



**LAPORAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE-Like BATCH III**



**ISOLASI DAN UJI ANTIKANKER SENYAWA BIOAKTIF
DARI FRAKSI NON-POLAR, SEMI-POLAR, DAN POLAR
PADA LUMUT HATI *Plagiochila sandei* Dozy**

**OLEH
DRS. HERY SUWITO
DRA. PRATIWI PUDJIASTUTI, M.Si.**

007707191

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
DESEMBER 2004**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-Like**

- A Judul Penelitian** : Isolasi dan Uji Antikanker Senyawa Bioaktif
Dari Fraksi Non-polar, Semi-polar, dan Polar
Pada Lumut Hati *Plagiochila sandei* Dozy
- B Ketua Peneliti**
- a. Nama : Drs. Hery Suwito
 - b. Pangkat/Golongan : Penata Tingkat I / III-d
 - c. NIP : 131 653 453
 - d. Jabatan : Lektor
 - e. Jurusan / Fakultas : Kimia / FMIPA
 - f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 - g. Bidang Ilmu yang diteliti : Kimia Organik Bahan Alam
- C Tim Peneliti**
- a. Nama : Dra. Pratiwi Pudjiastuti, M.Si.
 - b. Bidang Keahlian : Kimia Organik Bahan Alam
 - c. Jurusan/Fakultas : Kimia / FMIPA
 - d. Tugas dalam Tim : Ekstraksi dan Uji Bioaktivitas
- D Jangka Waktu** : 7 bulan
- E Biaya yang diajukan** : Rp 30.000.000,- (Tiga Puluh Juta Rupiah)

Surabaya, 8 Desember 2004

Mengetahui:

Dekan Fakultas MIPA



Drs. H.A. Zatief Burhan, MS
NIP. 131 286 709

Ketua Peneliti

Drs. Hery Suwito
NIP. 131 653 453

Menyetujui

Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga



Tjilik Srie Tanjandarie, Ph.D.
NIP. 131 801 627

RINGKASAN

ISOLASI DAN UJI ANTIKANKER SENYAWA BIOAKTIF DARI FRAKSI NON-POLAR, SEMI-POLAR, DAN POLAR PADA LUMUT HATI *Plagiochila sandei* Dozy (Hery Suwito, Pratiwi Pudjiastuti, Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Airlangga, telp. 031-5922427, e-mail: herys08032002@yahoo.com, 2004, 39 halaman).

Lumut adalah tanaman yang membutuhkan daerah basah untuk pertumbuhannya. Indonesia yang memiliki hutan tropis yang sangat luas merupakan tempat yang ideal bagi tumbuhnya lumut. Walaupun demikian, para ahli kimia bahan alam Indonesia masih sedikit yang menaruh perhatian pada tumbuhan golongan ini. Publikasi ilmiah tentang tanaman ini lebih banyak ditulis oleh peneliti dari Eropa dan Jepang.

Tumbuhan lumut mengandung senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid, flavonoid dan senyawa golongan fenolik yang dapat berkhasiat obat (Mues, 1990). Lumut hati dari genus *Plagiochila* terutama tumbuh di daerah tropis. Genus ini dikenal sebagai sumber yang kaya akan bermacam-macam metabolit sekunder, seperti terpenoid, flavonoid, dan senyawa-senyawa aromatis. Akan tetapi, mayoritas spesies *Plagiochila* belum diteliti karena sulitnya mendapatkan sampel dalam jumlah yang memadai untuk dilakukan penelitian (Valcic, et al., 1996). Walaupun demikian, telah banyak pula peneliti yang melaporkan hasil penelitiannya tentang kandungan kimia dari beberapa spesies *Plagiochila*. Lumut hati *Plagiochila sandei* Dozy merupakan tanaman endemik yang tumbuh di lereng Gunung Halimun Jawa Barat.

Dengan menggunakan GC-MS, peneliti telah berhasil mengidentifikasi beberapa senyawa dari ekstrak eter tanaman *Plagiochila sandei* Dozy. Senyawa-senyawa tersebut antara lain viridiflorol, maliaan-5-ol, 5(6)-fusicocadiene dan fusicogiantepoxide. Senyawa-senyawa tersebut memiliki gugus epoksida. Akan tetapi dalam ekstrak ini masih banyak fraksi-fraksi yang belum dapat diisolasi dan diidentifikasi. Berdasarkan penelusuran literatur belum ada laporan yang mengungkap kandungan kimia dalam lumut *Plagiochila sandei* Dozy.

Berdasarkan data pendahuluan yang diperoleh nampak bahwa tanaman lumut ini memiliki potensi yang cukup besar untuk ditemukannya senyawa

memiliki LC_{50} terhadap *Artemia salina* Leach pada konsentrasi 295,2 ppm. Besarnya nilai LC_{50} ini menunjukkan bahwa fraksi yang diuji tidak memiliki sifat sitotoksik terhadap *Artemia salina* Leach.

(Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam Universitas Airlangga; Dibiayai oleh Proyek DUE-Like Batch III, Ditjen Dikti, Depdiknas, tahun anggaran 2004)



KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kami panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya, sehingga penelitian dan penyusunan laporan ini dapat selesai. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, menentukan struktur molekul dari senyawa-senyawa yang terkandung di dalam lumut hati *Plagiochila sandei* Dozy dari fraksi non-polar, semi-polar dan polar serta menguji bioaktivitas antikanker dari isolat yang diperoleh.

Pada kesempatan ini, peneliti mengucapkan terima kasih atas kesempatan, fasilitas dan semua bantuan yang diberikan kepada kami, terutama kepada:

1. Pimpinan proyek DUE-Like Ditjen Dikti Depdiknas yang telah memberikan dana penelitian.
2. Direktur Eksekutif LPIU DUE-Like Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan dalam melaksanakan penelitian.
3. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas Penelitian.
4. Ketua Jurusan Kimia dan Kepala Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unair yang telah memberikan kesempatan dan saran-saran penelitian
5. Dimas Adi Nugroho, Nurul Lailah, dan Ainul Nurul Indah Mahasiswa Jurusan Kimia yang telah terlibat dalam penelitian ini
6. Rekan sejawat, petugas laboran dan Analis di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Unair yang telah membantu dan memberi semangat sehingga penelitian ini dapat selesai.

Kami menyadari bahwa laporan ini belum sempurna. Meskipun demikian kami berharap semoga penelitian ini berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Desember 2004

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	X
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
2.1. Tujuan Penelitian	4
2.2. Manfaat Peneilitian	4
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	
3.1. <i>Plagiochila</i>	5
3.1.1. Ciri-ciri morfologi ordo Jungermaniales	5
3.2. Kandungan Kimia Genus <i>Plagiochila</i>	6
3.2.1. Kandungan seskuiterpena genus <i>Plagiochila</i>	6
3.2.2. Kandungan metabolit sekunder lain pada genus <i>Plagiochila</i>	8
3.2.3. Bioaktivitas metabolit sekunder genus <i>Plagiochila</i>	9
3.3. <i>Artemia salina</i> Leach dan penggunaannya dalam uji bioaktivitas	10
3.4. Kanker dan Mekanisme Kerja Antikanker	10
BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1. Lokasi dan waktu penelitian	17
4.2. Bahan dan Alat penelitian	17
4.2.1. Bahan penelitian	17
4.2.2. Alat penelitian	17
4.3. Prosedur Penelitian	18
4.3.1. Pembuatan ekstrak <i>Plagiochila sandei</i> Dozy	18
4.3.2. Isolasi senyawa dari ekstrak n-heksana	18
4.3.3. Isolasi senyawa dari ekstrak kloroform	19
4.3.4. isolasi senyawa dari ekstrak metanol	21
4.3.5. uji bioaktivitas fraksi-fraksi dari ekstrak <i>Plagiochila sandei</i> Dozy	23
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1. Pembuatan Ekstrak <i>Plagiochila sandei</i> Dozy	25
5.2. Analisis Ekstrak n-heksana	26
5.3. Analisis Ekstrak Kloroform	29

5.4. Analisis Ekstrak Metanol	33
5.5. Uji bioaktivitas menggunakan <i>artemia salina</i> Leach	35
BAB VI. KESIMPULAN SAN SARAN	
6.1. Kesimpulan	37
6.2. Saran-saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38



DAFTAR TABEL

Tabel No.	Judul Tabel	Halaman
1	Jenis Plagiochiline dan asal tumbuhannya	6
2	Hasil analisis GC-MS fraksi nomor 1-16 dari fraksi A.I.	26
3	Hasil uji kemurnian fraksi A.II. _{2.1} . menggunakan KLT	27
4	Pita serapan kristal dari fraksi a.II. _{2.1} . dengan FT-IR dan interpretasinya	28
5	Analisis spektrum infra merah senyawa dari fraksi A.V. ₃	29
6	Uji kemurnian senyawa dari fraksi B.I. _{4.4} . dengan KLT	29
7	Analisis spektrum infra merah senyawa dari fraksi B.I. _{4.4}	30
8	Nilai-nilai pergeseran kimia ¹³ C-NMR β-Sitosterol dari Tanjung (1994) dan hasil isolasi.	31
9	Uji kemurnian senyawa fraksi B.I. _{4.7} .	32
10	Hasil analisis GC-MS fraksi B.II. _{1.2} .	32
11	Uji kemurnian senyawa fraksi CBIII _{5.1} . dengan KLT	33
12	Uji kemurnian senyawa fraksi CBIII _{5.2} . dengan KLT	34
13	Hasil uji BST fraksi A.IV. _{2.4} .	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar No	Judul Gambar	Halaman
1	Beberapa kandungan seskuiterpena genus <i>Plagiochila</i>	7
2	Struktur molekul beberapa senyawa bis-(bibenzil siklis) dari <i>P. acanthophylla</i> subs. <i>Japonica</i> .	8
3	Kemungkinan <i>Cross-linking</i> rantai DNA dengan <i>alkylating agents</i>	12
4	Interkalasi Proflavine pada rantai DNA	13
5	Sisi <i>Major groove</i> dan <i>Minor groove</i> pada rantai DNA	14
6	Mekanisme reaksi pemutusan rantai DNA oksidatif oleh suatu antikanker	15
7	Reaksi polimerisasi dan depolimerisasi tubulin oleh suatu antikanker	16

