroid Dari Jamur Endofit Rs-1  
Pada Ranting Tumbuhan Sambiloto  
(*Andrographis paniculata*)**

**Melisa Yolanda**

**ABSTRAK**

Jamur endofit adalah jamur yang hidup berkoloni pada jaringan tumbuhan tanpa mengganggu tanaman inangnya. Jamur endofit merupakan salah satu sumber potensial yang dapat memproduksi metabolit sekunder yang sama atau berbeda dari tanaman inangnya. Jamur endofit dapat dikultivasi dalam rentang waktu yang singkat dan menghasilkan metabolit sekunder seperti steroid dengan jumlah yang banyak. Jamur endofit tumbuh dalam tanaman yang memiliki kandungan obat-obatan, salah satunya dilaporkan dari tumbuhan *Andrographis paniculata* (Sambiloto). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Anshar (2021) telah berhasil di isolasi jamur endofit dari ranting tumbuhan *A. paniculata* yang memiliki aktivitas antibakteri dan positif mengandung senyawa steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi jenis senyawa steroid yang terdapat dalam jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting *A. paniculata*. Metoda penelitian adalah eksperimen dengan tahapan kultivasi jamur endofit RS-1 pada media nasi. Metoda isolasi dengan maserasi menggunakan pelarut etil asetat, fraksinasi dengan kromatografi cair vakum (KCV). Pemisahan komponen kimia menggunakan metoda kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji kemurnian untuk senyawa hasil isolasi adalah dengan titik leleh dan KLT. Karakterisasi untuk senyawa hasil isolasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer inframerah. Hasil isolasi berupa kristal seberat 0,3437 gram dengan peleburan titik leleh 140,9°C. Kristal murni diidentifikasi sebagai senyawa steroid dengan pereaksi Liberman-Burchard (LB) menghasilkan warna kehijauan. Ikatan rangkap terkonyugasi C=C teridentifikasi pada spektrofotometer UV-Vis yang menghasilkan panjang gelombang 270 nm dan spektrofotometer inframerah menghasilkan gugus fungsional O-H, C-H, C=C, CH<sub>3</sub>, =C-H, dan C=O.

Kata kunci: *Jamur endofit, A. paniculata, Steroid, isolasi, karakterisasi*

**Isolation Of Steroid Compounds From Endophytic Fungi Rs-1 On Sambiloto  
Twig  
(*Andrographis paniculata*)**

**Melisa Yolanda**

**ABSTRACT**

Endophytic fungi are fungi that live in colonies on plant tissues without disturbing the host plant. Endophytic fungi are one of the potential sources that can produce secondary metabolites that are the same or different from their host plants. Endophytic fungi can be cultivated in a short time span and produce large amounts of secondary metabolites such as steroids. Endophytic fungi grow in plants that contain medicinal properties, one of which is reported from the *Andrographis paniculata* (Sambiloto) plant. Based on research conducted by Anshar (2021), endophytic fungi have been isolated from twigs of the plant *A. paniculata* which have antibacterial activity and are positive for steroid compounds. This study aims to isolate and characterize the types of steroid compounds contained in the RS-1 endophytic fungus isolated from the twigs of *A. paniculata*. The research method was an experiment with the stages of cultivation of the RS-1 endophytic fungus on rice media. Isolation method by maceration using ethyl acetate solvent, fractionation by vacuum liquid chromatography (TLC). Separation of chemical components using column chromatography and thin layer chromatography (TLC). The purity test for the isolated compound is by melting point and TLC. Characterization of isolated compounds using UV-Vis spectrophotometer and infrared spectrophotometer. The results of the isolation are crystals weighing 0.3437 grams with a melting point of 140.9oC. Pure crystals were identified as steroid compounds with Liberman-Burchard reagent (LB) producing a greenish color. The C=C conjugated double bond was identified on UV-Vis spectrophotometer which produces a wavelength of 270 nm and infrared spectrophotometer produces functional groups O-H, C-H, C=C, CH<sub>3</sub>, =C-H, and C=O.

Keywords: *Endophytic fungi, A. paniculata, Steroids, isolation, characterization*

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, taufik serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi Senyawa Steroid dari Jamur Endofit RS-1 pada Ranting Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*)”**. Shalawat beserta salam dikirimkan kepada Baginda Rasulullah Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini ditulis dengan tujuan untuk diseminarkan sebagai acuan dalam melaksanakan penelitian nantinya. Penulisan skripsi ini banyak mendapat bimbingan, petunjuk, saran, bantuan serta dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si selaku Dosen Pembimbing dan Penasehat Akademik.
2. Ibu Hesty Parbuntari, S.Pd.,M.Sc selaku Dosen Pembahas
3. Ibu Trisna Kumala Sari, M.Si., Ph.D selaku Dosen Pembahas
4. Bapak Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D selaku Ketua Prodi dan Ketua Jurusan Departemen Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.
5. Bapak Dr. Riga, S.Pd., M.Si selaku Dosen Kimia Organik yang telah membimbing, membantu serta memotivasi dalam penyusunan skripsi penelitian ini.

Sebagai tahapan dalam penyusunan skripsi ini, penulis meminta saran, kritik serta masukan yang bersifat membangun dari berbagai pihak sehingga peneliti ini dapat dengan baik.

Semoga segala bimbingan, arahan, masukan serta dukungan yang telah diberikan menjadi amal ibadah untuk semuanya dan mendapatkan balasan dari Allah SWT.

Padang, Oktober 2022

Penulis

## DAFTAR ISI

ABSTRAK .....	i
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Identifikasi Masalah.....	3
C. Batasan Masalah.....	4
D. Rumusan Masalah .....	4
E. Tujuan Penelitian .....	5
F. Manfaat Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Tumbuhan Sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> ).....	6
B. Jamur Endofit pada Tumbuhan Sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> ).....	9
C. Steroid .....	10
D. Metoda Ekstraksi.....	19
E. Pemisahan Komponen Kimia .....	21

F. Uji Kemurnian .....	24
G. Karakterisasi.....	25
BAB III METODA PENELITIAN .....	31
A. Waktu dan Tempat Penelitian .....	31
B. Sampel Penelitian.....	31
C. Alat dan Bahan.....	31
D. Prosedur Penelitian.....	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	39
A. Kultivasi / Fermentasi Jamur Endofit .....	39
B. Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Kimia.....	40
C. Isolasi Steroid.....	42
D. Uji Kemurnian.....	45
E. Karakterisasi .....	46
BAB V PENUTUPAN .....	51
A. Kesimpulan .....	51
B. Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA .....	52
LAMPIRAN.....	58

## DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
1. Tumbuhan Sambiloto.....	7
2. Jamur Endofit RS-1.....	10
3. Struktur Umum Steroid.....	11
4. Struktur (1) Stigmasterol, (2) Ergosterol, (3) Campesterol, (4) Kolesterol dan (5) Sitosterol .....	12
5. Asam Kolat.....	13
6. (1) Estradiol, (2) Estron, (3) Progesteron, (4) Testosteron, dan (5) Estrio .....	14
7. (1) Aldosteron, (2) Kortisol.....	15
8. Aglikon Kardiak.....	15
9. Penomoran Steroid.....	16
10. Prinsip dan Cara Kerja Spektrofotometer UV-Vis.....	26
11. Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	45
12. Reaksi Liebermann Burchard (LB) pada uji fitokimia .....	47
13. Spektrum Ultraviolet Kristal Steroid Hasil Isolasi.....	48
14. Spektrum Inframerah Kristal Steroid Hasil Isolasi .....	49
15. Kultivasi Jamur Endofit RS-1 .....	58
16. Hasil Kultivasi Jamur Endofit RS-1 Setelah 3 Minggu (Waktu Optimasi) ....	58
17. Proses Maserasi.....	59
18. Pemekatan dengan Rotary Evaporator .....	59
19. Hasil Ekstrak Pekat .....	59
20. Prose Kromatografi Cair Vakum .....	60
21. Hasil Kromatografi Cair Vakum.....	60

