

ANALISIS KUALITATIF DAN KUANTITATIF
STEROID JENIS KOLESTEROL DARI
BULU BABI (Diadema setosum Leske)



Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

(Prof. Dr. Ir. T. Harlim)

Pembimbing Pertama,

(Drs. Willem Moka, MSc)

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah Subhanallahu Wataalah atas rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan kepada kami, sehingga tesis ini kami dapat selesaikan. Penyusunan tesis tersebut kami maksudkan untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar sarjana kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Dalam mempersiapkan penyusunan tesis ini, tentunya kami banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu perkenankanlah kami melalui tesis ini menyampaikan terima kasih kami yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof.Dr.Ir. T.Harlim; selaku Pembimbing Utama kami, sekaligus sebagai ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNHAS, yang telah begitu banyak memberikan petunjuk-petunjuk, nasehat serta bimbingan sehingga tesis ini kami dapat selesaikan.
2. Drs. Willem Moka, MSc; selaku pembimbing pertama kami, yang telah banyak membantu kami, serta telah meluangkan waktu untuk mendampingi kami sejak pengambilan contoh sampai pelaksanaan penelitian kami, sehingga hasil penelitian ini dapat kami susun sebagai sebuah tesis.
3. Drs. B. Jawahir; selaku penasehat akademik, Drs. A. Wahid Wahab, MS; selaku sekretaris jurusan dan selu-

ruh staf dosen jurusan kimia atas bimbingannya.

4. Kepada seluruh pihak yang telah memberikan bantuan dan jerih payahnya kepada kami selama penyusunan tesis ini.

Akhirnya kepada Ayahanda dan Ibunda, kak Fitrië, kak Taufik, adik Nita, Fida, Rudy dan si bungsu Irma, serta adik Lina yang selalu mendoakan dan memberikan dorongan kepada kami dalam menempuh jenjang pendidikan hingga penyelesaian tesis ini, terimalah persembahan ini sebagai rasa hormat dan terima kasih. Ucapan terima kasih pula kepada teman-teman Asrama Putera I BAKEPPMIST.

Akhir kata semoga tesis ini ada manfaatnya bagi percobaan selanjutnya dalam rangka pengembangan ilmu untuk kemaslahatan manusia, Amien.

Ujung Pandang, April 1988

P e n u l i s

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi senyawa steroid dari gonad bulu babi Diadema setosum Leske asal pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan yang ternyata mengandung steroid.

Metode ekstraksi secara dingin dilakukan dengan menggunakan sistim pelarut campuran kloroform - metanol - air (1 : 2 : 0,8). Salah satu keuntungan metode ekstraksi secara dingin ialah waktu yang digunakan relatif cepat dan penggunaan pelarut relatif sedikit.

Pemeriksaan secara kromatografi lapis tipis menggunakan sistim pelarut kloroform dan n-butanol - metanol - air (4 : 1 : 1), dan penampak noda asam sulfat 50 % dalam air, Liebermann-Burchard, Rosenheim dan Carr-Price menunjukkan adanya steroid.

Penetapan kadar steroid dari gonad bulu babi Diadema setosum Leske asal pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan secara spektrofotometri diperoleh hasil 0,019 %

Berdasarkan waktu yang dibutuhkan sampai tercapainya intensitas warna biru gelap yang maksimum pada pemeriksaan secara kromatografi lapis tipis dengan sistim pelarut kloroform dan penampak noda asam sulfat 50 % dalam air, menunjukkan adanya steroid golongan kolestan jenis kolesterol.

ABSTRACT

The research to identification of steroid compounds has been carried out from gonad "bulu babi" (Diadema setosum Leske) found at Barang Lompo island South Sulawesi.

Cold extraction method has been used with solvent mixture chloroform-methanol-water (1 : 2 : 0,8). One of the advantages of cold extraction is having a shorter time periode and used solvent having at least.

Thin Layer Chromatography has been done using the solvent system of chloroform, and n-butanol-methanol-water (4 : 1 : 1), and sulfuric acid 50 % in water as the spraying agent. The Liebermann-Burchard, Rosenheim, Carr-Price reaction showed the presence of steroids.

The assay of steroids, from gonad "bulu babi" (Diadema setosum Leske) using spectrophotometry was 0,019 %.

According to the time need to achieve the maximum intensity of dark blue color during the Thin Layer Chromatography with chloroform and sulfuric acid 50 % in water, showed the presence of cholestan group of cholesterol.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	iv .
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II MAKSUD DAN TUJUAN	4
BAB III POLA PENELITIAN	5
BAB IV TINJAUAN PUSTAKA	6
IV.1 Uraian bulu babi	6
IV.1.1 Uraian umum bulu babi	6
IV.1.2 Sistematika bulu babi	7
IV.1.3 Morfologi bulu babi	7
IV.2 Uraian Steroid	9
IV.2.1 Uraian umum steroid	9
IV.2.2 Ekstraksi steroid	11
IV.2.3 Penetapan kadar steroid	12
BAB V PENELITIAN DAN HASIL PENELITIAN ..	15
V.1 Alat-alat yang digunakan	15
V.2 Bahan-bahan yang digunakan	16
V.3 Penyediaan contoh	16
V.3.1 Pengambilan contoh	16
V.3.2 Pengolahan contoh	16
V.3.3 Penetapan kadar air	17
V.4 Ekstraksi kandungan steroid	17
V.5 Analisis kualitatif steroid	18
V.6 Uji warna dengan KLT	19
V.7 Penetapan kadar steroid	20
BAB VI PEMBICARAAN	22
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	24
VII.1 Kesimpulan	24
VII.2 Saran	24

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
1. Perhitungan kadar air gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	27
2. Hasil uji warna analisis kualitatif steroid hasil ekstraksi gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	28
3. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis hasil ekstraksi bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	29
4. Hasil uji waktu terbentuknya warna KLT dengan pereaksi asam sulfat 50 % hasil ekstraksi gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	30
5. Hasil Pengukuran panjang gelombang maksimum larutan kolesterol baku dalam kloroform	31
6. Hasil pengukuran resapan kolesterol baku secara spektrofotometri pada panjang gelombang 630 nm	32
7. Hasil pengukuran resapan contoh steroid secara spektrofotometri pada panjang gelombang 630 nm	33
8. Hasil perhitungan kadar steroid hasil ekstraksi gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	34

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
1. Kurva panjang gelombang maksimum larutan kolesterol dalam kloroform	35
2. Kurva baku kolesterol dalam kloroform pada panjang gelombang 630 nm	36
3. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis ekstraksi gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske dengan sistim pelarut kloroform	37 & 38
4. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis ekstraksi gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske dengan sistim pelarut n-butanol-metanol-air	39 & 40
5. Hasil pemeriksaan steroid secara Kromatografi Lapis Tipis dengan pereaksi asam sulfat 50 % hasil ekstraksi gonad bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	41
6. Morfologi bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	44
7. Bagian aboral bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	45
8. Bagian oral bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	46
9. Potongan melintang cangkang bulu babi <u>Diadema setosum</u> Leske	47
10. Struktur umum bulu babi	48

DAFTAR LAMPIRAN

PERPUSTAKAAN

LAMPIRAN

Halaman

- A. Perhitungan persamaan regresi 40
- B. Hasil reaksi warna asam sulfat 50 %
dalam air dengan 34 sterol (Heftman E
J. Chromatogr., 21, 490, 1966) 46

BAB I
PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan perairan yang sangat luas, banyak mengandung sumber hayati yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber penghidupan rakyat maupun untuk memenuhi kebutuhan pangan.

Pertambahan penduduk yang terus meningkat menyebabkan perhatian terhadap laut untuk dimanfaatkan potensinya semakin besar. Sumber daya hayati perairan merupakan salah satu sumber alam yang penting untuk bahan makanan, sumber devisa negara dan sumber perluasan tenaga kerja. Salah satu potensi yang dapat dikembangkan selain dari ikan, udang, kerang, alga laut, adalah bulu babi (Diadema setosum Leske).

Bulu babi (Diadema setosum Leske) hampir tersebar luas diseluruh perairan tropis termasuk perairan Indonesia, khususnya perairan Sulawesi Selatan (10). Selain mengandung protein, bulu babi juga mengandung senyawa turunan steroid (11).

Penyediaan bahan baku obat kontraseptik khususnya golongan steroid akhir-akhir ini terus meningkat pemakaiannya seiring dengan meningkatnya peserta keluarga berencana. Namun demikian kebutuhan akan bahan baku tersebut baru dapat terpenuhi jika sumber steroid alam dapat dimanfaatkan semaksimal mungkin (4).

Ikan (1969), melaporkan bahwa dalam binatang laut golongan invertebrata selalu terdapat senyawa sterol yang merupakan zat yang penting untuk hidupnya. Menurut Ikan, terdapat hubungan antara tingkat perkembangan binatang laut dengan bentuk sterol yang dikandungnya (7).

R.E. Marker (1939) berhasil memecahkan cincin cabang steroid golongan spirostan, dan menghasilkan suatu senyawa yang penting yaitu progesteron (4).