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran No.	Judul Lampiran
1	Foto morfologi tanaman lumut <i>Plagiochila sandei</i> Dozy
2	Spektrum massa komponen fraksi AI ekstrak n-heksana (fraksi no. 1-13)
3	Spektrum massa hasil metilasi komponen fraksi AI ekstrak n-heksana (fraksi no 12-16)
4	Spektrum IR kristal hasil isolasi fraksi A.II.2.1 dari ekstrak n-heksana (Spatulenol)
5	Spektrum ¹ H-NMR kristal hasil isolasi fraksi A.II.2.1. dari ekstrak n-heksana (Spatulenol)
6	Spektrum IR kristal hasil isolasi fraksi A.V.3 dari ekstrak n-heksana
7	Spektrum NMR kristal fraksi A.V.3. dari ekstrak n-heksana
8	Spektrum IR kristal hasil isolasi fraksi B.I.4.4. dari ekstrak kloroform (β -Sitosterol)
9	Spektrum NMR kristal hasil isolasi fraksi B.I.4.4. dari ekstrak kloroform (β -Sitosterol)
10	Spektrum NMR kristal hasil isolasi fraksi CB.III.5.1. dari ekstrak metanol (derivat gliserol)
11	Spektrum NMR kristal hasil isolasi fraksi CB.III.5.2. dari ekstrak metanol (EPMS)

BAB I PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1. Latar Belakang Masalah

Hutan tropis Indonesia yang luasnya terbesar ke dua di dunia setelah Brazilia, mempunyai biodiversitas yang berfungsi sebagai plasma nutfah. Berdasarkan studi yang telah dilakukan oleh Departemen Kehutanan pada tahun 1990, hutan di Indonesia terdiri dari 29,6 juta hektar hutan lindung, 63 juta hektar produktif dan 19,2 juta hektar hutan liar. Pemanfaatan hutan ini sebagian besar baru pada industri kayu, tetapi sangat sedikit sebagai sumber tanaman obat. Di samping itu juga belum banyak diteliti kekayaan kimianya.

Lumut adalah tanaman yang membutuhkan daerah basah untuk pertumbuhannya. Indonesia yang memiliki hutan tropis yang sangat luas merupakan tempat yang ideal bagi tumbuhnya lumut. Walaupun demikian, para ahli kimia bahan alam Indonesia masih sedikit yang menaruh perhatian pada tumbuhan golongan ini. Publikasi ilmiah tentang tanaman ini lebih banyak ditulis oleh peneliti dari Eropa dan Jepang.

Tumbuhan lumut mengandung senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid, flavonoid dan senyawa golongan fenolik yang dapat berkhasiat obat (Mues, 1990). Lumut hati dari genus *Plagiochila* terutama tumbuh di daerah tropis. Genus ini dikenal sebagai sumber yang kaya akan bermacam-macam metabolit sekunder, seperti terpenoid, flavonoid, dan senyawa-senyawa aromatis. Akan tetapi, mayoritas spesies *Plagiochila* belum diteliti karena sulitnya mendapatkan sampel dalam jumlah yang memadai untuk dilakukan penelitian (Valcic, et al, 1996). Walaupun demikian, telah banyak pula peneliti yang melaporkan hasil penelitiannya tentang kandungan kimia dari beberapa spesies *Plagiochila*. Lumut hati *Plagiochila sandei* Dozy merupakan tanaman endemik yang tumbuh di lereng Gunung Halimun Jawa Barat.

Valcic, et al. (1996) telah berhasil mengisolasi beberapa jenis Plagiochiline dari beberapa spesies *Plagiochila*. Plagiochiline adalah senyawa bahan alam golongan seskuiterpen yang mempunyai kerangka dasar bisiklis yang tersusun dari cincin tujuh dan cincin enam. Dari *Plagiochila cristata* telah

berhasil diisolasi plagiochiline O, plagiochiline P, dan plagiochiline Q. Dari *Plagiochila ericicola* telah berhasil diisolasi Plagiochiline R, sedang Plagiochiline S telah diisolasi dari *Plagiochiline adianthoides*. Senyawa aromatis turunan 9,10-dihydrofenantren juga telah berhasil diisolasi dari beberapa spesies *Plagiochila* (Connolly, et al., 1999). Dari golongan senyawa seskuiterpenoid yang berhasil diisolasi diketahui banyak yang memiliki gugus epoksida, asetil hemiasetal, dan lakton. Senyawa-senyawa yang memiliki gugus-gugus fungsi ini dikenal memiliki sifat sitotoksik, di mana sifat ini selanjutnya dapat digunakan dalam pencarian senyawa bersifat antitumor atau bahkan antikanker. Hal tersebut didukung oleh penelitian dari Toyota et al. (1998) yang melaporkan bahwa Plagiochiline A dan 3 macam derivatnya yaitu *plagiochiline-A-15-yl octanoate*, *14-hydroxyplagiochiline-A-15-yl-2E,4E-dodecadienoate*, dan *14-hydroxyplagiochiline-A-15-yl* menunjukkan aktivitas sitotoksitas terhadap sel tumor leukimia murine P-388. Senyawa-senyawa tersebut memiliki gugus epoksida.