22. Hasil KCV dimonitoring dengan KLT.....	60
23. Ekstrak KCV Hasil Penggabungan .....	61
24. Hasil Penggabungan dimonitoring KLT .....	61
25. Uji Steroid Hasil Penggabungan .....	61
26. Hasil dimonitoring KLT sebelum Kromatografi Kolom .....	62
27. Proses Kromatografi Kolom .....	62
28. Uji Steroid Hasil Penggabungan Fraksi Kelompok 2 dan 3 .....	62

## DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
1. Jenis-jenis Hidrokarbon Induk dari Steroid .....	16
2. Daftar Beberapa Daerah Serapan Jenis Ikatan dan Bilangan pada Spektrofotometer Inframerah .....	28
3. Perbandingan Eluen Fraksinasi .....	41
4. Pengelompokan Fraksi KCV Hasil Penggabungan.....	42
5. Pengelompokan Hasil Fraksi Kromatografi Kolom.....	44
6. Hasil Pengukuran Spektra Inframerah Kristal Steroid Hasil Isolasi .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
1. Skema Kerja Isolasi Steroid dari Jamur Endofit Rs-1 pada Ranting Tumbuhan Sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> ) .....	58
2. Kultivasi dan Ekstraksi .....	58
3. Fraksinasi .....	60
4. Isolasi .....	62
5. Uji Titik Leleh.....	63
6. Reaksi Warna dengan Liebermann-Burchard .....	63
7. Kristal Steroid .....	63

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Antibiotik merupakan senjata yang efektif dalam melawan bakteri patogen, sehingga penggunaan antibiotik mengalami peningkatan yang mengakibatkan terjadinya resistensi antibiotik. Dimana bakteri dalam tubuh tidak dapat lagi dibunuh menggunakan antibiotik. Resistensi antibiotik, merupakan salah satu ancaman utama dalam bidang kesehatan yang dapat menimbulkan masalah yang serius dalam dunia kesehatan (Frieri *et al.*, 2016). Pada tahun 2020, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mempublikasikan daftar bakteri yang resistensi terhadap berbagai obat (Maglangit *et al.*, 2021). Bakteri patogen merupakan penyebab semakin resistensi terhadap pengobatan antibakteri yang ada. Bakteri yang resistensi terhadap banyak obat mengalami peningkatan yang pesat sehingga menyebabkan morbiditas dan mortalitas (Boudaher & Shaffer, 2019). Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan pencarian senyawa bioaktif yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri yaitu steroid.

Aktivitas antibakteri dari senyawa steroid, berkaitan dengan membran lipid dan kepekaan terhadap komponen steroid yang menyebabkan bocornya liposom sehingga keutuhan membran menurun serta berpengaruh terhadap morfologi membran sel yang menyebabkan sel repas dan rusak (R. Sari *et al.*, 2017). Dilaporkan dari penelitian sebelumnya oleh Porras *et al.*, 2021 terdapat 4 senyawa golongan steroid yaitu polifilin G; stigmast-22-en-3,6-dion; stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol-21(24)-olida; dan stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol-23-on yang menunjukkan aktivitas

antibakteri yang tinggi. Selain dari tumbuhan alami, metabolit sekunder golongan steroid yang mempunyai aktivitas antibakteri juga dilaporkan dari organisme lain, yaitu jamur endofit.

Jamur endofit adalah jamur yang hidup berkoloni pada setiap jaringan tumbuhan dan umumnya hidup tanpa mengganggu tanaman inangnya. Secara garis besar, jamur endofit dapat menghasilkan senyawa aktif yang sama atau berbeda dengan tanaman inangnya. Jamur endofit dilaporkan sebagai salah satu sumber potensial yang dapat memproduksi metabolit sekunder (seperti steroid) yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Zhao *et al.*, 2012). Sintesis metabolit sekunder pada jamur endofit berbeda dengan tumbuhan, dimana jamur endofit ini dapat mensintesis berbagai metabolit sekunder dalam waktu yang relatif singkat sehingga mudah difermentasi dan dikultur. Oleh karena itu, jamur endofit dapat dikultivasi dalam rentang waktu yang singkat dan dapat memproduksi metabolit sekunder dengan jumlah banyak dengan waktu yang singkat (Wei *et al.*, 2020). Jamur endofit tumbuh dalam tanaman yang memiliki kandungan obat-obatan, salah satunya dilaporkan dari tumbuhan sambiloto.

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) tergolong tumbuhan obat yang dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri serta berpotensi sebagai inang yang baik bagi jamur endofit. Berdasarkan studi literatur terhadap tumbuhan *A. paniculata* berbagai bagian banyak digunakan dalam mengekstrak fitokimia aktif (Abu Bin Nyeem *et al.*, 2017). Lebih lanjut, pada bagian akar, daun dan bunganya juga sering dimanfaatkan sebagai ramuan tradisional (Jarukamjorn & Nemoto, 2008). *A. paniculata* mempunyai spektrum efek farmakologis yang luas dan beberapa diantaranya sangat bermanfaat seperti, antibakteri, hepatoprotektif,

antijamur, antioksidan, antiinflamasi, antipiretik, antikanker dan antioksidan. Berdasarkan hal tersebut, *A. paniculata* berpotensi sebagai inang yang baik untuk jamur endofit (Abu Bin Nyeem *et al.*, 2017).

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Anshar *et al.*, 2021 mengindikasikan bahwa ekstrak etil asetat jamur endofit RS-1 pada ranting tumbuhan sambiloto memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus pyogenes*. Berdasarkan uji fitokimia pada ekstrak etil asetat pada jamur endofit RS-1 dari ranting tumbuhan sambiloto menunjukkan positif steroid. Oleh sebab itu, penelitian lebih lanjut terkait isolasi metabolit sekunder golongan steroid pada ekstrak jamur endofit RS-1 ranting tumbuhan sambiloto ini perlu untuk dilanjutkan. Penelitian terkait isolasi senyawa steroid dari jamur endofit RS-1 yang berasosiasi dengan ranting tumbuhan sambiloto belum pernah dilakukan. Oleh karena itu penulis tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul **“Isolasi Senyawa Steroid dari Jamur Endofit RS-1 pada Ranting Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*)”**.

## **B. Identifikasi Masalah**

Berdasarkan dari latar belakang yang telah dijabarkan, sehingga dapat diidentifikasi masalah berikut ini:

1. Resistensi antibiotik merupakan salah satu ancaman bagi kesehatan masyarakat, sehingga perlu dilakukan pencarian senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri.
2. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa ekstrak etil asetat jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting sambiloto memiliki aktivitas antibakteri sehingga diperlukan proses isolasi lebih lanjut.

3. Penelitian sebelumnya mengidentifikasi kandungan senyawa steroid pada jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting tumbuhan sambiloto.

### **C. Batasan Masalah**

Batasan masalah penelitian ini berdasarkan masalah yang telah diuraikan diatas adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting tumbuhan sambiloto.
2. Isolasi senyawa steroid dari jamur endofit RS-1 pada bagian ranting dari tumbuhan sambiloto dilakukan dengan menggunakan metoda maserasi dengan pelarut etil asetat, fraksinasi dengan kromatografi cair vakum dan kromatografi kolom. Uji kemurnian dilakukan menggunakan metoda kromatografi lapis tipis dan penentuan titik leleh.
3. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pereaksi warna, spektroskopi UV-Vis dan spektroskopi-inframerah.

### **D. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah

1. Bagaimana mengisolasi senyawa steroid dari jamur endofit RS-1 pada ranting tumbuhan sambiloto.
2. Bagaimana mengkarakterisasi senyawa steroid dari jamur endofit RS-1 pada ranting tumbuhan sambiloto.

