

APPLICATION OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (Tlc) AND GASS CHROMATOGRAPHY-MASS SPEKTROSCOPY (GC-MS) AS ANALYSIS TECHNIQUE OF PHITOSTEROL COMPOUNDS IN WATER EXTRACT OF BEAN FRUIT (*Phaseolus vulgaris* L.)

Hilyatul Jannah¹, I Made Sudarma² dan Yayuk Andayani³

¹Mahasiswa, Magister Pendidikan IPA, Program Pascasarjana
Universitas Mataram

²Dosen, Program Studi Magister Pendidikan IPA, Program Pascasarjana
Universitas Mataram

E-mail : hjannah@gmail.com

ABSTRACT: Phytosterols are vegetable sterols, included in secondary metabolite compounds and have broad benefits in the health field. Sources of natural ingredients containing phytosterol compounds have been widely used as medicinal ingredients, one of which is beans (*Phaseolus vulgaris* L.). This research is an exploratory research, aimed to analyze the content of phytosterol compounds in water extract, and the result of partition of water extract of beans using TLC and GC-MS technique. The result of phytochemical test showed that from 13 extracts of partition result with n-hexane solvent, DCM, ethyl acetate, and methanol, only 5 extracts showed positive steroid, including water extract, hexane residue, DCM residue, methanol extract, and methanol residue. The TLC test results on the hexane residue of the partition from the water extract were suspected as stigmasterol compound because it has the price of $R_f = 0.9$ equal to the standard R_f compound of stigmasterol, whereas the GC-MS product showed negative phytosterol.

Keywords: Phytosterol Compounds, γ -Sitosterol, Stigmasterol, *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRAK: Fitosterol merupakan sterol nabati, termasuk dalam senyawa metabolit sekunder dan memiliki manfaat yang luas dalam bidang kesehatan. Sumber bahan alam yang mengandung senyawa fitosterol telah banyak digunakan sebagai bahan obat, salah satunya yaitu buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi, bertujuan untuk menganalisis kandungan senyawa fitosterol dalam ekstrak air, dan hasil partisi dari ekstrak air buah buncis menggunakan teknik KLT dan KG-SM. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa dari 13 ekstrak hasil partisi dengan pelarut n-heksan, DCM, etil asetat, dan metanol, hanya 5 ekstrak yang menunjukkan positif steroid, diantaranya ekstrak air, residu heksan, residu DCM, ekstrak metanol, dan residu metanol. Hasil uji KLT pada residu heksan hasil partisi dari ekstrak air diduga merupakan senyawa stigmasterol karena memiliki harga $R_f = 0,9$ sama dengan harga R_f senyawa standar stigmasterol, sedangkan hasil KG-SM menunjukkan negatif fitosterol.

Kata kunci : Senyawa Fitosterol, γ -Sitosterol, Stigmasterol, *Phaseolus vulgaris* L.

PENDAHULUAN

Fitosterol adalah sterol nabati dengan struktur mirip kolesterol, terdiri dari 28 hingga 30 atom dengan steroid sebagai rangka struktur dengan gugus hidroksil menempel pada C-3 dari cincin A, dan rantai alifatik pada atom C-17 dari cincin D (Pateh, *et al.*, 2009). Senyawa-senyawa yang tergolong ke dalam fitosterol yaitu stigmasterol, sitosterol, fucosterol, ergosterol, dan campesterol (Dewick, 2002)

Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.), sebagai salah satu tanaman yang mengandung fitosterol, berkhasiat meluruhkan kencing (diuretik) dan menurunkan kadar glukosa darah (hipoglikemik), diduga karena peran senyawa

aktif diantaranya β -sitosterol dan stigmasterol (Andayani, 2003).