Dengan menggunakan GC-MS, peneliti telah berhasil mengidentifikasi beberapa senyawa dari ekstrak eter tanaman *Plagiochila sandei* Dozy. Senyawa-senyawa tersebut antara lain viridiflorol, malian-5-ol, 5(6)-fusicocadiene dan fusicogigantepoxide. Senyawa-senyawa tersebut memiliki gugus epoksida. Akan tetapi, dalam ekstrak ini masih banyak fraksi-fraksi yang belum dapat diisolasi dan diidentifikasi. Berdasarkan penelusuran literatur belum ada laporan yang mengungkap kandungan kimia dalam lumut *Plagiochila sandei* Dozy.

Berdasarkan data pendahuluan yang diperoleh nampak bahwa tanaman lumut ini memiliki potensi yang cukup besar untuk ditemukannya senyawa bioaktif, terutama yang bersifat antitumor atau antikanker. Eksplorasi lebih mendalam terhadap kandungan kimia dari tanaman ini akan memberikan informasi dan membuka peluang pemanfaatan lumut yang belum banyak diteliti di Indonesia.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian yang telah diuraikan, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimanakah struktur molekul senyawa yang terdapat pada ekstrak n-heksana, kloroform, dan metanol dari lumut hati *Plagiochila sandei* Dozy?
2. Apakah fraksi-fraksi / senyawa dari masing-masing ekstrak tersebut memiliki sifat sitotoksitas terhadap larva *Artemia salina* Leach?
3. Apakah senyawa-senyawa hasil isolasi memiliki aktivitas antikanker terhadap uji dengan sel kanker mieloma.



BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi yang bertujuan untuk mengisolasi senyawa yang mempunyai aktivitas antikanker yang terdapat pada fraksi n-heksana, kloroform, dan metanol dari lumut hati *Plagiochila sandei* Dozy. Senyawa-senyawa yang berhasil diisolasi ditentukan struktur molekulnya secara spektroskopis menggunakan spektrometer IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$. Setelah ditentukan struktur molekulnya maka senyawa hasil isolasi diuji aktivitas antikankernya melalui dua tahap pengujian. Tahap awal adalah pengujian menggunakan tes BST (*Brain Shrimp Lethality Test*). Uji ini merupakan tahapan *skrining* aktivitas dari senyawa-senyawa hasil isolasi yang mempunyai toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach yang biasa digunakan pada tes BST. Senyawa yang memiliki toksisitas tinggi pada tes BST selanjutnya diuji lebih lanjut aktivitas antikankernya menggunakan sel kanker mieloma.

2.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi senyawa-senyawa yang terdapat pada fraksi n-heksana, kloroform, dan metanol dari lumut hati *Plagiochila sandei* Dozy yang merupakan tumbuhan endemik Indonesia yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dan mempunyai aktivitas antikanker terhadap uji dengan sel kanker mieloma. Penelitian ini selanjutnya diharapkan dapat membuka minat peneliti bahan alam di Indonesia untuk mengeksplorasi tumbuhan lumut yang ada di Indonesia.

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Plagiochila

Lumut (*Bryophyta*) biasanya tumbuh di hutan-hutan yang basah pada ketinggian tertentu. Biasanya tumbuhan ini dapat ditemukan di lereng gunung atau pegunungan. Lumut (*Bryophyta*) dibedakan menjadi tiga kelas yaitu: lumut hati (*Hepaticeae*), lumut daun (*Musci*) dan lumut kerak (*Anthocerotae*) (Tjitrosoepomo, 1994). Salah satu genus dari lumut hati adalah *Plagiochila*, terutama tumbuh di daerah tropis. *Plagiochila sandei* Dozy adalah tumbuhan endemik Indonesia yang dapat dijumpai di lereng Gunung Halimun Jawa-Barat. Sistematika tanaman ini adalah sebagai berikut:

Divisi	: Bryophyta
Kelas	: Hepaticeae
Ordo	: Jungermaniales
Famili	: Acrogynaceae
Genus	: <i>Plagiochila</i>
Spesies	: <i>Plagiochila sandei</i> Dozy (Tjitrosoepomo, 1994)

3.1.1. Ciri-ciri morfologi ordo Jungermaniales

Lumut hati yang kebanyakan kecil, hidup di atas tanah atau batang-batang pohon, di daerah tropika sebagai epifit pada daun-daun pohon di hutan, mempunyai semacam batang yang bercabang-cabang banyak dan tumbuh dorsiventral. Pada bagian seperti itu terdapat dua baris semacam daun-daun kecil yang letaknya agak miring. Bagian tersebut sudah mempunyai ibu tulang tapi belum mempunyai berkas pembuluh pengangkutan. Bagian-bagian serupa daun tersebut terbagi dalam helaian bawah berbentuk kantung dan berguna sebagai alat penyimpan air. Selain bagian serupa daun, seringkali terdapat deretan serupa daun lain pada sisi bawah yang dinamakan daun-daun perut / *figastrum*. Pada jungermaniales yang tubuhnya bersifat talus, arkegonium diliputi oleh periketium yang dikelilingi oleh periantium. Kapsul spora jungermaniales

mempunyai tangkai. Kapsul spora mempunyai dinding yang terdiri atas berlapis-lapis sel, tidak mempunyai kolumela.