### **E. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah

1. Mengisolasi senyawa steroid yang terdapat dalam jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting tumbuhan sambiloto.
2. Mengkarakterisasi senyawa steroid yang terdapat dalam jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting tumbuhan sambiloto.

### **F. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah

1. Memberikan informasi terkait karakteristik senyawa steroid yang terdapat dalam jamur endofit RS-1 pada bagian ranting dari tumbuhan sambiloto.
2. Dapat menjadi sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

##### 1. Taksonomi Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Berikut adalah taksonomi dari tumbuhan *Andrographis paniculata*:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Angiosperm
Kelas	: Dicotyledonae
Subkelas	: Gamopellatae
Series	: Bicarpellatae
Ordo	: Personales
Family	: Acanthaceae
Subfamily	: Acanthoideae
Suku	: Justiciae
Subsuku	: Andrographideae
Genus	: <i>Andrographis</i>
Species	: <i>Andrographis paniculata</i> (Verma Research Scholar <i>et al.</i> , 2019).

##### 2. Morfologi Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tumbuhan tahunan yang memiliki cabang dengan tinggi 30-110 cm. Tanaman ini dapat tumbuh ditempat yang teduh dan lembab dengan batang berbentuk segi empat, yang

memiliki banyak cabang, tekstur batang yang rapuh, dan mudah patah. Daun sambiloto memiliki bentuk yang sederhana, lanset, permukaan rata, panjang 2-12 cm, lebar 1-3 cm dengan bentuk lancip pada bagian ujung daun. Bunga sambiloto merupakan bunga majemuk yang tumbuh dari ketiak daun, dan memiliki 2 benang sari. Kelopaknya terdiri dari 5 helai daun kelopak, berambut, dan panjang 3-4 mm. Daun mahkotanya berwarna putih hingga kehijauan dan memiliki bentuk yang bulat panjang seperti kapsul dan terdapat biji berwarna coklat kuning, serta bunga atas berwarna putih keunguan dengan pangkal dan ujung yang lancip (Kataky & Handique, 2010). Tumbuhan sambiloto dapat diamati pada Gambar 1.

*Andrographis paniculata* tumbuh subur di Asia Tenggara, India, Sri Lanka, Pakistan, Malaysia, Indonesia, Cina, dan Thailand sehingga dibudidayakan secara luas. *Andrographis paniculata* biasanya tumbuh dari biji, tanah apapun yang memiliki cukup bahan organik cocok untuk budidaya komersial tanaman ini (Kataky & Handique, 2010).



Gambar 1. Tumbuhan Sambiloto  
(Sumber: Dokumen Pribadi)

### 3. Manfaat Sambiloto (*Andrographis Paniculata*)

Tumbuhan sambiloto banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Sebagian besar daun dan akar telah digunakan untuk mengobati saluran pencernaan, infeksi saluran pernafasan, demam, herpes, sakit tenggorokan, dan berbagai penyakit dan infeksi lainnya (Kataky & Handique, 2010). Dari informasi klinis, tumbuhan sambiloto juga memiliki kemampuan untuk pencegahan serta pengobatan terhadap penyakit flu, radang amandel, diare, dan juga mampu mengobati penyakit usus. Tanaman sambiloto mempunyai manfaat terapeutik yang bersifat immunosupresif dan alexipharine yang berguna dalam penyembuhan bisul, luka, kista, tonsilitis, osteodynea, hematometra menstruasi, hipertensi, dan pasca melahirkan (Pandey *et al.*, 2019).

Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa tumbuhan sambiloto mengandung metabolit sekunder seperti steroid, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid (Vijayaraghavan *et al.*, 2015). Tumbuhan sambiloto juga dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis yang penting, seperti antibakteri, antiinflamasi, antidiare, antimalaria, hepatoprotektif, kardiovaskular, antikanker, dan aktivitas imunostimulan (Sharma *et al.*, 2011). Dilaporkan pada tumbuhan sambiloto ditemukan sejumlah senyawa bioaktif golongan steroid seperti,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, 5,2'-dihidroksi-7,8-dimetoksiflavon, trans-cinnamat, ester rantai panjang dan ester asam lemak  $\beta$ -sitosteril yang diisolasi dari tumbuhan sambiloto yang memiliki aktivitas farmakologi dan potensi sebagai sumber bahan baku obat (Utami, 2021).

## **B. Jamur Endofit pada Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*)**

Jamur endofit merupakan organisme yang hidup pada jaringan organ dalam tumbuhan, tanpa menimbulkan efek negatif atau kerugian bagi tumbuhan inangnya (Sun *et al.*, 2008). Jamur endofit adalah suatu kelompok mikroorganisme polifiletik yang sangat beraneka ragam. Jamur endofit dapat tumbuh pada bagian daun, batang, ranting, akar, maupun bunganya (Kusari *et al.*, 2012). Hubungan simbiosis mutualisme antara jamur endofit dengan tanaman inangnya terbentuk dalam evolusi ekosistem jangka panjang yang dapat mendorong pertumbuhan tanaman dan meningkatkan ketahanan penyakit. Oleh sebab itu, jamur endofit berperan penting dalam proses suksesi tanaman (Sun *et al.*, 2008).

Dilaporkan dari penelitian sebelumnya oleh Puri *et al.*, 2018 isolasi jamur endofit dari daun *A. paniculata* dan juga penelitian oleh Elfitra *et al.*, 2011 dari batang *A. paniculata* berhasil diidentifikasi jamur endofit yaitu *Spergillus flavus* yang berpotensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Penelitian lainnya terkait jamur endofit pada *A. paniculata* juga dilakukan oleh Gajalaksmi *et al.*, 2012 dimana, lima jamur endofit berhasil diisolasi di beberapa bagian *A. paniculata*. Bagian daun terdapat dua isolat jamur yaitu *Alternatif* dan *ragi*, *Fusarium* terdapat pada bagian tangkai dan dua isolat jamur yaitu *Aspergillus niger* dan *Aspergillus flavus* pada bagian akar.

Salah satu sumber metabolit sekunder yang bernilai untuk penemuan obat terapeutik baru yang sangat berpotensi seperti, steroid, terpenoid, alkaloid adalah jamur endofit (Zinov'ev & Sole, 2004). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kandungan kimia yang terdapat dalam jamur endofit yang diisolasi dari ranting RS-1 tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*) memiliki aktivitas antibakteri

jamur endofit RS-1 dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil dari penelitian tersebut juga menunjukkan bahwasannya uji fitokimia dari ekstrak EtoAc jamur endofit mengandung metabolit sekunder seperti steroid, terpenoid, alkaloid, dan fenolik (Anshar *et al.*, 2021).



Gambar 2. Jamur Endofit RS-1  
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

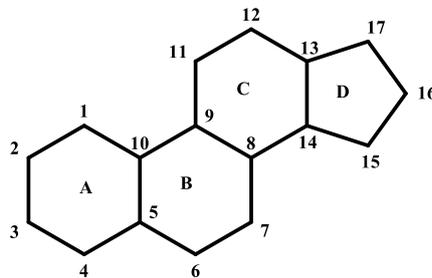
## C. Steroid

### 1. Tinjauan Umum Steroid

Senyawa organik bahan alam yang dihasilkan oleh organisme tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme adalah steroid. Struktur kimia dari steroid terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan satu cincin karbon pentagonal, yang diatur dalam struktur 6-6-6-5 yang semua kelompok fungsional dan rantai yang melekat. Perbedaan antara jenis steroid berada pada substituen yang terikat ke empat cincin ini dan fase oksidasi setiap cincin (Aufartová *et al.*, 2011). Struktur umum steroid dapat dilihat pada Gambar 3.