Tanaman lain yang mengandung senyawa fitosterol dan berpotensi sebagai bahan obat, antara lain antihiperlipidemik (Andayani, 2003), campuran buncis dan bekatul untuk penurunan kadar glukosa yang lebih efektif (Perdana, *et al.*, 2010), kedawung untuk mengobati penyakit kolik, pengobatan penyakit kejang saat haid dan penguat lambung jika dicampur dengan daun sembung (Tisnadjaja, *et al.*, 2006).

Analisis fitokimia pada ekstrak etanol buah buncis telah dilaporkan sebelumnya (Andayani, 2003), dan pada ekstrak air biji buncis oleh Atchibri, *et al* (2010a), namun

kajian serupa pada ekstrak air dengan teknik analisa lainnya belum pernah dilaporkan. Oleh sebab itu, agar lebih luas manfaat buncis sebagai bahan obat maka perlu dikaji, dan dianalisis, (persen (%) area) kandungan β -sitosterol dan stigmasterol dalam pelarut air.

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi ilmiah mengenai jenis dan jumlah (persen (%) area) senyawa fitosterol yang terdapat dalam buah buncis (*Phaseolus vulgaris* L.).

METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah buah buncis, aquades, *n*-heksan *pro-analysis*, diklorometana *pro-analysis*, etil asetat *pro-analysis*, plat KLT silika gel F₂₅₄, anhidrida asam sulfat pekat, dan metanol *pro-analysis*.

Peralatan utama yang digunakan adalah seperangkat alat KLT, lampu UV-Vis, spektrometer KG-SM QP-2010 merk Shimadzu kolom Rtx-5MS, spektrometer KG-SM merk Agilent Technologies kolom DB-5MS.

Prosedur Kerja

Persiapan Ekstrak

Ekstrak diperoleh dengan cara maserasi dengan pelarut air pada suhu kamar.

Partisi dilakukan terhadap ekstrak air menggunakan pelarut organik dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu *n*-heksan, DCM, etil asetat, dan metanol.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk identifikasi awal keberadaan senyawa steroid. Pereaksi yang digunakan yaitu Lieberman-Burchard. Adanya steroid diawali dengan terbentuknya endapan merah yang secara bertahap berubah menjadi biru.

Analisis Fitosterol

Teknik KLT

KLT dilakukan terhadap hasil partisi yang menunjukkan positif steroid menggunakan senyawa standar stigmasterol sebagai pembanding dengan etil asetat 100% sebagai eluen. Spot-spot yang muncul diamati menggunakan lampu UV.

Teknik KG-SM

Ekstrak air dan ekstrak hasil analisis KLT diinjeksikan ke dalam alat KG-SM. Kondisi *running* KG-SM QP-2010 merk Shimadzu yaitu temperatur injeksi 280°C. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan tekanan sebesar 149,9 KPa dan laju alir 2,77 mL/menit. Kondisi *running* KG-SM merk Agilent Technologies yaitu temperatur injeksi 290°C,

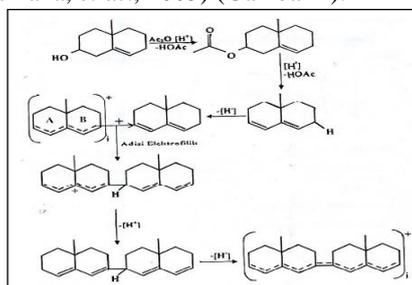
gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan tekanan sebesar 165,47 KPa dan total alir 24,1 mL/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Steroid

Maserat kental air yang diperoleh berwarna coklat tua kehitaman. Uji steroid dilakukan terhadap semua ekstrak, baik ekstrak air buah buncis maupun ekstrak hasil partisi menggunakan pelarut organik. Perubahan warna menjadi biru keunguan menandakan positif steroid, terdapat hanya pada 5 ekstrak yaitu ekstrak air, residu heksan, residu DCM, ekstrak etanol, dan residu metanol (Tabel 1). Hasil positif steroid pada ekstrak air biji buncis telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Atchibri, *et al.*, 2010a).