Kebanyakan sterol pada binatang laut golongan invertebrata terjadi modifikasi pada rantai samping kolesterol, yaitu 8 atom C diganti menjadi 9 atom C dengan gugus metil pada C_{24} atau diganti menjadi 10 atom C dengan gugus etil. Beberapa turunan senyawa steroid yang terdapat pada binatang golongan invertebrata adalah spongesterol, klianosterol, 24-metilko-lesterol dan fukosterol (7).

Selain mafaat yang dapat diperoleh dari senyawa steroid tersebut (khususnya kolesterol), kelebihan kadar kolesterol dalam darah sering pula dihubungkan dengan penyakit Arteriosklerosis. Penyakit tersebut timbul sebagai akibat adanya pengendapan kolesterol dan lipid pada dinding pembuluh darah bagian dalam.

Adanya perbedaan habitat, lingkungan hidup, dan jenis bulu babi, maka perlu diadakan penelitian

tentang kandungan steroid dari bulu babi jenis Diadema setosum Leske yang tersebar disekitar perairan Sulawesi Selatan khususnya perairan sekitar Ujung Pandang.

BAB II

MAKSUD DAN TUJUAN

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengidentifikasi jenis dan kadar steroid yang ada pada bulu babi Diadema setosum Leske yang diambil di lokasi Barang Lombo Sulawesi Selatan.

Tujuan penelitian untuk menginventarisasi komposisi kimia sehingga melengkapi data kualitatif dan kuantitatif kekayaan hayati laut Indonesia.

BAB III
POLA PENELITIAN

III.1 Penyediaan contoh

1.1 Pengambilan contoh

1.2 Pengolahan contoh

1.3 Penetapan kadar air

III.2 Ekstraksi steroid secara dingin

III.3 Analisa kualitatif

3.1 Uji warna dengan pereaksi Liebermann-Burchard.

3.2 Uji warna dengan pereaksi Carr-Price

3.3 Uji warna dengan pereaksi Rosenheim

3.4 Uji warna dengan pereaksi asam sulfat pekat

3.5 Uji warna dengan pereaksi asam sulfat 50 % dalam air dengan menggunakan kromatografi lapis tipis

III.4 Penetapan kadar steroid secara spektrofotometri

III.5 Pengambilan kesimpulan

BAB IV

TINJAUAN PUSTAKA

IV.1 Uraian Bulu babi

IV.1.1 Uraian umum Bulu babi (10,12,13,14)

Bulu babi (Sea urchin) termasuk filum Echinodermata, kelas Echinoidea hidup pada dasar laut yang berbatu atau berpasir, berpindah tempat dengan mengunakan duri yang panjang dan kaki tabung.

Bulu babi termasuk pemakan segala atau omnivora terutama alga dan bahan busukan organik, bahkan dalam keadaan terpaksa (kekurangan makanan) maka ia menyerang bulu babi jenis lainnya.

Gonad bulu babi berjumlah lima yang tersusun teratur di dalam cangkangnya pada bagian aboral dan masing-masing gonad mempunyai saluran genital. Repro-duksi bulu babi terjadi melalui pembentukan larva pluteus.

Bulu babi banyak ditemukan diperairan tropis, terutama jenis Diadema setosum Leske pada perairan pantai kepulauan Indonesia yang kadang-kadang menyebabkan bagian dasar laut terlihat hitam.

IV.1.2 Sistematika Bulu babi (10,12,13,14)

Filum	: Echinodermata
Anak filum	: Eleutherozoa
Kelas	: Echinoidea
Anak kelas	: Euechinoidea
Bangsa	: Diadematoida
Anak bangsa	: Diademataceae
Suku	: Diadematoidea
Marga	: <u>Diadema</u>
Jenis	: <u>Diadema setosum</u> Leske

IV.1.3 Morfologi Bulu babi (10,12,13,14)

Bulu babi mempunyai bentuk tubuh setengah bulatan atau bulat telur menyerupai jantung dan seluruh permukaan tubuhnya dipenuhi oleh duri-duri yang sama panjang dan besarnya kecuali pada bagian oral dan aboral.

Setiap duri mempunyai pangkal berbentuk mangkok yang tepat duduk di atas lempengan bulat yang disebut "shell" yang menutupi seluruh permukaan cangkangnya dan duri-duri ini dapat digerakkan oleh serabut otot. Diantara duri-durinya terdapat 3 jepitan yang disebut pedicellariae berfungsi untuk membersihkan tubuh dan dapat mengeluarkan racun sebagai perlindungan dari serangan musuh terutama ikan, bintang laut dan hewan laut carnivora.

Pada bagian oral terdapat lima pasang deretan berbentuk radial yang mempunyai lubang untuk sepasang kaki tabung yang dapat diulurkan keluar diantara duri-durinya.

Daerah yang terdapat duri-duri dan kaki tabung disebut "ambulakral", sedang daerah yang hanya terdapat duri-duri disebut "interambulakral". Pada bagian tengah oral atau bagian tengah permukaan bawah terdapat mulut yang terdiri dari lima gigi tajam yang disebut "lentera Aristoteles" dan dikelilingi oleh membran yang fleksibel disebut "peristome".

Pada bagian tengah aboral atau bagian tengah permukaan atas terdapat anus yang dikelilingi oleh membran yang fleksibel disebut "periproct".

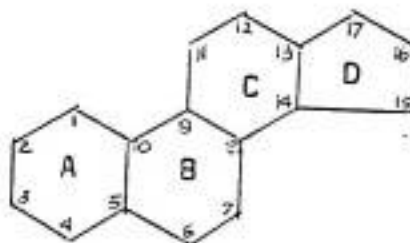
Saluran pencernaan melingkar mulai dari mulut pada bagian oral ke saluran esophagus, perut, saluran intestinal hingga anus yang terletak dibagian aboral.

Reproduksi bulu babi terjadi di luar tubuh yaitu telur dan sperma dilepaskan oleh gonad yang mempunyai saluran genital ke air laut kemudian telur dibuahi dan berkembang menjadi larva pleteus. Setelah larva mengalami metamorfosis akan berubah menjadi bentuk muda. Selain mengandung protein gonad bulu babi marga Diadema juga mengandung steroid.

IV.2 Uraian Steroid

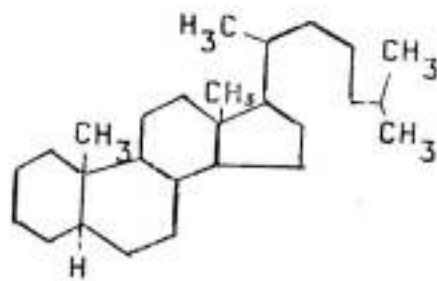
IV.2.1 Uraian umum steroid (1,3,6,7,11)

Steroid alam umumnya mempunyai kerangka inti siklopentanoperhidrofenantren dan rantai cabangnya mempunyai kerangka yang berbeda-beda. Steroid tersebar luas di alam, bisa terdapat dalam bentuk bebas bentuk ester maupun terikat dengan glikosida. Sebagian besar steroid alam mempunyai gugus metil pada atom karbon nomor 10 dan 13.

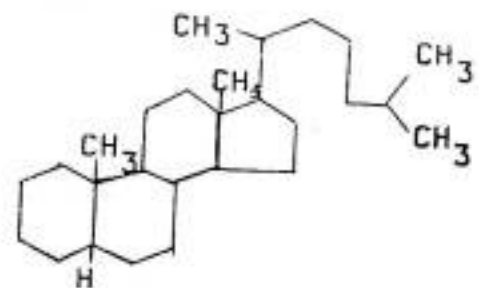


Siklopentanoperhidrofenantren

Pada golongan steroid kolestan, fusi cincin pada kerangka inti semuanya berkonfigurasi trans sedangkan steroid golongan koprostan, fusi cincin A/B berkonfigurasi cis, lainnya berkonfigurasi trans. Struktur cabang steroid golongan kolestan dan koprostan adalah alkil bercabang.

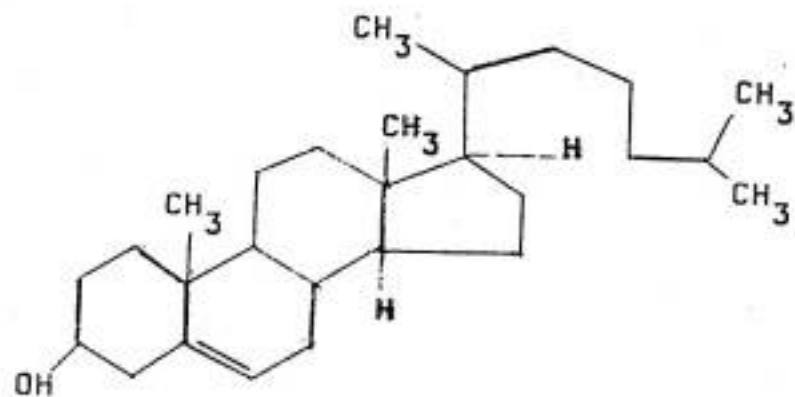


Kolesterol



Koprostan

Steroid yang mempunyai satu atau lebih gugus OH dalam kerangka intinya disebut sterol. Salah satu sterol yang banyak terdapat di alam yaitu kolesterol, termasuk golongan kolestan dengan jumlah atom karbon 27 serta mempunyai 1 gugus OH pada atom karbon nomor 3 dengan konfigurasi beta.