Steroid alami berasal dari triterpenoid, ini didasari oleh eksperimen biogenetik. Steroid di alam dapat ditemukan pada jaringan hewan dan tumbuhan. Steroid yang terdapat pada jaringan hewan diturunkan dari triterpenoid lanosterol, sedangkan pada jaringan tumbuhan diturunkan dari sikloartenol triterpenoid setelah

triterpenoid ini mengalami serangkaian perubahan tertentu. Pada tumbuhan steroid berperan sebagai memperlambat ranum sehingga daun pada tumbuhan tidak mudah kering, mati, dan gugur. Sterol merupakan golongan steroid yang umumnya terdapat pada tumbuh-tumbuhan (Kurnia *et al.*, 2017).



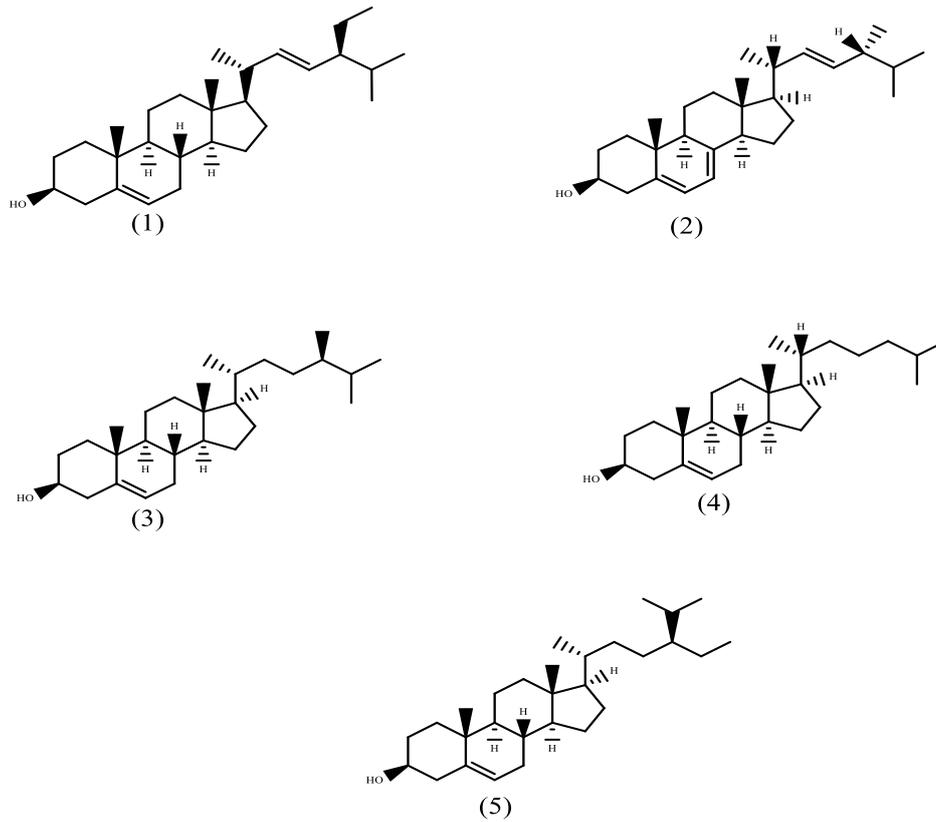
Gambar 3. Struktur Umum Steroid  
(Kurnia *et al.*, 2017).

## 2. Klasifikasi Steroid

Steroid memiliki berbagai karakteristik tergantung terhadap pengaruh fisiologis yang diberikan oleh masing-masing senyawa:

### a. Sterol

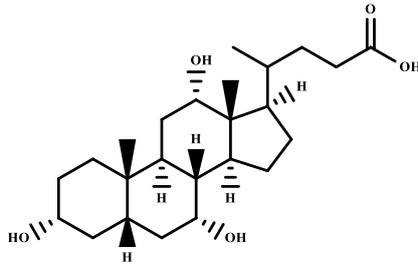
Sterol banyak ditemukan pada makhluk hidup seperti manusia, tanaman, hewan, dan jamur. Sterol merupakan struktur khas steroid dan memiliki rumus bangun yang diturunkan dari kolestena yang memiliki gugus hidroksi pada atom C-3. Beberapa contoh sterol adalah kolesterol, campresol, sitosterol, stigmasterol, ergosterol yang struknya ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur (1) Stigmasterol, (2) Ergosterol, (3) Campesterol, (4) Kolesterol dan (5) Sitosterol (Bloem *et al.*, 2013).

#### b. Asam Empedu

Asam empedu adalah asam steroid yang dihasilkan oleh hati dan disimpan di dalam empedu. Asam empedu dikenal dalam bentuk asam kolik dengan campuran antara glisin dan taurine. Asam empedu primer (utama) yang terbentuk di hati merupakan asam oksalat dan asam kenodeoksikolat. Gambar 5 merupakan struktur dari asam kolat.

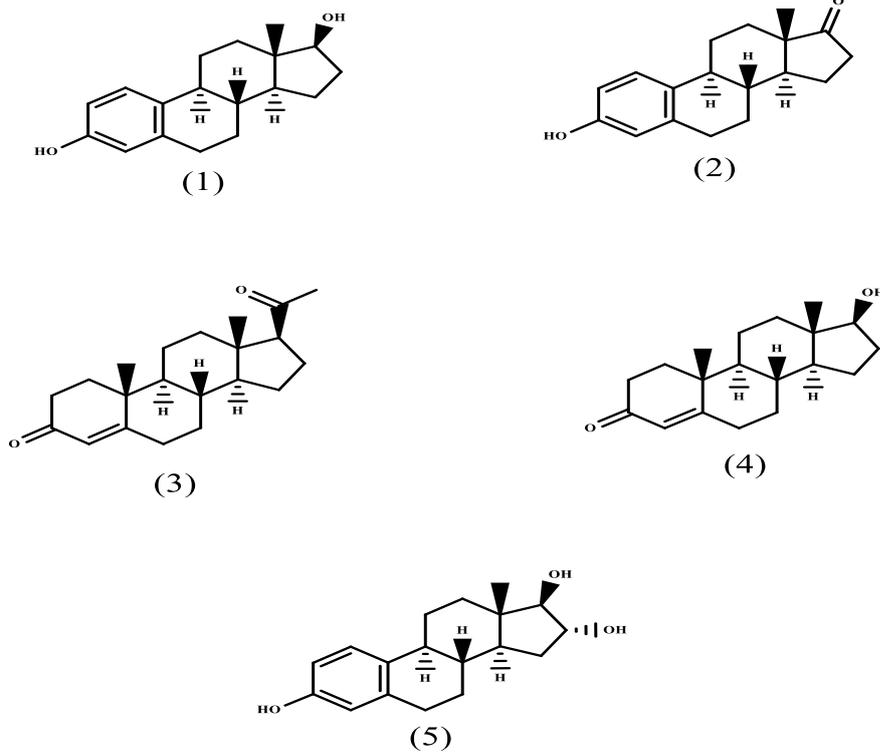


Gambar 5. Asam Kolat  
(Keegan & Killeen, 2001).

### c. Hormon Seks

Gonad dan adrenal menghasilkan hormon yang berfungsi untuk kontrasepsi, maturase fetus, pertumbuhan karakteristik seks primer, dan peningkatan kualitas seks esensial. Hormon seks merupakan bagian dari steroid, atomnya memiliki sifat datar dan tidak fleksibel. Strukturnya berasal dari siklopentanoperhidrofenantrena yang memiliki sifat keras.

Hormon seks diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok yaitu, hormon androgen (testosteron dan dihidrotestosteron), hormon esterogen (estradiol, estron, dan estriol), hormon progestin (progesteron), dan obat kontrasepsi. Gambar 6 menampilkan contoh beberapa struktur hormon.



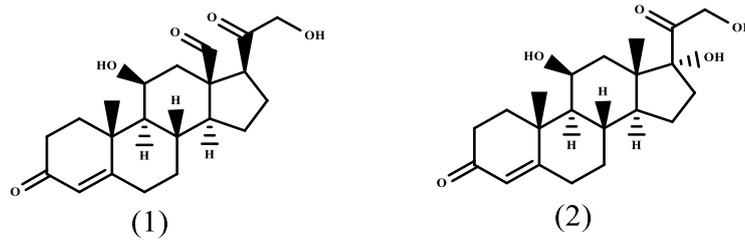
Gambar 6. (1) Estradiol, (2) Estron, (3) Progesteron, (4) Testosteron, dan (5) Estrio  
(Storbeck *et al.*, 2019).