Hasil positif pada uji LB terjadi akibat reaksi antara sterol tidak jenuh atau triterpen dengan asam (CH_3COOH atau H_2SO_4) (Marliana, *et al.*, 2005) (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi LB Pada Uji Fitokimia
Sumber: Siadi (2012)

Perbedaan tingkatan positif tersebut diduga karena adanya perbedaan jumlah senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak, serta adanya senyawa-senyawa lain yang saling bersinergi sehingga berperan dalam pembentukan warna dengan tingkat positif yang berbeda-beda. Adanya hasil positif steroid pada ekstrak air, dan hasil partisi ekstrak air buah buncis, maka dapat dikatakan bahwa buah buncis mengandung senyawa steroid.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia yang Positif Steroid dengan Pereaksi LB

No	Ekstrak Air Buncis	Steroid
1	Ekstrak air buah buncis (EB)	+++
2	Residu <i>n</i> -heksan (RH)	+++
3	Residu DCM (RDCM)	+++
4	Ekstrak metanol (EM)	+++
5	Residu metanol (RM)	++

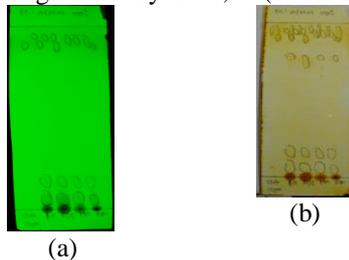
Keterangan:

+ : Warna hijau/biru terlihat tidak terlalu jelas (samar-samar)
++ : Warna biru keunguan terlihat jelas

+++ : Warna biru keunguan terlihat sangat jelas

Analisis KLT

Hasil pengamatan di bawah sinar UV dengan $\lambda = 254$ nm maupun iodine terlihat bahwa residu heksan memiliki spot sejajar terhadap spot senyawa standar stigmasterol (Gambar 2) dengan harga R_f yang sama dengan senyawa standar stigmasterol yaitu 0,90 (Tabel 2).



Gambar 2. Spot-spot Hasil KLT dengan Eluen Etil Asetat 100%

- Tampak di bawah sinar UV pada $\lambda = 256$ nm
- Setelah dimasukkan dalam iodine

Berdasarkan literatur harga R_f senyawa standar stigmasterol yang dilarutkan dalam heksan:aseton (80:20) yaitu 0,91 dan senyawa standar β -sitosterol yaitu 0,85 (Chaturvedi, *et al.*, 2013). Jika mengacu pada harga R_f tersebut, maka dimungkinkan terdapat senyawa β -sitosterol dalam residu DCM maupun residu metanol, namun belum terpisah dari senyawa-senyawa yang lain.

Tabel 2. Harga R_f Spot Setiap Ekstrak

Ekstrak	Harga R_f
Senyawa Standar Stigmasterol	$R_f = 0,90$
Residu Heksan (RH)	$R_f = 0,90$
Residu DCM (RDCM)	$R_f = 0,8875 \approx 0,89$
Ekstrak Metanol (EM)	$R_f = 0,925 \approx 0,92$
Residu Metanol (RM)	$R_f = 0,8875 \approx 0,89$

Adanya harga R_f yang sama dan nilainya besar pada senyawa standar stigmasterol meskipun dilarutkan dalam pelarut yang berbeda, menandakan bahwa senyawa tersebut bersifat semi polar hingga non polar. Berdasarkan hasil tersebut, diduga residu heksan mengandung senyawa stigmasterol, didukung oleh hasil uji fitokimia yang memberikan hasil positif steroid pada residu heksan (Tabel 1).

Analisis KG-SM

Hasil KG-SM pada ekstrak air maupun hasil partisi (residu n-heksan, residu DCM, ekstrak metanol, dan residu metanol) menunjukkan bahwa tidak ditemukannya senyawa fitosterol. Senyawa-senyawa mayor

yang terdeteksi pada ekstrak-ekstrak tersebut terangkum dalam Tabel 3.