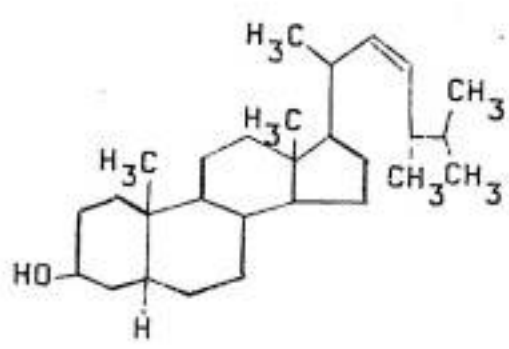
Kolesterol = 3β -hidroksi- Δ^5 -Kolesterol

Kolesterol terdapat di dalam plasma darah yaitu dalam bentuk bebas sekitar 20 - 40 % atau 55mg/100ml dan dalam bentuk ester kolesterol sekitar 60 - 80 % atau 145mg/100ml sehingga total kolesterol dalam darah ya-

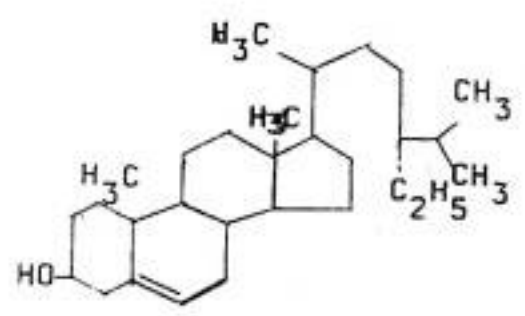


itu 200mg/100ml. Kolesterol mempunyai peranan yang sangat penting yaitu sebagai prekursor dalam pembentukan vitamin D.

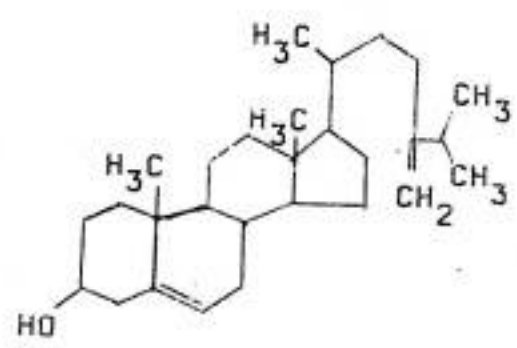
Beberapa bentuk senyawa steroid pada binatang laut golongan invertebrata :



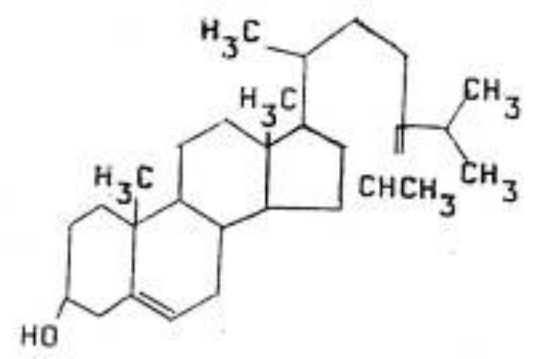
Spongesterol



Klianosterol



24-Metilenkolesterol



Fukosterol

IV.2.2 Ekstraksi Steroid (2,5,8,9)

Sejumlah prosedur ekstraksi telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Steroid dapat diisolasi dengan cara menghidrolisa lebih dahulu jaringan hewan atau tumbuhan sebelum diekstraksi, steroid bebas maupun yang dibebas-

kan akan diekstraksi keluar. Metode ini terbatas penggunaannya, karena kemungkinan terjadi perusakan molekul steroid sangat besar.

Suatu prosedur yang baik, seharusnya dapat mengekstraksi dari contoh hewan tanpa terjadi degradasi maupun hidrolisa pada komponen steroidnya.

Metode ekstraksi senyawa steroid yang umum dilakukan adalah :

1. Ekstraksi panas bertahap menggunakan alat Soxhlet atau Soxhlet yang dimodifikasi. Pada metode ini contoh diekstraksi terus-menerus dengan satu pelarut sampai semua steroid yang dapat larut ter-ekstraksi keluar, kemudian diganti dengan pelarut yang lebih polar. untuk mengekstraksi komponen steroid yang lebih polar.
2. Ekstraksi tak sinambung dengan cara refluks.
3. Ekstraksi dingin contoh segar atau serbuk kering dengan suatu sistem pelarut campuran, biasanya kloroform, metanol dan air. Ekstraksi dingin ini dapat dilakukan dalam suatu alat pelumat.

IV.2.2 Penetapan Kadar Steroid (3,5)

Metode analisa kuantitatif untuk menetapkan kandungan steroid dengan cara kolorimetri, mulai dirintis oleh Schoenheimer dan Sperry pada tahun 1934.

Dimulai dari penentuan kadar kolesterol dalam darah, dimana darah diekstraksi dengan eter, kemudian disaponifikasi. Pada sterol bebas ditambahkan pereaksi warna Liebermann-Burchard (campuran asam sulfat pekat dengan anhidrida asam asetat, perbandingan volume 1 : 10), diukur serapannya pada panjang gelombang 620 - 670 nm dengan alat fotokolorimeter.

Telah dilakukan pula penelitian untuk penetapan kadar kolesterol bebas secara kolorimetri dengan menggunakan pereaksi warna Liebermann-Burchard. Dari penelitian tersebut, diperoleh informasi bahwa pada suhu reaksi 18°C, warna yang mantap diperoleh 30 menit setelah penambahan pereaksi warna Liebermann-Burchard kedalam larutan contoh yang mengandung kolesterol. Sperry dan Brand (1943), melaporkan bahwa pada penetapan kadar kolesterol bebas, beberapa kesalahan yang terjadi sewaktu pengukuran dengan kolorimetri, disebabkan oleh penggunaan asam sulfat yang relatif sedikit. Pada tahun 1908, Salkowsky mengemukakan mekanisme reaksi warna Liebermann-Burchard pada sterol tak jenuh (paling sedikit ada satu ikatan rangkap pada cincin inti sterol). Menurut Salkowsky, proton dari asam menyerang gugus hidroksil pada inti sterol, melepaskan satu molekul air, disusul dengan terlepasnya satu proton dari atom karbon nomor empat, sehing

ga terbentuk sistim diena pada atom karbon nomor tiga dan nomor lima. Selanjutnya, dari diena ini berkembang menjadi senyawa berikatan rangkap multikonyu gasi yang kemudian membentuk senyawa kompleks dengan asam sulfat.

BAB V

PENELITIAN DAN HASIL PENELITIAN

V.1 Alat-alat yang digunakan

1. Alat pelumat (National)
2. Tabung reaksi (Pyrex)
3. Gelas ukur (Pyrex)
4. Gelas piala (Pyrex)
5. Erlenmeyer (pyrex)
6. Labu takar (Pyrex)
7. Corong pisah (Pyrex)
8. Labu alas bulat (Pyrex)
9. Pengaduk magnet
10. Neraca analitis (Sartorius)
11. Spektrofotometer (Spectronic 20)
12. Sentrifuge
13. Kuvet
14. Kondensor tegak/refluks
15. Termometer
16. Seperangkat alat KLT
17. Lemari pengering (Fisher Scientific)
18. Bunsen
19. Penangas air
20. Batang pengaduk
21. Stopwatch

V.2 Bahan-bahan yang digunakan

1. Benzen (E. Merck)
2. Kloroform (E. Merck)
3. Metanol (E. Merck)
4. Etanol (E. Merck)
5. Asam sulfat pekat p.a (E. Merck)
6. Anhidrida asam asetat (E. Merck)
7. Antimon (III) klorida (E. Merck)
8. Asam trikloroasetat (E. Merck)
9. Silika gel G (E. Merck)
10. Kalium hidroksida (Ajax chemical)
11. Air suling
12. n-butanol (E. Merck)
13. Kolesterol p.a (E. Merck)

V.3 Penyediaan contoh

V.3.1 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh dilakukan secara acak di pantai pulau Barang Lompo. Lokasi pengambilan di pantai sebelah utara pulau Barang Lompo pada kedalaman 0,75 sampai 1,5 meter dan contoh yang diperoleh dicampur jadi satu dan homogen.

V.3.2 Pengolahan contoh

Bulu babi yang telah dikumpulkan gonadnya dipisahkan dari bagian lain kemudian dibersihkan dan dikeringkan dengan cara mengangin-anginkan.

V.3.3 Penetapan kadar air

Timbang 1 - 3 gram gonad bulu babi dalam krus yang telah diketahui beratnya, kemudian masukkan dalam lemari pengering selama 4 jam pada suhu 100° - 105° C. Dinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Paskan lagi dalam oven selama 30 menit, dinginkan dalam eksikator dan timabng, ulangi hingga berat konstan. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 1.