#### d. Hormon Adrenokortikoid

Hormon adrenokortikoid adalah hormon steroid yang berperan dalam mengontrol respon inflamasi. Hormon adrenokortikoid dibagi menjadi 2, yaitu:

- 1) Mineralokortikoid: Dapat mempengaruhi elektrolit cairan ekstraseluler, terutama natrium dan kalium. Sedangkan pada manusia adalah aldosteron.
- 2) Glukokortikoid: Dapat membentuk glukosa darah, seperti efek tambahan pada pencernaan protein dan lemak, misalnya, pada pencernaan karbohidrat.

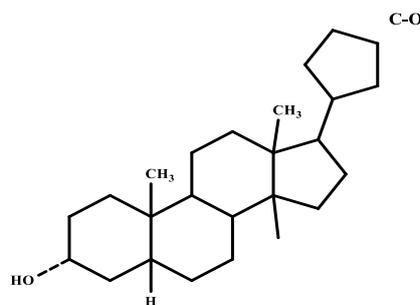
Kortisol atau hidrokortisol bagian dari hormon glukokortikoid. Gambar 7 merupakan struktur kortisol dan aldosteron.



Gambar 7. (1) Aldosteron, (2) Kortisol  
(Aufartová *et al.*, 2011).

e. Aglikon kardiovaskular

Aglikon kardiovaskular dalam struktur glikosidanya disebut glikosida jantung dan kardenolida. Tanaman yang memiliki senyawa ini memiliki peranan sejak zaman kuno sebagai racun. Glikosida memiliki dampak kardiotonik khusus dimana kehadiran senyawa ini pada tanaman memberikan suaka bagi tanaman dari impedansi dari insekta tertentu. Gambar 8 struktur agliko kardiovaskular.



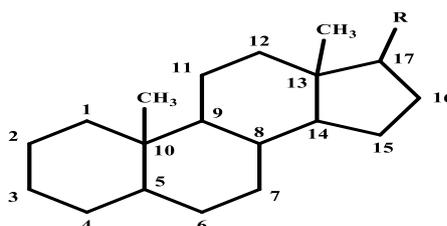
Gambar 8. Aglikon Kardiak  
(Susilawati *et al.*, 2010).

f. Sapogenin

Sapogenin dan struktur glikosidanya dikenal sebagai saponin. Saponin merupakan zat yang dapat menyebabkan buih jika dikocok dalam air (karena bersifat seperti sabun, maka disebut saponin). Saponin memiliki sifat amfifilik karena sapogenin adalah sakarida lipofilik dan hidrofilik (Susilawati *et al.*, 2010).

### 3. Tata Nama Steroid

Seperti senyawa organik lain, steroid juga memiliki sistematika tata nama yang mendasari struktur dari hidrokarbon steroid tertentu. Nama hidrokarbon dalam steroid ditambahkan awalan atau akhiran yang membuktikan kelompok substituen. Sementara, letak substituen ditandai posisi atom C yang terikat pada substituen. Penomoran atom C didalam struktur steroid dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Penomoran Steroid  
(Moss, 1989).

Berdasarkan terhadap bentuk umum steroid tersebut, maka ada jenis-jenis hidrokarbon induk dari steroid yang ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis-jenis Hidrokarbon Induk dari Steroid

Nama	Jumlah atom C	Jenis rantai samping (R)
Androstan	19	-H
Pregnan	21	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Kolan	24	-CH(CH <sub>3</sub> ) (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Kolestan	27	-CH(CH <sub>3</sub> ) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Ergostan	28	-CH(CH <sub>3</sub> ) (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Stigmastan	29	-CH(CH <sub>3</sub> ) (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

#### 4. Sifat Umum Steroid

Berikut sifat umum steroid.

- a. Memiliki kerangka dasar triterpen asiklik. Kerangka dasar steroid terdiri dari 3 cincin dari 6 yang menyatu dalam cincin 5 (1,2-siklopentanoperhidrofenantrena).
- b. Steroid memiliki inti siklopentanoperhidrofenantrena yang juga disebut inti sterol.
- c. Memiliki bentuk 4 cincin yang menyatu. Cincin A, B dan C memiliki enam atom karbon, dan cincin D memiliki 5 karbon.
- d. Steroid terdapat di alam tetapi dengan jumlah tertentu dan memiliki aktivitas biologis.
- e. Memiliki ciri-ciri tertentu, sebagai berikut.
  - 1) Substitusi oksigen pada atom C-3 yang membentuk karakteristik steroid alami.
  - 2) Substitusi gugus metil sudut pada atom C-10 dan C-13, yang dikenal sebagai atom C-18 dan C-19, kecuali senyawa steroid dengan cincin benzenoid A, misalnya, pada gugus estrogen.
- f. Memiliki struktur basa tetrasiklo. Struktur dasar mempunyai 4 cincin terikat, serta 3 cincin sikloheksana dan siklopentana disintesis dari asetil KoA melalui jalur asam mevalonat dalam metabolisme sel tumbuhan.
- g. Steroid pada tumbuhan menghasilkan brassinolide, sedangkan steroid pada hewan menghasilkan kolesterol, dan lainnya pada jamur menghasilkan ergosterol.

- h. Steroid yang paling banyak dalam tubuh manusia adalah kolesterol. Kolesterol mempunyai bentuk steroid dasar yang mempunyai substituen metil, dan hidroksi yang melekat pada cincin utama, dan rantai alkil (Kushnir *et al.*, 2011).

## 5. Identifikasi Steroid

Steroid dapat diidentifikasi dengan mengekstraksi sampel menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak etil asetat dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda dan ditambahkan amonia-kloroform dan 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Campuran ini dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan bawah dipindahkan ke pelat tetes. Setelah pelarut menguap, ditambahkan asam asetat anhidrat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pa. Warna hijau-biru menunjukkan adanya steroid (Anshar *et al.*, 2021).

## 6. Kegunaan Steroid

Steroid memiliki kegunaan yang banyak, baik itu pada tumbuhan, hewan, maupun pada manusia. Pada makhluk hidup, steroid berfungsi meningkatkan pemanjangan sel, menghambat penuaan, menghasilkan lekukan atau bentuk, menghambat pertumbuhan yang berlebihan, meningkatkan ketahanan cekaman lingkungan pada makhluk hidup (Kurnia *et al.*, 2017). Steroid pada fauna berkaitan dengan zat kimia dan keaktifan biologis, sedangkan pada tumbuhan dapat menghambat pengguguran dini pada daun, dan pada manusia steroid dapat digunakan sebagai obat misalnya, sebagai obat penambah energi agar pencernaan tubuh manusia menjadi lebih stabil (Kurnia *et al.*, 2017).

Steroid dilaporkan memiliki banyak peran klinis yang memiliki sifat antibakteri dan antiinflamasi. Salah satu senyawa steroid yang berpotensi sebagai antibakteri adalah steroid kationik (CSA) yang terbukti memiliki aktivitas

antibakteri. Steroid kationik (CSA) memiliki dua jenis aktivitas antibakteri, yang pertama aktivitas yang mematikan dan yang kedua aktivitas tidak mematikan (Savage *et al.*, 2002).

#### **D. Metoda Ekstraksi**

Untuk memperoleh senyawa kimia yang larut dalam pelarut organik dapat digunakan metoda ekstraksi. Ada beberapa jenis metoda ekstraksi yang umum digunakan dalam proses pemisahan dan pemurnian senyawa bioaktif yang akan dihasilkan yaitu ekstraksi metoda maserasi, perkolasi, dan sokletasi (Kiswandono, 2017).