Senyawa-senyawa mayor tersebut mayoritas merupakan senyawa-senyawa metabolit primer seperti asam lemak, karbohidrat. Hal ini disebabkan karena metabolit primer merupakan produk esensial yang terdapat pada semua makhluk hidup yang digunakan untuk kelangsungan hidup dan berkembang biak (Ridhia, dkk., 2013), sehingga keberadaannya mutlak ada pada makhluk hidup.

Tabel 3. Ringkasan Senyawa-Senyawa Mayor Pada Ekstrak Air Buah Buncis dan Hasil Partisi Ekstrak Air Buah Buncis

No	Ekstrak	Nama Senyawa Mayor	% Area
1.	Air Buah Buncis	Sikloot	17,02
		Fenol, 4-(2-aminoetil)-	15,19
		Benzaetanamina	13,30
		Piperidinon	10,53
		1H-indol-3-etanamina	10,36
2.	Residu n-heksan	Kuinolin, 4-metil-	5,23
		Asam oktadek-9-enoat	33,98
		Heptadek-8-asam karbonat-(1)	11,02
3.	Residu DCM	Asam heksadekanoat	9,07
		Beta-D-liksofuranosid, metil	33,98
		2,4(1H,3H)-pirimidinedion	11,02
		Fenol, 4-(2-aminoetil)-	9,15
		Alfa-D-ribopiranosid, metil	9,07
4.	Ekstrak metanol	Heptadek-8-asam karbonat-(1)	28,05
		Etil linoleat	23,65
		Asam 9-oktadekanoat (z)-, 2-hidroksi-1-(hidroksimetil)etil ester	12,70
5.	Residu metanol	Asam oktadek-9-enoat	31,78
		Heksakontan	12,93

Selain metabolit primer, terdapat pula metabolit sekunder pada ekstrak air buah buncis, yaitu fenol, 4-(2-aminoetil)-, 1H-indol-3-etanamina, dan kuinolin, 4-metil- yang merupakan golongan alkaloid. Adanya senyawa tersebut pada ekstrak air buah buncis disebabkan oleh sifat dasar dari senyawa yang dapat larut dalam air. Sudarma (2010) menyatakan bahwa alkaloid dalam bentuk garamnya mudah larut dalam air. Hal ini dipengaruhi oleh adanya atom O dan N pada senyawa alkaloid yang mampu berikatan hidrogen dengan air.

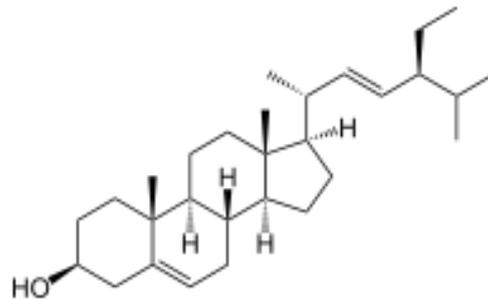
Berdasarkan uraian di atas, senyawa fitosterol dalam ekstrak air buah buncis ditemukan hanya pada hasil uji fitokimia dan KLT, namun tidak ditemukan pada analisis KG-SM. Ketiadaan senyawa fitosterol dalam hasil

analisis KG-SM ekstrak air buah buncis kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya sifat senyawa fitosterol, dan faktor teknis.