V.4 Ekstraksi kandungan steroid secara dingin

Jaringan hewan segar 100 gram digiling halus, ditentukan kadar airnya, kemudian ditambahkan pelarut campuran kloroform 100 ml, metanol 200 ml dan air 80 ml. Campuran dilumat selama beberapa menit, kemudian tambahkan kloroform 100ml lalu tambahkan air 100 ml, dilumatkan lagi selama 2 menit. Contoh dikeluarkan, kemudian dipusingkan sehingga diperoleh 3 lapisan yaitu lapisan air, lapisan kloroform dan lapisan padatan. Lapisan kloroform diambil lalu dikisatkan. Eksistensi steroid ini diuji dengan uji warna dengan reaksi Liebermann-Burchard, Carr Price, Rosenheim dan asam sulfat pekat. Hasilnya positif, ekstrak disaponifikasi dengan KOH 10 % dalam 100 ml metanol pada suhu 70° C selama 2 jam di atas pe-

nangas air. Dinginkan, tambahkan 25 ml air, ekstraksi 3 kali dengan benzen sebanyak 10 ml. Lapisan benzen dikisatkan, ekstrak yang diperoleh diuji kembali dengan pereaksi Liebermann-Burchard, Carr-Price, Rosenheim dan asam sulfat pekat. Ekstrak ini diuji sekali lagi dengan kromatografi - lapis tipis untuk lebih meyakinkan adanya steroid. Jika hasilnya positif, lanjutkan dengan penentuan kadar steroid totalnya secara spektrofotometri.

V.5 Analisis kualitatif steroid

V.5.1 Pereaksi Liebermann-Burchard

Ekstrak dilarutkan dengan pelarut kloroform kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard (1 ml asam sulfat pekat dan 10 ml anhidrida asam asetat). Reaksi ini menghasilkan perubahan warna mulai warna merah muda kemudian biru dan terakhir hijau. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.

V.5.2 Pereaksi Carr-Price

Ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes pereaksi Carr-Price (larutan jenuh antimontriklorida dalam kloroform) akan memberi warna merah muda.

V.5.3 Pereaksi Rosenheim

Ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes pereaksi Rosenheim (sembilan puluh persen asan trikloroasetat dalam etanol). Reaksi ini memberikan warna merah muda atau biru.

V.5.4 Pereaksi asam sulfat pekat

Ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuk warna merah darah pada lapisan kloroform dan warna hijau pada lapisan asam sulfat pekat.

Hasil dapat dilihat pada tabel 2.

V.5 Uji warna dengan menggunakan KLT

Lempeng kromatografi lapis tipis dibuat dengan cara meratakan bubuk silika gel G.60 setebal 0,25 mm di atas lempeng kaca 20 x 20 cm, dikeringkan di udara kemudian diaktifkan dalam lemari pemanas pada suhu 105° C selama 30 menit. Ekstrak yang akan diuji dilarutkan dalam kloroform kemudian ditotolkan dengan larutan baku kolesterol pada lempeng yang telah diaktifkan. Kemudian lempeng dikembangkan dengan sistem pelarut kloroform atau sistem pelarut n-butanol : metanol : air (4 : 1 : 1).

Biarkan pelarut mengembang sampai mencapai 15 cm dari batas penotolan, lempeng diangkat dan dibiarkan kering pada suhu kamar lalu disemprotkan dengan penampak noda asam sulfat 50 % dalam air. Lempeng dipanaskan pada suhu 85^o C, diamati waktu timbulnya warna, warna awal, warna akhir dan warna pada UV 375 nm. Hitung harga Rf dan bandingkan dengan warna dan harga Rf kolesterol baku yang dikerjakan pada lempeng yang sama, kemudian dibandingkan hasilnya dengan rujukan yang dibuat oleh E. Hefmann dan kawan-kawan. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3 dan 4.

V.7 Penetapan kadar steroid secara spektrofotometri

V.7.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Timbang teliti 50 mg kolesterol murni, larutkan dalam kloroform sampai volume menjadi 50 ml. Pipet sebanyak 0,5 ml kemudian diencerkan dengan kloroform sampai 50 ml, sehingga konsentrasi menjadi 0,01 mg/ml. Demikian juga dibuat larutan dengan konsentrasi 0,05 mg/ml yaitu dengan memipet 2,5 ml larutan baku dan diencerkan dengan kloroform sampai volumenya 50 ml. Pipet 5 ml masing-masing konsentrasi tambahkan 2 ml pereaksi Liebermann-Burchard, simpan ditempat gelap selama 15 menit. Lalu diukur resapannya pada panjang gelombang 570 nm sampai 710 nm.

Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5 dan gambar 1.

V.7.2 Pembuatan kurva baku

Dari larutan baku 1 mg/ml kemudian dibuat 6 konsentrasi masing-masing 0,01mg/ml, 0,02mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml. Pipet masing-masing konsentrasi 5 ml tambahkan 2 ml pereaksi Liebermann-Burchard simpan ditempat gelap selama 15 menit. Resapannya diukur pada panjang gelombang 630 nm dengan menggunakan blanko. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 6 dan gambar 2.

V.7.3 Penentuan kadar steroid

Contoh hasil ekstraksi benzen terakhir dikisatkan. Kemudian dilarutkan dengan kloroform sampai 50 ml. Pipet 5 ml tambahkan 2 ml pereaksi Liebermann-Burchard, simpan ditempat gelap selama 15 menit, lalu ukur resapannya pada panjang gelombang 630 nm dengan menggunakan blanko. Perlakuan sebanyak 3 kali. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 7.

BAB VI
PEMBICARAAN

Oari data hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap jenis bulu babi Diadema setosum leske, diperoleh keterangan bahwa :

1. Pengambilan contoh berlokasi di Barang Lompo dapat dilakukan setiap saat, sebab cuaca tidak mempengaruhi populasi bulu babi yang terdapat di sekitar pantai Barang Lompo.
2. Pada uji kualitatif steroid dengan pereaksi Liebermann-Burchard, terlihat adanya perbedaan perubahan warna antara ekstrak yang belum disaponifikasi dengan ekstrak yang sudah disaponifikasi. Pnambahan pereaksi Liebermann-Burchard pada ekstrak yang belum disaponifikasi terjadi perubahan warna dari hijau kemudian biru hijau. Sedangkan - pada ekstrak yang sudah disaponifikasi terjadi perubahan warna dari merah muda kemudian hijau dan terakhir biru hijau. Hal ini disebabkan adanya lemak bebas yang terdapat pada ekstrak yang belum disaponifikasi yang mengganggu perubahan warna.
3. Pada uji kualitatif steroid dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan sistim pelarut kloroform, penampak noda asam sulfat 50 % dalam air ternyata waktu terjadinya intensitas warna biru gelap yang maksimum adalah 0,58 menit.

4. Pada analisa kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer, maka larutan yang akan diukur sebelum disimpan di tempat gelap harus dikocok sampai tercampur sempurna dan waktu penyimpanan kurang - lebih 15 menit, karena kesalahan perlakuan akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda.

BAB VII

KE Simpulan dan Saran

3 Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil suatu kesimpulan dan saran sebagai berikut :

VII.1 Kesimpulan

- 1.1 Berdasarkan hasil analisis kualitatif bulu babi jenis Diadema setosum Leske asal pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan ternyata mengandung senyawa steroid jenis kolesterol.
- 1.2 Kadar steroid yang terdapat dalam gonad bulu babi jenis Diadema setosum Leske asal pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan adalah 0,019 %

VII.2 Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan supaya dilakukan penelitian terhadap tingkat kematangan gonad bulu babi kaitannya dengan kadar dan jenis steroid yang dikandungnya.



DAFTAR PUSTAKA

1. Cantrawow, A., et. al. (1962). "Biochemistry", Third edition, Saunders Company, Philadelphia and London, 347-348.
2. Djerassi, et. al. (1976). "Sterols from Marine Sources", Steroids, 28, no.5, 717-722.
3. Fieser, L.F. Fieser, M., (1959). "Steroids" Maruzen Asian edition, Reinhold Publishing Corporation, New York, 305-323.
4. Harlim, T., (1982). "Kandungan Steroid Alga laut Sekitar Pantai Indonesia", Disertasi Institut Teknologi Bandung.
5. Hefmann, E., (1969). "Response of Steroid to Sulfuric Acid in TLC, J.Chromatogr, 21, 490-491.
6. Heftmann, E. Mosettip, E., (1960). "Biochemistry of Steroids" Modern Asian edition, Reinhold Publishing Corporation, New York.
7. Ikan, R., (1969). "Natural Product", A Guide to Laboratory, Israel University, Jerusalem, 103-111.
8. Monroe, E.W., et. al. (1952). "Detection and Estimation of Steroidal Sapogenins in Plant Tissue", Anal. Chem. 198, 533-543.
9. Popov, S. (1976). "Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates" Steroids, 28, 727-729.
10. Storer, T.I., Usinger, R.L. (1957) "General Zoology" IIIrd edition, Mc Graw Hill Book, USA, 664.



11. Scheuer, P.J. (1973). "Chemistry of Marine Natural Product" Academi Press, New York and London, 61-68.
12. Storer, T.I, Usinger, R.L. (1961). "Element's of Zoology" IInd edition, Mc Graw Hill Book, USA, 274.
13. Ville. Walker. Smith., (1963). "General Zoology", IInd edition, W.B. Sanders Company, Philadelphia and London, 347-348.
14. Weisz, P.B., (1973). "The Science of Zoology" IInd edition, Mc Graw Hill Co, USA, 591, 603-605.