##### **1. Maserasi**

Maserasi adalah proses merendam sampel untuk mengekstrak komponen yang diinginkan dalam kondisi dingin yang tidak kontiniu (Umbrell, 2002). Tujuan teknik maserasi adalah untuk memuai permukaan sehingga kerjasama antara zat terlarut dengan senyawa yang diambil lebih layak dan senyawa tersebut dapat dipisahkan. Untuk menghindari pepadatan sampel sehingga pelarut sulit untuk menembus bahan dan kesulitan mengambil senyawa aktif, maka dilakukan pengadukan secara berkala (Rosita *et al.*, 2017).

Metoda maserasi pada prinsipnya tidak memerlukan pemanasan (ekstraksi dingin). Metoda maserasi ini ditujukan pada bahan-bahan alami yang memiliki partikel kimia yang tidak tahan terhadap panas dan tekstur lembut. Keuntungan dari metoda ini adalah sederhana, tidak memerlukan alat yang rumit, dan relatif murah (Kiswandono, 2017).

## 2. Perkolasi

Ekstraksi dengan perkolasi dilakukan dalam perkolator dengan sampel dan pelarut tertentu, dimana sampel dimasukkan dalam perkolator dan ditambahkan pelarut yang akan merendam sampel sekitar satu jam. Setelah satu jam, pengunci perkolator dibuka sehingga mengeluarkan hasil ekstrak, lalu diulangi sampai pelarut terlihat jernih (Syahbanu & Melati, 2019). Metoda ini merupakan ekstraksi dingin atau ekstraksi yang tidak menggunakan panas, sehingga tidak merusak senyawa yang terkandung di dalamnya, dan akan diperoleh ekstrak yang sempurna karena waktu kesetimbangan yang lama akibat penambahan pelarut secara terus menerus untuk menghindari kejenuhan (Andhiarto *et al.*, 2020).

## 3. Sokletasi

Sokletasi adalah metoda ekstraksi panas yang tidak tepat untuk sampel tanaman yang mengandung senyawa termolabil. Metoda ini memerlukan alat soklet dan memiliki kelebihan yaitu pemakaian pelarut yang lebih minim, waktu yang lebih cepat dan filtrat yang lebih bagus (Verawati *et al.*, 2017). Teknik sokletasi, merupakan cara yang paling umum untuk mengisolasi bagian yang terkandung dalam simplisia yaitu dengan penyaringan berulang. Penyaringan berulang dari sokletasi dapat meningkatkan jumlah senyawa yang akan dikeluarkan, karena sokletasi dilakukan selama kurang lebih 7 siklus atau sampai tetes siklus tersebut menjadi bening. Tetesan bening dari siklus menunjukkan bahwa setiap campuran dalam simplisia telah dipisahkan seluruhnya (Rosita *et al.*, 2017).

Penggunaan pelarut dan suhu yang tinggi pada metoda sokletasi dapat memisahkan komponen yang diinginkan. Suhu tinggi yang digunakan dalam metoda sokletasi adalah suhu yang tidak langsung. Proses suhu tidak langsung ini

dimana pelarut dalam labu mengalami proses penguapan lalu menuju ke kondensor dan terjadi proses kondensasi, sehingga membuat kehilangan atau degradasi senyawa volatil. Pemanasan dengan metoda sokletasi membantu mengekstrak senyawa yang tidak larut pada suhu kamar, dapat membebaskan dan mengaktifkan subunit polimer berbobot molekul rendah dari berat molekul tinggi sehingga aktivitas penarikan senyawa dimaksimalkan (Rosita *et al.*, 2017).

## **E. Pemisahan Komponen Kimia**

### **1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Metoda partisi yang memerlukan adsorben (fasa diam) berbentuk lapisan tipis yang dilapisi pada permukaan datar misalnya, plat aluminium, plat kaca, atau plat plastik disebut kromatografi lapis tipis (Ibrahim *et al.*, 2016). Uji KLT dilakukan untuk menentukan rasio eluen yang sesuai untuk pemisahan campuran. Pemisahan dengan kromatografi lapis tipis menggunakan sistem elusi gradien atau SGP (*Step Gradient Polarity*) (Hasnirwan *et al.*, 2015). Kromatografi lapis tipis dapat digunakan jika senyawa yang akan dipisahkan tidak mudah menguap dan memiliki sifat polar, semi-polar, non-polar, atau ionik dan zat pada senyawa yang akan diselidiki tidak dapat ditemukan menggunakan metoda KC atau KG.

Selesai pada prosedur kromatografi, seluruh partikel pada senyawa harus dideteksi (berkaitan dengan nilai  $R_f$ ). Komponen campuran senyawa akan dideteksi secara terpisah setelah pemisahan atau akan dideteksi dengan berbagai metoda secara bergantian (misalnya dalam penapisan obat) (Ibrahim *et al.*, 2016). Dalam KLT, pengenalan pertama pada senyawa berdasarkan terhadap perbandingan nilai  $R_f$  dibandingkan dengan  $R_f$  standar. Umumnya nilai  $R_f$  tidak sama, jadi perlu diperhatikan penggunaan  $R_f$  relatif, khususnya nilai  $R_f$  dari senyawa pewarna yang

dengan noda campuran yang berbeda pada plat yang sama. Unsur- unsur yang memicu harga Rf berubah antara lain, luas dan jenis ruangan, sifat dan ukuran plat, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dll.

Nilai Rf dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

(Wulandari, 2011).

Teknik pengenalan ini dapat digunakan untuk mengenali zona langsung pada lapisan (*in situ*). Identifikasi dapat diperoleh dengan mengikis noda kemudian hasilnya dielusi dan dideteksi oleh spektrometri inframerah (IR), spektrometri Resonansi magnetik nuklir (NMR), spektrometri massa, atau metoda spektrometri lainnya jika senyawa yang dielusi cukup tersedia. (Wulandari, 2011).

## 2. Kromatografi Cair Vakum

Kromatografi cair vakum pertama kali ditemukan oleh Targett yang digunakan untuk pemisahan diterpen di Australia pada tahun 1997. Kromatografi cair vakum banyak diterapkan sebagai fraksinasi dan isolasi produk alami seperti steroid, terpenoid, flavonoid, dan senyawa lainnya pada suatu sampel. Sampel yang terdapat pada kolom berpindah terhadap fasa diam dan fasa gerak secara cepat dikarenakan oleh vakum tersebut. Kromatografi cair vakum mempunyai banyak kelebihan sehingga metoda ini sering digunakan, salah satunya yaitu pengemasannya yang sederhana dan dapat digunakan kembali untuk pemisahan lainnya dengan mencuci kolom menggunakan metanol dan membuang bahan dibagian atas kolom adsorben (Maurya *et al.*, 2018).

Prinsip kromatografi cair vakum adalah partisi dan adsorpsi komponen yang terdapat didalam senyawa dengan bantuan dari alat vakum untuk pemisahannya. Fasa gerak terlebih dahulu diketahui dengan metoda KLT dimana fasa gerak terbaik akan digunakan dalam kromatografi cair vakum, sedangkan Fasa diam yang digunakan dalam kromatografi cair vakum yaitu silika gel G60 ukuran 200 mesh (Olanlokun *et al.*, 2017).

### 3. Kromatografi Kolom (KK)

Proses kromatografi kolom dapat dilakukan dengan mensuspensikan silika gel menggunakan *n*-heksana, dan bubuk silika ini dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang bagian bawahnya dilapisi kapas sebagai filter silika gel yang dicampur dengan *n*-heksana. Selanjutnya *n*-heksana dibiarkan turun sementara dinding kolom diketuk agar mencegah terjadinya rongga udara yang menyebabkan silika menjadi berbentuk padat dan rata (Hasnirwan *et al.*, 2015).