3.2. Kandungan Kimia Genus *Plagiochila*

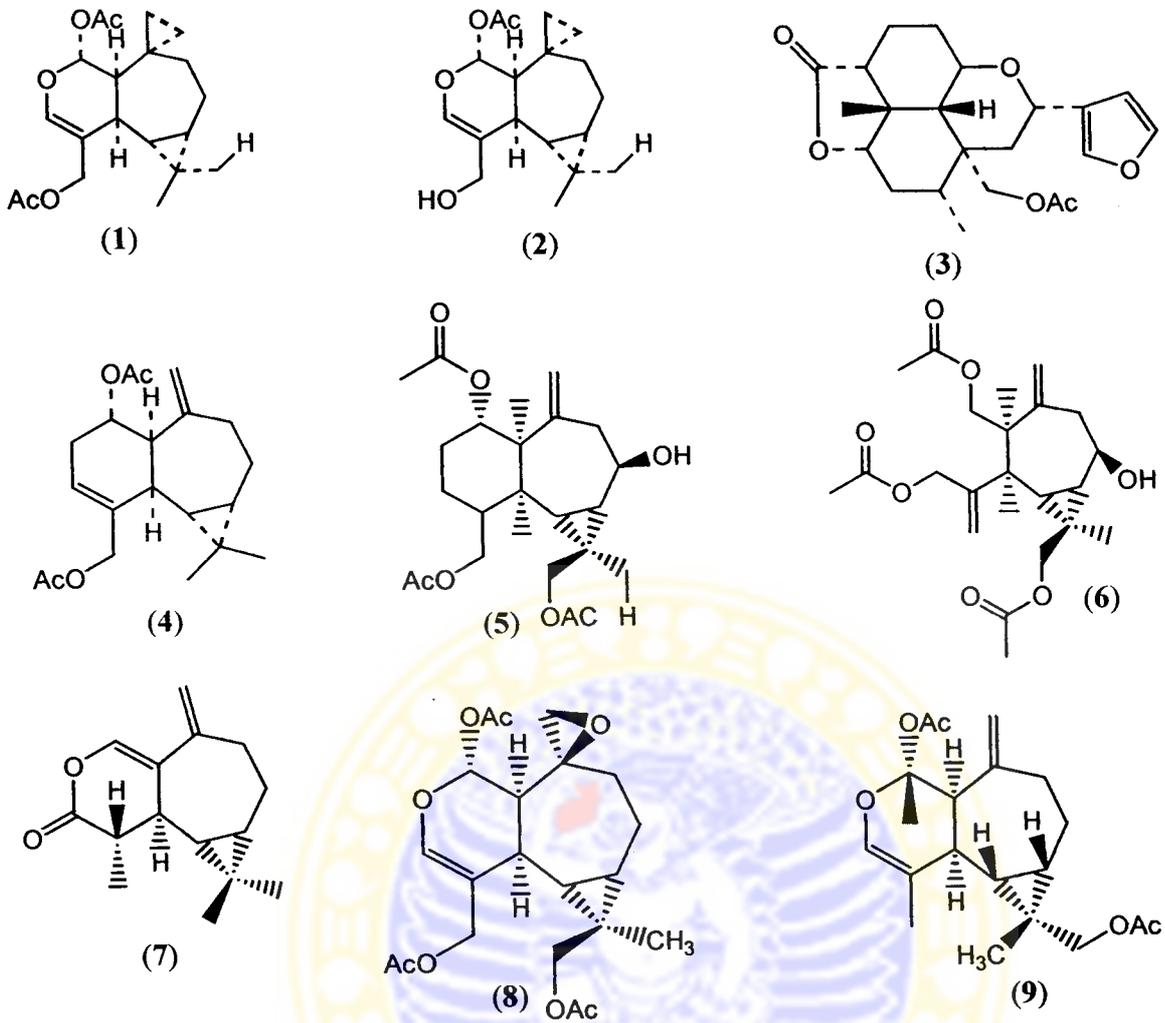
Genus *Plagiochila* dikenal sebagai sumber yang kaya akan bermacam-macam metabolit sekunder, seperti terpenoid, flavonoid, dan senyawa-senyawa aromatis. Akan tetapi, mayoritas spesies *Plagiochila* belum diteliti karena sulitnya mendapatkan sampel dalam jumlah yang memadai untuk dilakukan penelitian (Valcic, et al, 1996). Walaupun demikian telah banyak pula peneliti yang melaporkan hasil penelitiannya tentang kandungan kimia dari beberapa spesies *Plagiochila*.