TABEL 1

PERHITUNGAN KADAR AIR GONAD BULU BABI JENIS
Diadema setosum Leske ASAL PULAU BARANG LOMPO
 SULAWESI SELATAN

NO.	BK (gram)	BKS (gram)	BKSK (gram)	KADAR AIR (%)	RATA-RATA (%)
1.	28,3416	30,3590	29,8619	75,36	76,36
2.	29,4015	31,3841	30,9189	76,54	
3.	28,7124	30,7036	30,2492	77,18	

Keterangan :

BK : Berat Krus

BKS : Berat Krus + Contoh

BKSK : Berat Krus + Contoh Konstan

TABEL 2

HASIL UJI WARNA ANALISIS KUALITATIF STEROID
 HASIL EKSTRAKSI GONAD BULU BABI Diadema se-
tosum Leske ASAL PULAU BARANG LOMPO.: SULA-
 WESI SELATAN

NO	PEREAKSI	WARNA	HASIL	
			I	II
1.	Liebermann-Burchard	Merah-Biru-Hijau	+	+
2.	Carr-Price	Merah muda	+	+
3.	Rosenheim	Merah muda	+	+
4.	Asam sulfat pekat	Ungu	+	+

Keterangan :

I : Ekstrak Kloroform

II : Ekstrak benzen yang dilarutkan
 dalam Kloroform

+ : Mengandung Steroid

TABEL 3

HASIL UJI KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS HASIL EKSTRAKSI GONAD BULU BABI Diadema setosum Leske
ASAL PULAU BARANG LOMPO SULAWESI SELATAN

Pereaksi	Sistim Pelarut			
	Kloroform		n-butanol:metanol:air 4 : 1 : 1	
	Hrga Rf	Harga Rf	Harga Rf	Harga Rf
	Contoh	Baku	Contoh	Baku
H ₂ SO ₄ 50 %	0,72	0,69	0,55	0,57
L-B	0,71	0,67	0,56	0,57
C-P	0,69	0,66	0,56	0,55
R	0,71	0,67	0,57	0,58

Keterangan :

L - B : Libermann-Burchard

C - P : Carr-Price

R : Rosenheim

TABEL 4
 HASIL UJI WAKTU TERBENTUKNYA WARNA KROMATO-
 GRAFI LAPIS TIPIS DENGAN PEREAKSI ASAM SUL-
 FAT 50 % HASIL EKSTRAKSI GONAD BULU BABI
Diadema setosum Loske ASAL PULAU BARANG
 LOMPO SULAWESI SELATAN

	W a r n a		Waktu (detik)
	Contoh	Baku	
Awal	Merah	Merah	9
Akhir	Ungu	Ungu	25
UV 375 nm	Biru gelap	Biru gelap	24

TABEL 5
 HASIL PENGUKURAN PANJANG GELOMBANG MAKSIMUM
 LARUTAN KOLESTEROL BAKU DALAM KLOROFORM

Panjang Gelombang (nm)	R e s a p a n	
	C ₁	C ₂
570	0,234	0,962
580	0,237	0,964
590	0,267	0,983
600	0,298	0,995
610	0,335	1,063
620	0,367	1,425
630	0,405	1,843
640	0,401	1,712
650	0,397	1,684
660	0,371	1,621
670	0,342	1,543
680	0,338	1,476
690	0,327	1,328
700	0,326	1,316
710	0,326	1,315

Keterangan : C₁ = Konsentrasi 0,01 mg/ml
 C₂ = Konsentrasi 0,05 mg/ml

TABEL 6

HASIL PENGUKURAN RESAPAN KOLESTEROL BAKU
SECARA SPEKTROFOTOMETRI PADA PANJANG
GELOMBANG 630 nm

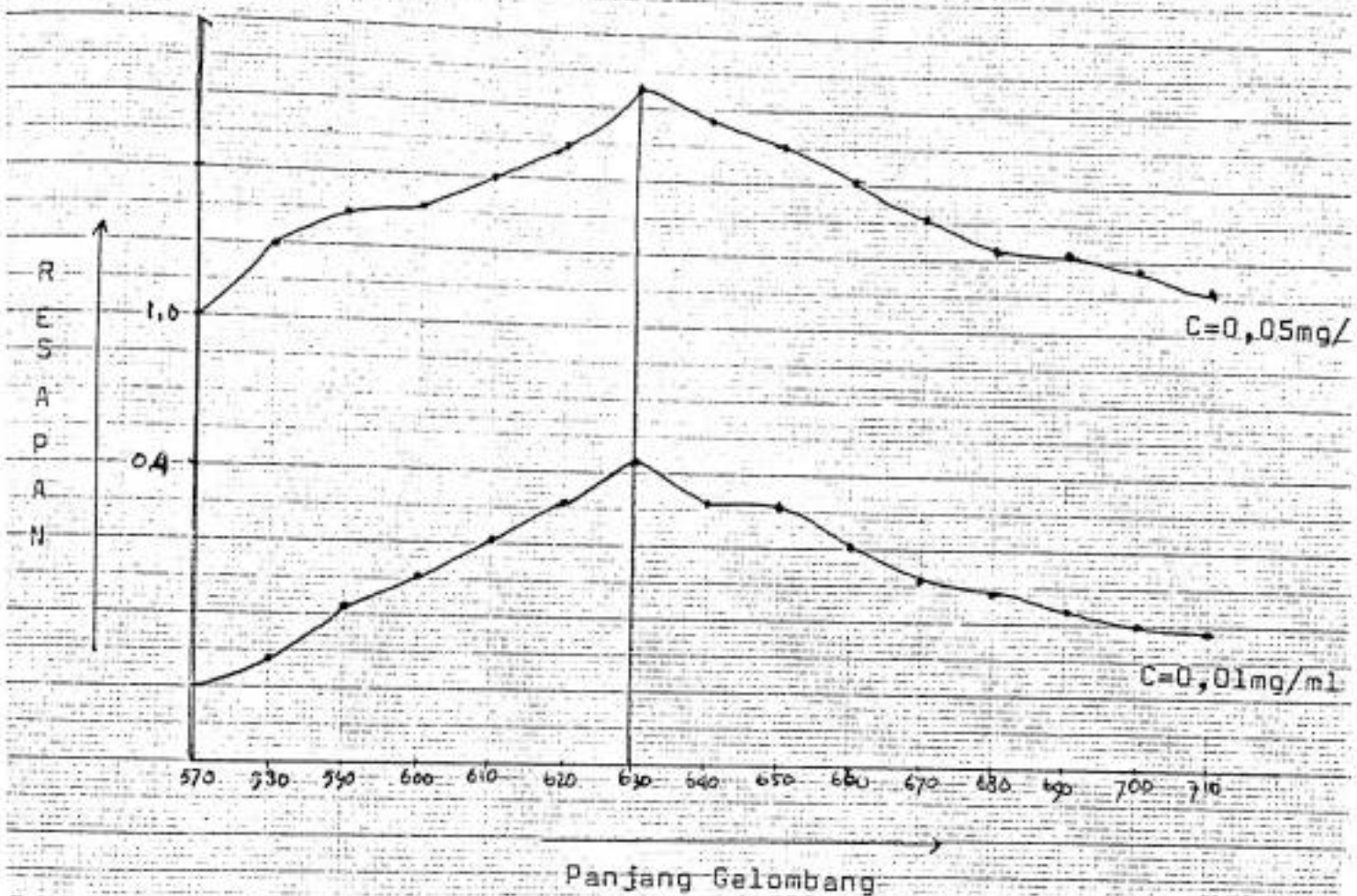
Konsentrasi. (mg/ml)	Resapan
0,01	0,402
0,02	0,662
0,03	0,701
0,04	1,283
0,05	1,341
0,06	1,568