Prinsip kromatografi kolom adalah adanya variasi kapasitas serapan dari zat-zat yang akan diuji. Sampel dilarutkan dalam pelarut kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi melalui bagian atas kolom dan larutan mengalir ke fase diam yang kemudian berpindah ke bawah saat terjadi pemisahan (Rosita *et al.*, 2017).

### 4. Rekristalisasi

Rekristalisasi adalah teknik untuk memurnikan padatan dari pengotornya yang dilakukan dengan mengkristal ulang zat setelah dilarutkan dalam solven yang sesuai (Umam, 2019). Rekristalisasi berfungsi untuk menghilangkan pengotor agar mendapatkan senyawa yang murni. Rekristalisasi dilakukan dengan melarutkan padatan yang akan direkristalisasi dalam pelarut yang sesuai. Filtrat kemudian

didinginkan hingga menghasilkan padatan sempurna. Padatan disaring melalui filter Buchner dan dicuci dengan pelarut dingin dan dikeringkan. Kristal yang telah direkristalisasi diuji kemurniannya dengan KLT dan titik leleh (Pinalia, 2011).

## **F. Uji Kemurnian**

### **1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Senyawa hasil pemisahan dilanjutkan menguji kemurniannya dengan KLT menggunakan pelarut yang memiliki perbandingan yang berbeda. KLT bertujuan untuk menentukan jumlah partikel yang masih terdapat pada fraksi yang dapat dilihat dari banyaknya noda yang muncul pada kromatogram. Proses ini untuk memastikan kemurnian isolat, yang ditunjukkan dengan munculnya satu titik noda pada setiap KLT di kromatogram (Prastika *et al.*, 2021).

### **2. Penentuan Titik Leleh**

Penentuan titik leleh dilakukan dengan alat titik leleh berupa pipa kapiler. Prosedur kerjanya mirip dengan uji kemurnian menggunakan titik leleh. Temperatur awal padatan amorf yang berangsur mencair ditambahkan dengan temperatur padatan amorf yang meleleh sempurna diperoleh hasil dengan dibagi dua. Temperatur rata-rata adalah titik leleh kristal steroid murni yang diisolasi. Titik leleh digunakan untuk pastikan kristalnya murni. Titik leleh kristal diuji dengan alat titik leleh yang disebut alat Gallenkamp. Padatan amorf yang direkristalisasi dikatakan murni apabila menghasilkan rentang titik leleh  $< 2^{\circ}\text{C}$  (Kurnia *et al.*, 2017).

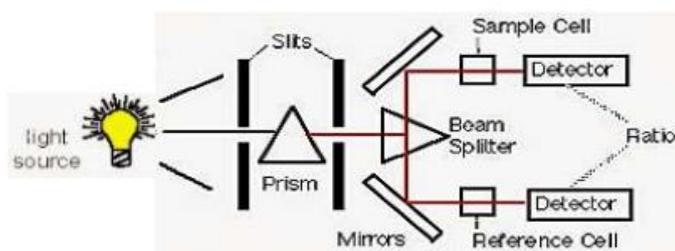
## G. Karakterisasi

### 1. Pereaksi Kimia

Pereaksi kimia dapat digunakan sebagai pengenalan reaksi steroid secara sederhana yaitu dengan pereaksi Liebermann Burchard (LB). Senyawa hasil isolasi direaksikan dengan dengan pereaksi LB akan membentuk warna biru kehijauan. Pereaksi *Liebermann Burchard* merupakan campuran antara asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Asam asetat anhidrat untuk mengekstrak dan memastikan media bebas dari air dan membentuk turunan asetil dari steroid. Asam sulfat pekat apabila ditambahkan akan membentuk warna hijau untuk senyawa steroid.

### 2. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metoda yang digunakan untuk menetapkan kualitas suatu senyawa yang akan diteliti secara kuantitatif maupun penelitian kualitatif sesuai hubungan antara benda dan sinar. Alat yang digunakan pada spektrofotometri UV-Vis disebut spektrofotometer dan sinar yang digunakan itu tidak hanya UV tetapi juga menggunakan sinar tampak dan gelombang. Sinar ultraviolet (UV) mempunyai rentang panjang gelombang dari 100-400 nm, sedangkan sinar tampak (Vis) 400-750 nm, sinar dimulai dari tidak berwarna-ungu-merah mikro. Prosedur dan prinsip spektrofotometer UV-Vis dapat diamati pada Gambar 11 berikut.



Gambar 10. Prinsip dan Cara Kerja Spektrofotometer UV-Vis  
(Maria Goreti usboko, 2018).

Bila sebuah molekul pada cairan khusus menyerap daya pada sinar UV dan sinar tampak kemudian jumlah daya yang diserap sehingga terjadi transfer elektron dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi yang disebut transisi elektronik, saat sinar monokromatik ( $I_0$ ) melewati larutan sehingga sebagian sinar diserap ( $I_a$ ), sebagian lagi dipantulkan ( $I_r$ ), serta sebagian diteruskan ( $I_t$ ). Proses penyerapan cahaya pada spektrofotometer UV-Vis ini berdasarkan pada hukum Lambert Beer . (Tsoulfanidis, 2020).

Orbital sigma ( $\sigma$ ); orbital pi ( $\pi$ ); dan orbital elektron bebas ( $n$ ) merupakan jenis utama orbital energi molekul transisi elektron. Setiap orbital molekul ini memiliki orbital  $\sigma^*$  atau  $\pi^*$  antiikatan yang terkait bersamaan. Transisi  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  Elektron di dalam orbital molekul bonding dieksitasi ke orbital antibonding sesuai dengan energi radiasi yang diserap. Molekul berada dalam keadaan tereksitasi  $\sigma^*$ . Energi yang diperlukan untuk eksitasi ini sangat besar sesuai dengan energi sinar ultraviolet vakum. Senyawa metan ( $\text{CH}_4$ ) yang hanya mengandung ikatan tunggal C – H akan mengalami transisi  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  pada penyerapan sinar, mempunyai puncak serapan pada 125 nm (di daerah ultraviolet vakum), tidak teramati pada daerah ultraviolet. Jenis transisi ini terjadi pada senyawa-senyawa organik jenuh atau atom-atom yang memiliki elektron-elektron bukan ikatan. Sedangkan transisi  $n \rightarrow \sigma^*$  memerlukan energi yang lebih kecil dari pada energi yang diperlukan untuk transisi  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  karena disebabkan oleh radiasi ultraviolet dengan panjang gelombang yang lebih besar, yaitu antara 150-250 nm dengan kebanyakan puncak absorpsi di bawah 200 nm. Transisi ini dapat terjadi pada senyawa jenuh yang mengandung atom-atom dengan elektron-elektron tidak berpasangan. Untuk

transisi  $\eta \rightarrow \pi^*$  dan  $\pi \rightarrow \pi^*$  memiliki energi yang cukup rendah, yaitu pada panjang gelombang 200 – 700 nm sehingga mudah untuk diukur dengan spektrofometer yang biasa digunakan. Untuk memungkinkan terjadinya transisi ini diperlukan gugus fungsi yang tak jenuh untuk menyediakan orbital  $\pi$ . Zat-zat pengabsorpsi tak jenuh ini dinamai *Chomophore*. Absorptivitas molar untuk puncak-puncak eksitasi  $\eta \rightarrow \pi^*$  umumnya rendah, biasanya berkisar antara 10 sampai 100  $\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ . Sedangkan absorptivitas molar untuk puncak-puncak eksitasi  $\pi \rightarrow \pi^*$  adalah 100 kali hingga 1000 kali (Zackiyah, 2016). Pergeseran panjang gelombang pada spektrum UV-Vis terdapat pergeseran efek batokromik, efek hipsokromik, efek hiperkromik, dan efek hipokromik. Efek batokromik atau pergeseran merah adalah terjadi perubahan absorpsi panjang gelombang ke arah panjang gelombang yang lebih besar, hal ini terjadi karena adanya substituen/auksokrom tertentu pada kromofor, misalnya pengukuran dari benzena ke fenol, panjang gelombang maksimum fenol akan lebih besar dibandingkan panjang gelombang benzena; atau dapat juga terjadi karena ada perubahan pelarut. Efek hipsokromik atau pergeseran biru adalah terjadinya perubahan absorpsi ke panjang gelombang yang lebih pendek. Hal ini terjadi karena perubahan pelarut atau tidak adanya substituen/auksokrom pada suatu kromofor. Efek hiperkromik adalah terjadinya peningkatan intensitas absorpsi dan hipokromik penurunan intensitas absorpsi, hal ini terjadi misalnya karena perubahan pelarut (Tati, 2017).