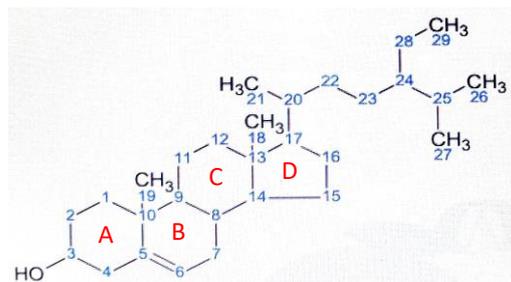
Faktor-faktor yang diduga menjadi penyebab tidak terdeteksinya senyawa fitosterol pada ekstrak air diantaranya sifat senyawa, dan faktor teknis. Senyawa fitosterol memiliki titik leleh yang tinggi, yaitu 136-140°C untuk β -sitosterol, 147-148 °C untuk γ -sitosterol, dan 160-164°C untuk stigmasterol. Agar dapat memisahkan senyawa-senyawa fitosterol dalam cuplikan, maka cuplikan harus diubah terlebih dahulu ke dalam bentuk gas, dengan demikian diperlukan suhu yang sangat tinggi. Menurut Winkler-Moser (2011), metode kromatografi fitosterol yang khas akan mencakup *split injection* (dengan rasio pemecahan bervariasi dari 1:15 sampai 1:100), suhu injektor dari 250-300°C, suhu kolom awal, 250-300°C, dan baik pada kondisi isokratik ataupun temperatur yang telah diprogram untuk oven pemanas. Seharusnya, kondisi kolom (Rtx-5) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu oven program 300°C isothermal, injektor 300°C 1:50 split (Winkler-Moser, 2011), namun peralatan yang tersedia di laboratorium memiliki keterbatasan suhu maksimal yakni 300°C dan dalam penggunaannya selalu di bawah suhu maksimal, sehingga kurang leluasa dalam mencari kondisi *running* yang tepat. Selain itu, ketersediaan gas helium yang terbatas diduga menyebabkan laju alir gas tidak maksimal sehingga mempengaruhi jumlah komponen senyawa yang terbawa. Perawatan alat, baik kalibrasi maupun kebersihan kolom juga diduga mempengaruhi hasil analisis.

Selain itu dapat pula dilihat dari bentuk struktur komponen unsur penyusun senyawa fitosterol dengan pelarut air. Senyawa fitosterol (stigmasterol dan β -sitosterol) (Gambar 4 dan 5), tersusun dari atom C, O, dan H dimana gugus OH terikat pada atom C3 cincin A (Gambar 5) sedangkan atom C saling terikat membentuk rantai siklik maupun nonsiklik. Jika dibandingkan dengan molekul air (Gambar 6), ia hanya tersusun dari atom O dan H sehingga air hanya mampu berikatan hidrogen dengan gugus OH dan tidak mampu mengikat rantai non polar senyawa fitosterol. Hal ini disebabkan karena air tidak memiliki atom C yang bertindak sebagai gugus non polar. Aisyah (2007) menjelaskan bahwa adanya ikatan hidrogen pada penggunaan pelarut air mengakibatkan kelarutan molekul non polar rendah. Pernyataan ini didukung oleh sifat senyawa fitosterol (stigmasterol) yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik

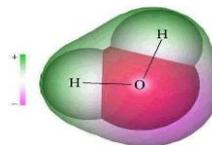
dan sebagian besar pelarut yang memiliki satu gugus fungsi alkohol (Kanimozhi.D *et al*, 2012).



Gambar 4. Stigmasterol



Gambar 5. β -sitosterol



Gambar 6. Molekul air

Oleh sebab itu, meskipun air dikenal sebagai pelarut universal serta memiliki konstanta dielektrik yang besar, namun diduga yang menjadi penyebab tidak ditemukannya senyawa fitosterol dalam ekstrak air buah buncis yaitu disebabkan oleh energi ikatan hidrogen pelarut (air) yang digunakan untuk memutus ikatan hidrogen pada pelarut lebih besar daripada energi interaksi antara zat terlarut (senyawa fitosterol) dengan pelarut (air).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa : (i) Senyawa fitosterol yang terkandung dalam residu heksan hasil partisi ekstrak air buah buncis diduga merupakan stigmasterol. (ii) Jumlah persen (%) area senyawa fitosterol yang terkandung di dalam ekstrak air buah buncis tidak dapat terdeteksi.