TABEL 7
 HASIL PENGUKURAN RESAPAN CONTOH STERDIO
 SECARA SPEKTROFOTOMETRI PADA PANJANG
 GELOMBANG 630 nm

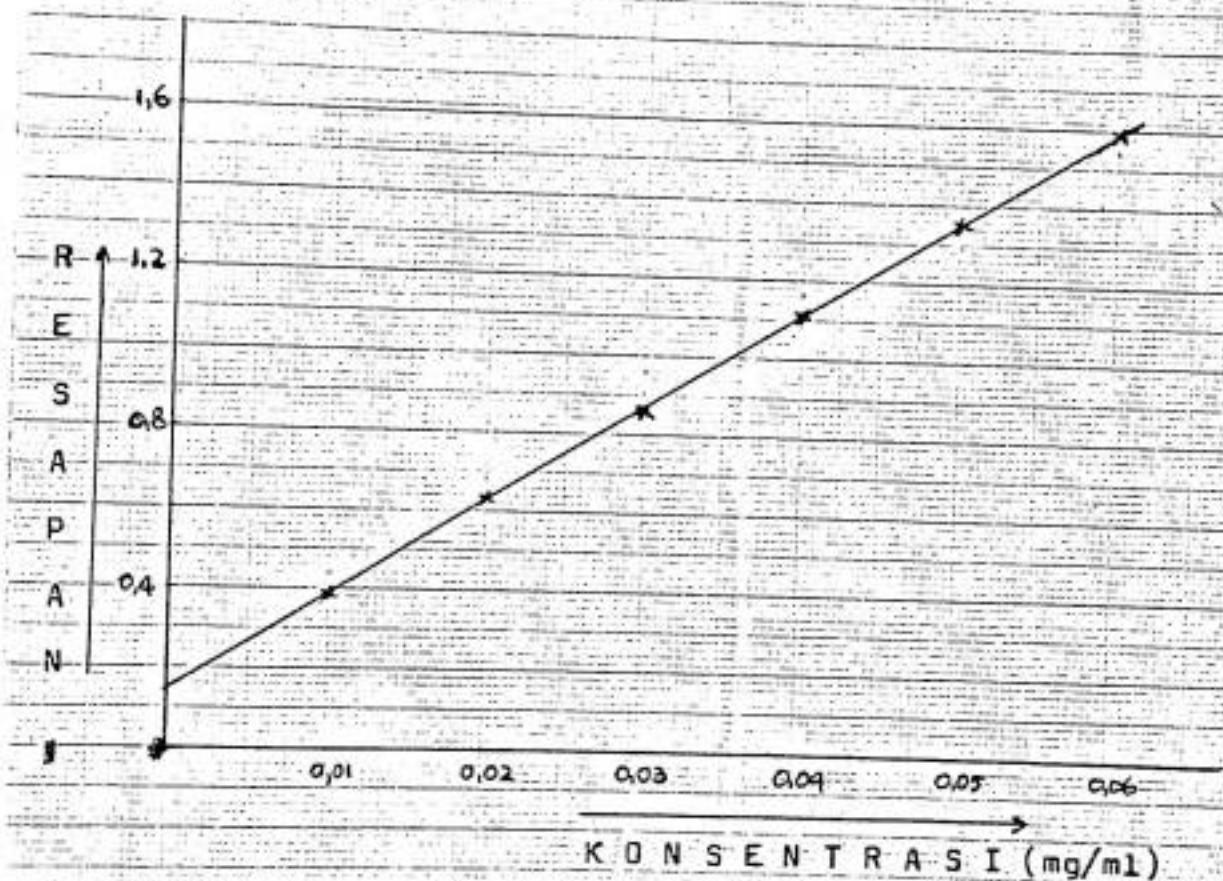
C o n t o h	R e s a p a n	Rata-rata
<u>Diadema setosum</u> Leske	1. 1,05 2. 1,09 3. 1,06	1,07

TABEL 8
 HASIL PERHITUNGAN KADAR STEROID HASIL EKS-
 TRAKSI GONAD BULU BABI Diadema setosum Leske
 ASAL PULAU BARANG LOMPO SULAWESI SELATAN

Resapan	Konsentrasi (mg/ml)	Kadar dalam mg/100 gr contoh	Rata-rata
1,057	0,036	0,018	0,019
1,091	0,039	0,019	
1,064	0,037	0,018	

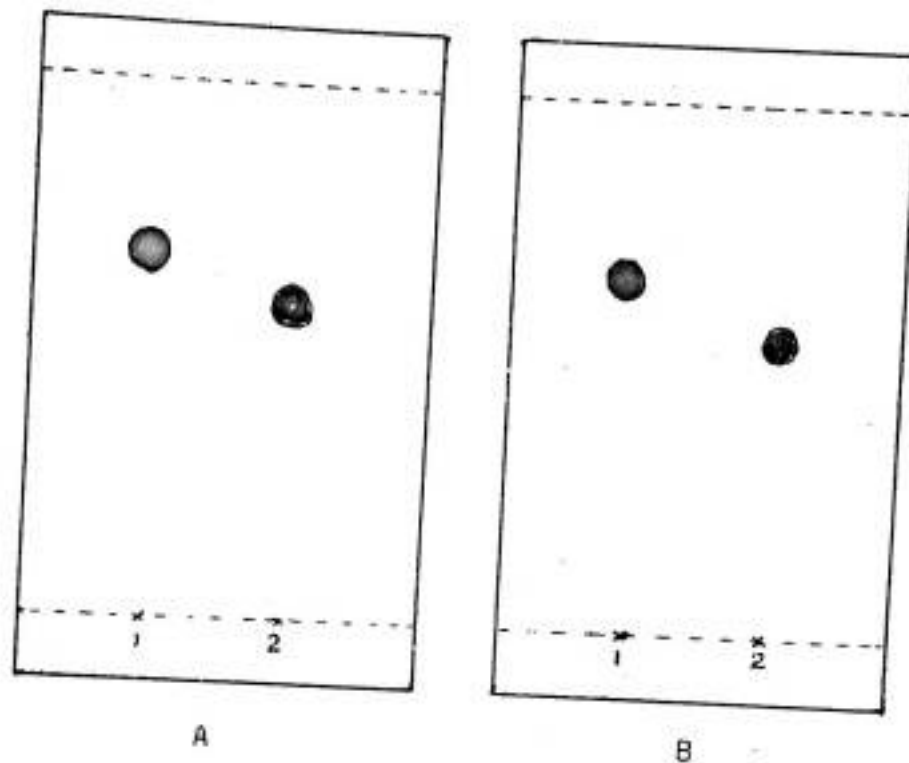


Gambar 1. Kurva Panjang Gelombang Maksimum Larutan Kolesterol dalam Kloroform



Gambar 2. Kurva Baku Kolesterol dalam Klo-
roform Pada Panjang Gelombang
630 nm.

GAMBAR 3
HASIL UJI KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS HASIL EKSTRAKSI
SI GONAD BULU BABI Diadema setosum Leske DENGAN
SISTIM PELARUT KLOROFORM



keterangan :

A. penampak noda H_2SO_4 50%

1. contoh

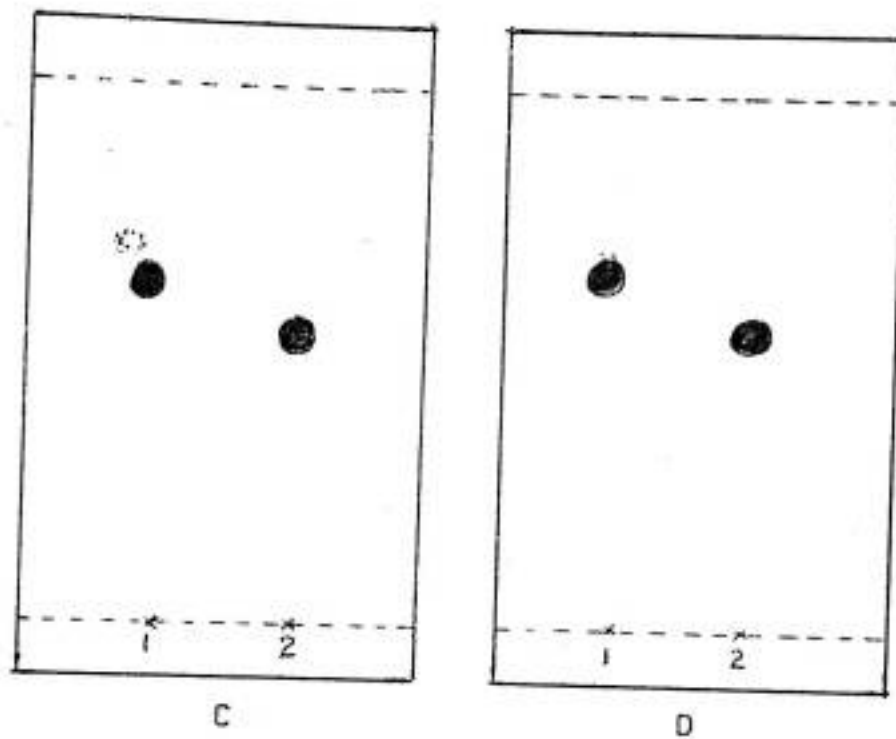
2. baku

B. penampak noda Liebermann-Burchard

1. contoh

2. baku

GAMBAR 4
HASIL UJI KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS HASIL EKSTRAKSI GONAD BULU BABI Diadema setosum Leske DENGAN SISTIM PELARUT KLOOROFORM



keterangan :

C. penampak noda Carr-Price

1. contoh

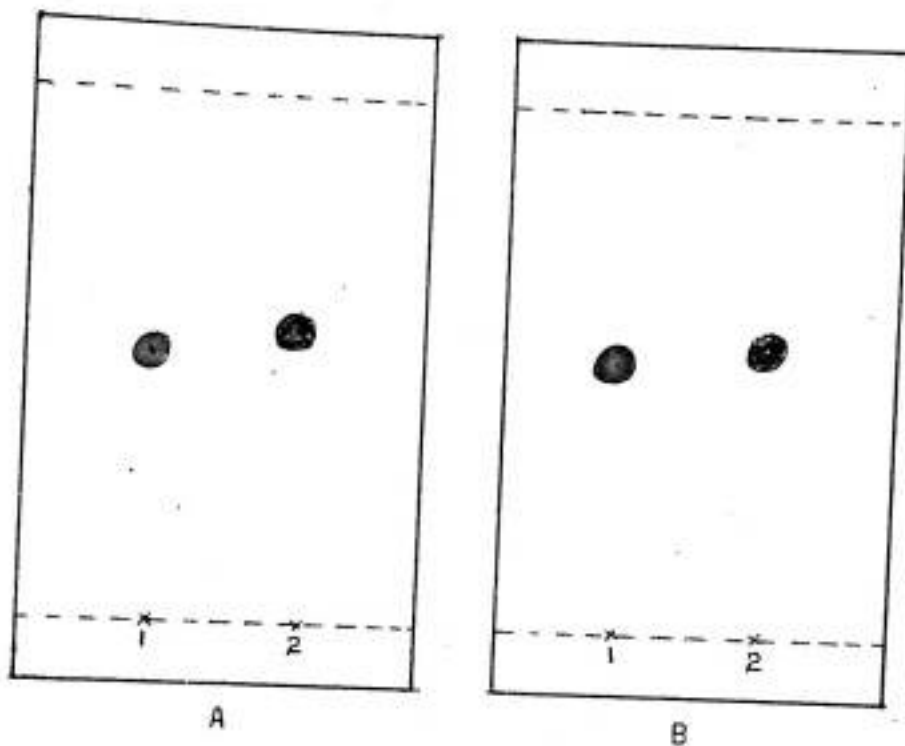
2. baku

D. penampak noda Rosenheim

1. contoh

2. baku

GAMBAR 5
HASIL UJI KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS HASIL EKSTRAK-
SI GONAD BULU BABI Diadema setosum Leske DENGAN
SISTIM PELARUT n-BUTANOL-METANOL-AIR



keterangan :