3.2. 1. Kandungan seskuiterpena genus *Plagiochila*

Dari penelusuran literatur diketahui bahwa beberapa jenis plagiochiline telah diisolasi dan ditentukan struktur molekulnya. Plagiochiline adalah senyawa bahan alam golongan seskuiterpen yang mempunyai kerangka dasar bisiklis yang tersusun dari satu cincin tujuh dan satu cincin enam. Jenis plagiochiline dan asal tumbuhannya ditampilkan pada tabel 1. berikut ini.

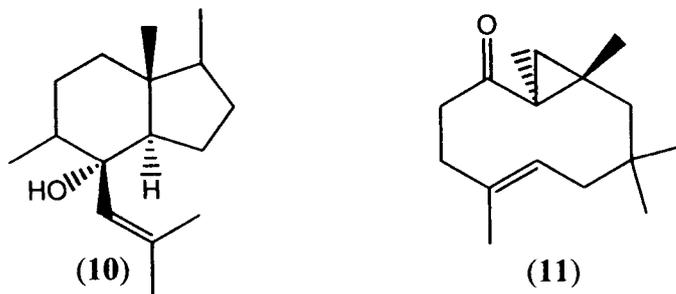
Tabel 1. Jenis Plagiochiline dan asal tumbuhannya

Jenis Plagiochiline	Asal Tanaman
A (1)	<i>Plagiochila yokogurensis</i> , <i>P. hattoriana</i> (Asakawa, 1982), <i>P. fruticosa</i> , <i>P. ovalifolia</i> , <i>P. semidecurrens</i> (Asakawa, 1990)
B (3)	<i>P. hattoriana</i> (Asakawa, 1982)
C (4)	<i>P. fruticosa</i> , <i>P. ovalifolia</i> , <i>P. yokogurensis</i> (Asakawa, 1990)
I (2)	<i>P. yokogurensis</i> (Asakawa, 1982)
O (5)	<i>P. cristata</i> (Valcic, et al., 1996)
P (6)	<i>P. cristata</i> (Valcic, et al., 1996)
Q (7)	<i>P. cristata</i> (Valcic, et al., 1996)
R (8)	<i>P. ericicola</i> (Valcic, et al., 1996)
S (9)	<i>P. adianthoides</i> (Valcic, et al., 1996)



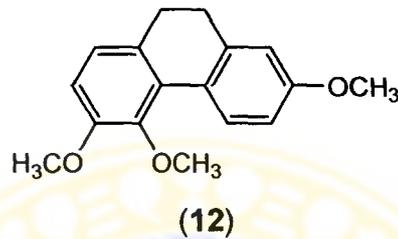
Gambar 1. Beberapa kandungan seskuiterpena genus *Plagiochila*

Matsuo et al. (1994) berhasil mengisolasi dua seskuiterpen teroksigenasi yaitu tamariscol (10) dan bisiklohumulenon (11) dari *Plagiochila acanthophylla* subsp. *Japonica*.

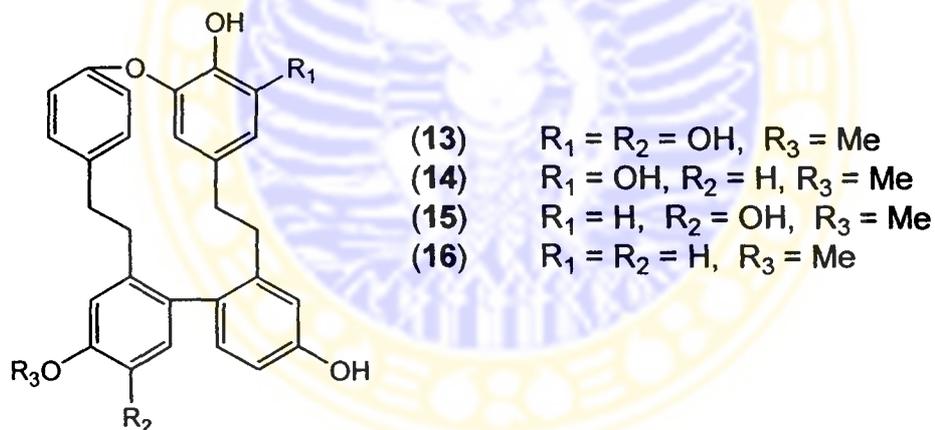


3.2.2. Kandungan metabolit sekunder lain pada genus *plagiochila*

Selain seskuiterpen, genus *plagiochila* juga mengandung senyawa metabolit sekunder yang lain, seperti golongan triterpenoida, flavonoida, dan golongan aromatis. Connoly, et.al. (1999) telah berhasil mengisolasi tujuh senyawa golongan 9,10 dihidrofenantren tersubstitusi, dua turunan asam orselinat, dan satu derivat asam lunularat dari *P. spinulosa*. Salah satu senyawa aromatis yang diisolasi tersebut adalah 2,5,6-trimetoksi-9,10-dihidrofenantrena (12) dengan struktur molekul seperti di bawah ini.