DAFTAR RUJUKAN

- Aisyah, S. 2007. *Kimia Umum Larutan dan Sifat-sifatnya*. (online): <http://www.scribd.com/doc/36100644/8-Larutan>. Diakses tanggal 11 Maret 2012.
- Andayani, Yayuk. 2003. *Mekanisme Aktivitas Antihiperglikemik Ekstrak Buncis (Phaseolus vulgaris Linn) pada Tikus Diabetes dan Identifikasi Komponen Aktif*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Atchibri, A. L. Ocho-Anin, K. D. Brou, T. H. Kouakou, Y. J. Kouadio dan D. Gnakri. 2010a. Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (17): 1757-1761.
- Chaturvedi, Pratibha; Pushpa Khanna; dan Abhay Chowdhary. 2013. Phytosteroids from tissue culture of *Allium cepa* L. and *Trachyspermum ammi* S prague. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(6): 42-48.
- Dalimartha, Setiawan. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 5*. Jakarta: Pustaka Bunda.
- Devi, K.J. Uma; V. Vanitha; K. Vijayalakshmi; and Florida Tilton. 2011. Determination of Bioactive Components of *Aegle marmelos* L. Leaves by GC-MS Analysis. *Indian Streams Research Journal* 1 (11): 1-5.
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=299-26-3.1H-indole-3-ethanamine>. (Diakses pada 13 Juni 2013 pukul 11.00 WITA).
- Kanimozhi.D, and V.Ratha Bai. 2012. Evaluation of Phytochemical Antioxidant Antimicrobial Activity Determination of Bioactive Components of Ethanolic Extract of Aerial And Underground Parts of *Cynodon dactylon* L. *International Journal of Scientific Research and Reviews* 1 (2): 33-48.
- Marliana, Soerya Dewi; Venty Suryanti; dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi* 3 (1): 26-31.
- Pateh, U. U., Haruna A. K., Garba, M., Iliya, I., Sule, I. M., Abubakar, M. S. and Ambi A.A.. 2009. Isolation of stigmasterol, β -sitosterol, and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from rhizomes of *Stylochiton lancifolius*. *Nig. Journ. Pharm. Sci.* 8 (1): 19-25.
- Perdana, Yonathan Agung Wisnu; Sampurna; dan Chodidjah. 2010. Uji Efektifitas Air Rebusan Buncis (*Phaseolus vulgaris* Linn) dan Bekatul terhadap Kadar Glukosa. *Sains Medika* 2 (1): 32-35.
- Ridhia, Sanusi Ibrahim, dan Mai Efdi. 2013. Isolasi Dan Karakterisasi Triterpenoid Dari Fraksi N-Heksan Pada Kulit Batang Srikaya (*Annona Squamosa* L.). *Jurnal Kimia Unand* 2 (1): 83-86.
- Siadi, Kusoros. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA* 35 (1): 77-83.
- Sudarma, I Made. 2010. *Uji Fitokimia, Ekstraksi, Isolasi, dan Transformasi Senyawa Bahan Alam*. Mataram: Fakultas MIPA Universitas Mataram.
- Tisnadjaja, Djadjat; Suci Lestari Hidayat; Sukma Sumirja; dan Partomuan Simanjuntak. 2006. Pengkajian Kandungan Fitosterol pada Tanaman Kedawung (*Parkia roxburgii* G. Don.). *Biodiversitas* 7 (1): 21-24.
- Tripathi, Nisha; Sunita Kumar; Rakesh Singh; C.J. Singh; Prashant Singh; and V.K. Varshney. 2013. Phytoconstituents from The Roots of *Girardinia heterophylla* (Decne). *International Journal of Biomedical and Advance Research* 04 (08): 545-550.
- Winkler-Moser, Jill. 2011. *Gas Chromatographic Analysis of Plant Sterols*. (online) : <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/phyto-sterols/index.htm>, Diakses tanggal 22 Agustus 2013.