A. penampak noda H_2SO_4 50%

1. contoh

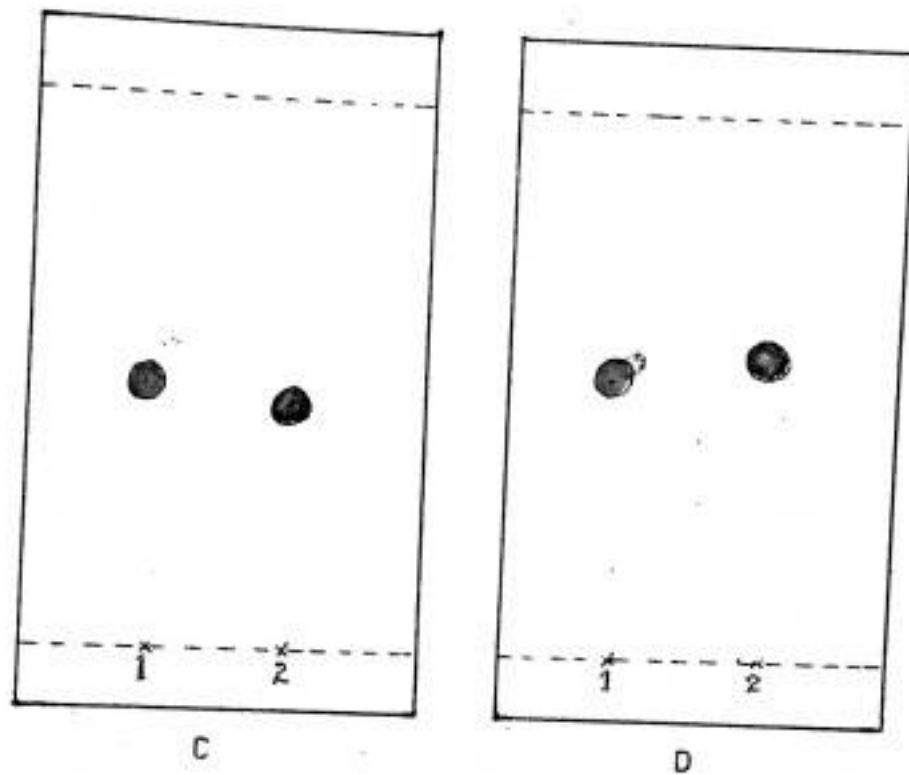
2. baku

B. penampak noda Liebermann-Burchard

1. contoh

2. baku

GAMBAR 6
HASIL UJI KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS HASIL EKSTRAKSI GONAD BULU BABI Diadema setosum Leske DENGAN SISTIM PELARUT n-BUTANOL-METANOL-AIR



keterangan :

C. penampak noda Carr-Price

1. contoh

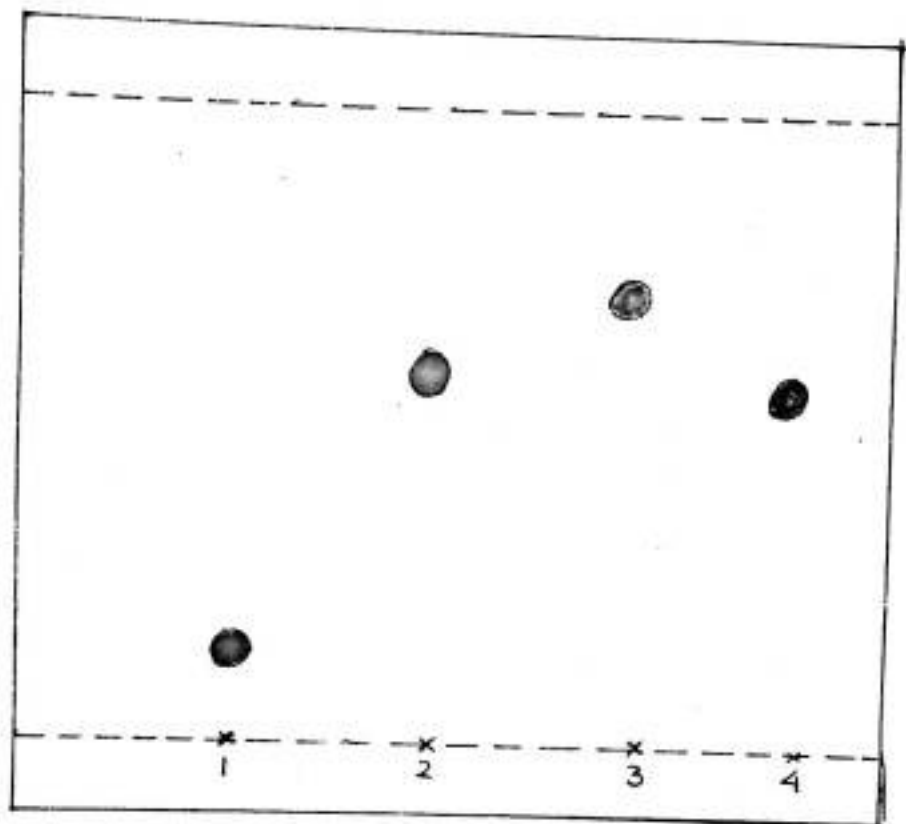
2. baku

D. penampak noda Rosenheim

1. contoh

2. baku

GAMBAR 5
HASIL PEMERIKSAAN STEROID SECARA KROMATOGRAFI
LAPIS TIPIS DENGAN PEREAKSI ASAM SULFAT 50 %
HASIL EKSTRAKSI GONAD BULU BABI Diadema seto-
sum Leske.



- keterangan :
1. Contoh ekstrak (hitam)
 2. Contoh ekstrak (biru gelap)
 3. Contoh ekstrak (coklat)
 4. Baku

LAMPIRAN A
PERHITUNGAN PERSAMAAN REGRESI

Persamaan Regresi $Y = a + bX$

Jika $Y = A = \text{Resapan}$

$X = C = \text{Konsentrasi}$

Maka persamaan regresi menjadi : $A = a + bC$

Untuk menghitung harga a dan b digunakan rumus :

$$b = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$a = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

dan untuk harga r (koefisien korelasi)

$$r = \frac{\sum (XY) - \sum (X) \times \frac{\sum Y}{n}}{\sqrt{\sum (X)^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \times \sum (Y^2) - \frac{(\sum Y)^2}{n}}}$$

X	Y	x^2	y^2	XY
0,01	0,402	1×10^{-4}	0,162	$4,02 \times 10^{-3}$
0,02	0,662	4×10^{-4}	0,438	$13,23 \times 10^{-3}$
0,03	0,701	9×10^{-4}	0,491	$21,03 \times 10^{-3}$
0,04	1,283	$1,6 \times 10^{-3}$	1,646	$51,32 \times 10^{-3}$
0,05	1,341	$2,5 \times 10^{-3}$	1,798	$67,05 \times 10^{-3}$
0,06	1,568	$3,6 \times 10^{-3}$	2,458	$94,08 \times 10^{-3}$
$\sum X = 0,21$	$\sum Y = 5,957$	$\sum x^2 = 9,1 \times 10^{-3}$	$\sum y^2 = 6,993$	$\sum XY = 0,2505$