Dari *P. acanthophylla* subs. *Japonica* telah berhasil diisolasi empat macam senyawa bibenzil (13 - 16) dengan struktur dasar bis (bibenzil) siklis (Hashimoto et al., 1987)



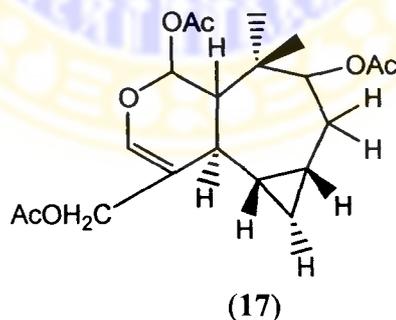
Gambar 2. Struktur molekul beberapa senyawa bis-(bibenzil siklis) dari *P. acanthophylla* subs. *Japonica*.

Dari spesies *P. asplenoides* telah diisolasi beberapa flavonoid, yaitu lucenin 1 (*luteloin-6-C-xylosyl-8-C-glucoside*), lucenin 2 (*luteloin-6,8-di-C-glucoside*), dan lucenin 3 (*luteloin-6-C-glucosyl-8-C-xylaside*) (Mues, et al., 1975).

3.2.3. Bioaktivitas metabolit sekunder genus *Plagiochila*

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam genus *Plagiochila* adalah seskuiterpen, triterpenoida, flavonoida, dan golongan aromatis. Senyawa-senyawa golongan tersebut dikenal memiliki bioaktivitas. Senyawa seskuiterpen dari genus *Plagiochila* yang berhasil diisolasi diketahui banyak yang memiliki gugus epoksida, asetil hemiasetal, dan lakton. Senyawa-senyawa yang memiliki gugus-gugus fungsi ini dikenal memiliki sifat sitotoksik, di mana sifat ini selanjutnya dapat digunakan dalam pencarian senyawa bersifat antitumor atau bahkan antikanker. Toyota, et al., (1998) melaporkan bahwa plagiochiline A 1 dan tiga macam derivatnya yaitu *plagiochiline-A-15-yl-octanoate*, *14-hydroxyplagiochiline-A-15-yl*, dan *14-hydroxyplagiochiline-A-15-yl-2E,4E-dodecadienoate* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel tumor leukemia murine P-388. *plagiochiline-A-15-yl-octanoate* dan *14-hydroxyplagiochiline-A-15-yl-2E,4E-dodeca-dienoate* mempunyai harga ID_{50} 0,05 mg/mL, sedang plagiochiline A 1 juga menunjukkan harga ID_{50} 3,0 mg/mL. Senyawa-senyawa tersebut memiliki gugus epoksida.

Suatu senyawa asetil hemiasetal (17) yang memiliki aktivitas penghambat pertumbuhan (*growth inhibitor*) telah berhasil diisolasi oleh Matsuo, et al. (1981) dari *P. semidecurrans*. Pada konsentrasi 25 ppm, senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan total biji beras, dan memiliki daya hambat 50% pada konsentrasi 12 ppm.



Plagiochiline A 1 dikenal memiliki bioaktivitas *antifeedant* dan *growth inhibitor* (Asakawa, et al., 1980).

3.3. *Artemia salina* Leach dan penggunaannya dalam uji bioaktivitas

Artemia salina Leach merupakan salah satu crustaceae tingkat rendah. Spesies ini dapat dijumpai di lima benua. Menurut Fuad (1986) hewan ini mempunyai taksonomi sebagai berikut:

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustaceae
Subkelas	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Famili	: Artemidae
Genus	: <i>Artemia</i>
Spesies	: <i>Artemia salina</i> Leach

Artemia salina Leach biasa juga disebut *Artemia*, merupakan makanan bagi ikan dan udang karena mengandung gizi yang tinggi. Selain itu *Artemia* biasa digunakan dalam uji pendahuluan bioaktivitas senyawa hasil isolasi bahan alam.

Prinsip dasar penggunaan *Artemia* sebagai indikator dalam uji bioaktivitas adalah bahwa senyawa aktif bersifat toksik dalam sel hidup pada konsentrasi tinggi dan akan berkhasiat sebagai obat jika dosisnya sesuai. Uji pendahuluan tersebut dapat dilakukan pada ekstrak kasar, fraksi homolog atau komponen aktif. Institut kanker Amerika pertama kali menggunakan *Artemia* untuk uji pendahuluan senyawa bioaktif. Hal ini dilakukan karena penelitian untuk menguji suatu senyawa terhadap sel kanker memerlukan biaya yang cukup besar. Keuntungan penggunaan *Artemia* sebagai bioindikator dalam uji pendahuluan adalah: cepat, ekonomis, metodenya mudah, mudah didapat, perlu sedikit sampel, tidak perlu laboratorium khusus, hasilnya dapat dipercaya dan bersifat umum (Meyer et al., 1982)