### 3. Spektrofotometri Inframerah

Spektrofotometri inframerah adalah teknik yang digunakan untuk membuktikan keberadaan gugus fungsi pada senyawa serta memeriksa interaksi

unsur dengan memanfaatkan radiasi elektromagnetik yaitu dengan  $\lambda$  0,75-1000  $\mu\text{m}$  atau terhadap bilangan gelombang 13.000-10  $\text{cm}^{-1}$  (P. Siagian, 2010).

Proses analisis sampel menggunakan spektroskopi inframerah yaitu sebagai berikut:

- Sumber: energi inframerah yang dipancarkan dari sumber benda hitam bercahaya. Cahaya ini lewat melalui aperture yang memantau jumlah energi yang dikirim ke sampel (dan akhirnya ke detektor).
- Interferometer: cahaya memasuki interferometer di mana "pengkodean spektral" terjadi. Menghasilkan sinyal interferogram yang kemudian, menyalakan interferometer.
- Sampel: cahaya memasuki kompartemen sampel dipantulkan pada bidang sampel, tergantung pada bentuk analisisnya.
- Detektor: cahaya akhirnya menembus ke detektor untuk pengukuran akhir.
- Komputer: Sinyal yang diukur adalah digital dan dimasukkan ke komputer tempat transformasi Fourier terjadi. Spektrum inframerah yang terakhir kemudian disajikan kepada pengguna untuk diolah lebih lanjut (P. Siagian, 2010). Tabel 2 berikut menampilkan jenis ikatan dan bilangan gelombang dari spektrum inframerah.

Tabel 2. Daftar Beberapa Daerah Serapan Jenis Ikatan dan Bilangan pada Spektrofotometer Inframerah

Senyawa	Gugus Fungsi	Bilangan gelombang ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ )	Keterangan
Alkana	$\text{CH}_3$	2970-2950 / 2880-2860 1470-1430 / 1380-1370 1385-1380 / 1370-1365 1395-1385 / 1365	Regangan Tekukan Geminal dimetil Trimetil / tetra metil
	$\text{CH}_2$	2935-2915 / 2865-2845 1485-1445 750-720	Regangan Tekukan

			Ayunan
	CH	2900-2880 1350-1330 1300-700	Regangan Tekukan Getaran
Alkena	C=C	1680-1620 1600	Regangan Konjugasi
	C-H	3095-3075 3040-3010 970-960 700	Regangan Regangan C-H trans C-H cis (lebar)
Alkuna	C≡C	2140-2100 2260-2190	Terminal Medial
	C-H	3320-3310 680-610 630	Regangan Regangan Tekukan
Aromatik	C=C	1615-1580 1510-1450	Regangan Regangan
	C-H	3130-3070 1225-950 900-670	Regangan Tekukan Tekukan
		770-730, 710-690 770-735 810-750, 900-860 860-800	Monosubstitusi Orto Meta Para
Alkohol	O-H	3570-3200 3400-3200 3645-3630 3635-3620 3620-3540 3640-3530	Regangan (lebar) Regangan Regangan Regangan Regangan Regangan
	C-O	1050 1100 1150 1200	Regangan Regangan Regangan Regangan
Amina	N-H	1650-1590 1650-1550	Regangan Tekukan
	C-N	1090-1020 1190-1130 1210-1150	Regangan Regangan

			Regangan
Eter	C-H	2820-2810	Regangan
	C-O-C C-O-C (siklik)	1150-1050 1140-1070	Regangan Regangan
Karbonil	C=O		
	Asam karboksilat	1725-1700 / 1420-1300 1725-1700	
	Keton	1725-1705 1690-1675	
	Aldehid	1740-1725	
	Ester Amida	1750-1725 1680-1630	

(Kasal *et al.*, 2010).

## **BAB V**

### **PENUTUPAN**

#### **A. Kesimpulan**

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

1. Senyawa steroid hasil isolasi dari jamur endofit RS-1 yang diisolasi dari ranting tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*) berupa kristal berwarna kuning seberat 0,3437 gram dan titik leleh 139,7-140,9°C.
2. Karakteristik senyawa steroid hasil isolasi dari jamur endofit RS-1 dengan pereaksi kimia menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan hasil warna kehijauan. Spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi memiliki serapan pada panjang gelombang 270 nm adanya ikatan rangkap C=C terkonjugasi atau diena terkonjugasi yang diperkuat dari hasil spektrofotometri Inframerah menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa steroid yang mengandung gugus O-H, C-H, C=C, CH<sub>3</sub>, =C-H, dan C=O.

#### **B. Saran**

Senyawa steroid hasil isolasi belum diketahui strukturnya oleh karena itu disarankan untuk melanjutkan karakterisasi menggunakan Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (RMI) dan Spektroskopi Massa (MS). Senyawa hasil isolasi perlu dilakukan uji bioaktivitasnya seperti sebagai antibakteri dan antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abu Bin Nyeem, M., Abdul Mannan, M., Nuruzzaman, M., Kamrujjaman, K., & Kumar Das, S. (2017). Indigenous king of bitter (*Andrographis paniculata*): A review. ~ 318 ~ *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(2), 318–324.
- Aini, N., & Rahayu, T. (2015). Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS*, 855–860.
- Andhiarto, Y., Andayani, R., & Ilmiyah, N. H. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss. ) dengan Metode Ekstraksi Perkolasi Terhadap Pertumbuhan Bakteri. *Journal of Pharmacy Science and Technology*, 2(1), 102. <https://doi.org/10.30649/pst.v2i1.99>
- Anggraini, D. I., & Nabillah, L. F. (2018). Activity Test of Suji Leaf Extract (*Dracaena angustifolia* Roxb.) on in vitro cholesterol lowering. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 21(2), 54–58. <https://doi.org/10.14710/jksa.21.2.54-58>
- Anshar, V., Khairi, A., Etika, S. B., Ulfah, M., Riga, R., Info, A., Sciences, N., & Padang, U. N. (2021). Eksakta. *ESAKTA*, 21(02), 137–144.
- Aufartová, J., Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Nováková, L., & Solich, P. (2011). Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta*, 704(1–2), 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.030>
- Bloem, L. M., Storbeck, K. H., Schloms, L., & Swart, A. C. (2013). 11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione Returns to the Steroid Arena: Biosynthesis, Metabolism and Function. *Molecules*, 18(11), 13228–13244. <https://doi.org/10.3390/molecules181113228>
- Boudaher, E., & Shaffer, C. L. (2019). Inhibiting bacterial secretion systems in the fight against antibiotic resistance. *MedChemComm*, 10(5), 682–692. <https://doi.org/10.1039/c9md00076c>
- Elfitra, Muharni, Salni, & Oksari, A. (2011). Senyawa Antimalaria dari Jamur Endofitik Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees ). *Jurnal Natur Inonesia*, 13(65), 123–129.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2016). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 6(20), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Gajalaksmi, S., V, I., R, A., M, B., S, M., & A, S. (2012). Secondary metabolite production by Endophytic Fungi isolated from *Andrographis paniculata*. *Internasional Journal Of BioSciences and Technology*, 5(3), 12–17.
- Hasnirwan, Arifin, bustanil and, & Putra, F. N. (2015). Isolasi dan karakteristik