Berdasarkan rumus dan data di atas maka diperoleh :

$$b = 24,01$$

$$a = 0,1524$$

Sehingga persamaan regresi adalah :

$$A = 0,1524 + 24,01 C$$

Jika $C = 0$ maka $A = 0,1524$ atau $X = 0$ maka $Y = 0,1524$

$$C = 0,01 \quad A_1 = 0,3925$$

$$C = 0,02 \quad A_2 = 0,6326$$

$$C = 0,03 \quad A_3 = 0,8727$$

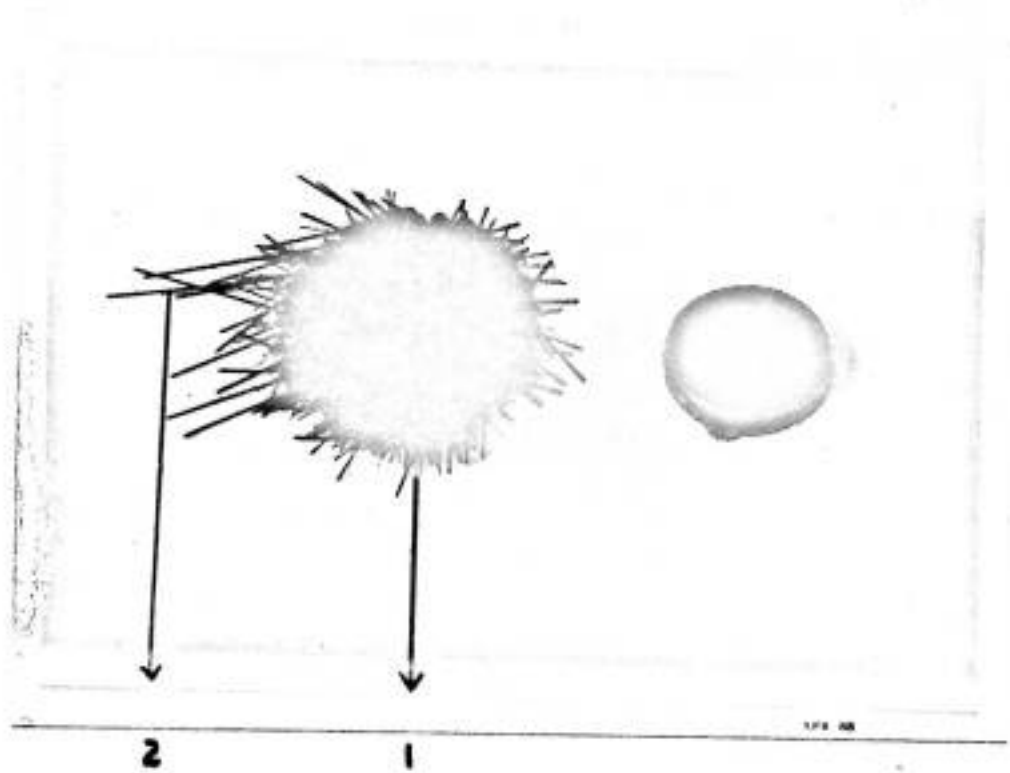
$$C = 0,04 \quad A_4 = 1,1128$$

$$C = 0,05 \quad A_5 = 1,3529$$

$$C = 0,06 \quad A_6 = 1,593$$

GAMBAR 6

MORFOLOGI BULU BABI Diadema setosum Leske



keterangan : 1. = Kaki tabung

2 = Duri panjang

GAMBAR 8

BAGIAN ORAL BULU BABI Diadema setosum Leske

3 2 1

keterangan : 1 = Gigi
2 = Kaki tabung
3 = Duri panjang

GAMBAR 9
POTONGAN MELINTANG CANGKANG BULU BABI
(*Diadema setosum* Leske)

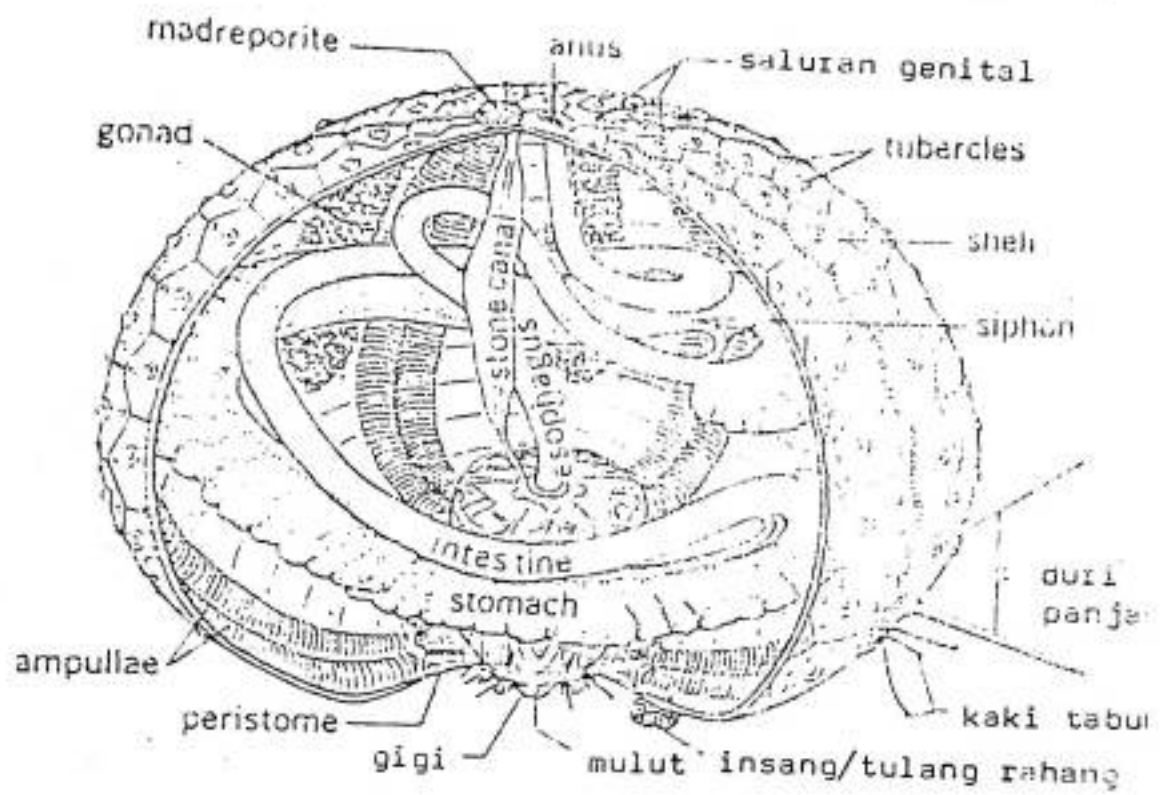
2

1

keterangan : 1 = Lentera Aristoteles
2 = Gonad bulu babi

GAMBAR 10

STRUKTUR UMUM BULU BABI (Diadema setosum Leske)



LAMPIRAN B

Hasil reaksi warna asam sulfat 50% dalam air dengan
34 sterol (Heftman E., J. Chromatogr., 21, 490, 1966)

Sterol	Warna pada sinar matahari			warna pada UV
	zenit	warna awal	w. akhir	(335 mμ)
Δ ⁵ -Kolestadiena	0.25	pk	pk-tua	hijau
5α-Kolestan-3-one	3.00	kn-p	ck-md	biru
5β-Kolestan-3-one	2.25	ck-md	ck-md	b-md
Δ ⁴ -Kolestan-3-one	2.25	kn-p	ab	biru
Δ ⁵ -Kolesten-3-one	0.75	kn-p	pk	biru
Δ ⁴ -Kolestadiena-3-one	2.00	pk-ab	ck	m-g
Δ ⁵ -Siklokolestan-6-one	1.00	kn-p	kn	b-md
Δ ⁴ -Kolestadiena-3-one	2.00	pk	pk-cr	biru
Δ ⁵ -Siklokolestan-6β-ol	1.25	pk	m-ck	or
5α-Kolestan-3β-ol	2.00	ab	ck	hitam
5α-Kolestan-3α-ol	1.75	pk-ab	pk-ab	b-md
5β-Kolestan-3β-ol	1.75	pk-ab	ck-md	hitam
5α,6α-Epoksikolestan-3β-ol	1.00	kn-tua	merah	b-hijau
5α-Kolesterol	1.00	ab-pk	ungu	b-g
Δ ⁵ -Kolesten-3β-ol	1.00	kn	ab	kn-b
7-Dehidrookolesterol	0.00	ab-h	ab	biru
Desmosterol	0.50	pk	ab	ck-tua
5α-Kolestan-3β-ol-6-one	2.25	kn-p-h	kn-h	biru
Δ ⁵ -Kolesten-3β-ol-7-one	1.00	ab	ab	h-tua
Δ ⁴ -Kolesten-3β-ol-one	0.50	or-p	m-cr	biru
Δ ⁵ -Kolesten-3β-ol-one	1.25	hijau	ck	h-tua
Δ ⁵ -Kolesten-3β,17-diol	0.00	kn	hitam	hijau
Ergosterol	0.75	ab	ck	b-tua
Stigmatero.	1.25	pk-ab	ungu	m-tua
Δ ⁵ -Sitosterol	0.50	pk	ab	ck-tua
Δ ⁵ -Stigmasten-3β-ol	0.50	kn	ck	h-b
Lanosterol	1.75	ab-pk	jk-ck	m-md
Dihidrolanosterol				
Saropollenin	1.25	kn	or	h-b
Scilagenin	0.75	kn	or	h-b
Sarsasapoginin	1.00	pk-p	or	biru
Tigogenin	1.25	pk	or	b-p
Neotigogenin	0.75	pk	ab	ciru
Yamogenin	1.50	or	ab	b-t
Diosgenin	1.00	kn-p	kn	b-t
Hexogenin	0.75	pk	merah	biru
Centrogenin	0.50	pk-tua	ck-tua	ck-t
Kriptogenin				

b=biru, α=cokelat, t=terang, g=gelap, h=hijau, ab=abu-abu,
or=orange, p=pucat, pk=pink, m=merah, kn=kuning, md=madu