3.4. Kanker dan Mekanisme Kerja Antikanker

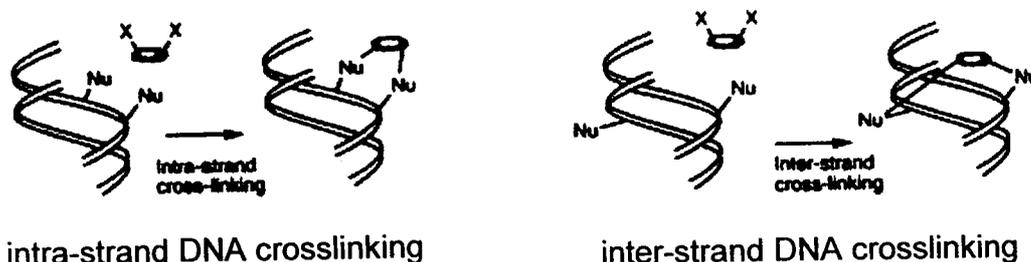
Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan tidak terkontrol jaringan yang telah mengalami perubahan tidak normal dan terjadi penyebaran sel kanker ke bagian tubuh lain dari titik asalnya. Suatu

kanker dikatakan ganas apabila dapat menembus dan menghancurkan struktur yang berdekatan dan menyebar ke tempat jauh. Karena pertumbuhan sel kanker yang sangat cepat dan tidak normal, maka terapi kanker, terutama secara kimia ditujukan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker ini (Fox and Whitesell, 1997). Secara umum penyebab kanker sampai saat ini belum dapat dimengerti dengan baik. Beberapa *agent* penyebab kanker yang sudah diketahui misalnya virus, bahan kimia, dan faktor genetik.

Beberapa metode telah digunakan untuk pengobatan kanker, seperti kemoterapi, radiasi, operasi, dan terapi imunologi. Terapi ini biasanya digunakan secara kombinasi. Senyawa kimia yang digunakan dalam terapi kanker disebut *antineoplastic*.

Interaksi antara DNA dengan antitumor dapat dikategorikan menjadi tiga yaitu sebagai *alkylating agent*, *DNA intercalator*, dan sebagai *chain cutters* (Patrick, 2002). Mekanisme kerja antitumor tersebut dengan cara memodifikasi DNA melalui beberapa cara, yaitu degradasi oksidatif, alkilasi melalui ikatan kovalen elektrofilik di antara pasangan basa DNA maupun melalui pembentukan kelompok molekul di mana terjadi ikatan hidrogen antara antitumor dan DNA. Suatu antitumor dapat melakukan salah satu dari ke tiga fungsi tersebut (Wierenga, 1991). Ditinjau dari ke tiga fungsi tersebut, suatu antitumor akan efektif apabila dapat melakukan ke tiga fungsi tersebut.

Suatu *alkylating agent* mengandung suatu gugus fungsi elektrofilik, seperti alkil halida. Reaksi suatu alkil halida dengan gugus nukleofilik pada DNA menyebabkan reaksi substitusi nukleofilik, di mana suatu nukleofil menggantikan ion halida melalui pembentukan ikatan kovalen dengan obat. Jika terdapat dua gugus elektrofilik pada obat, reaksi yang terjadi mengakibatkan terjadinya *cross-linking* pada satu rantai DNA (*intra-strand*) atau *cross-linking* antar rantai DNA (*Inter-strand*). Terjadinya *cross-linking* DNA dengan *alkylating agents* ini menyebabkan terganggunya fungsi normal DNA.

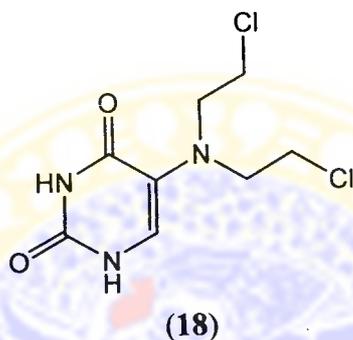


intra-strand DNA crosslinking

inter-strand DNA crosslinking

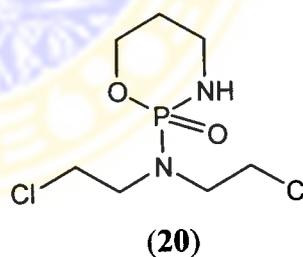
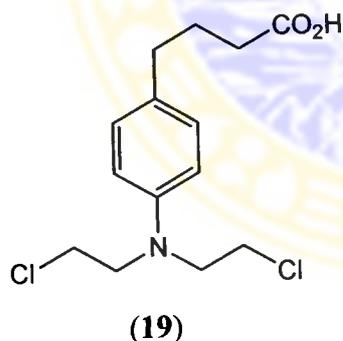
Gambar 3. Kemungkinan *Cross-linking* rantai DNA dengan *Alkylating agents*.

Salah satu contoh obat yang bekerja menggunakan prinsip ini adalah *Uracil mustard 18* dengan struktur molekul seperti di bawah ini (Patrick, 2002)



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

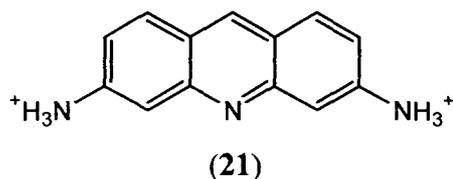
Chlorambucil 19 dan *cyclophosphamide 20* merupakan turunan baru dari nitrogen mustards yang digunakan pada pengobatan kanker payudara, ovarium, dan kanker paru-paru.



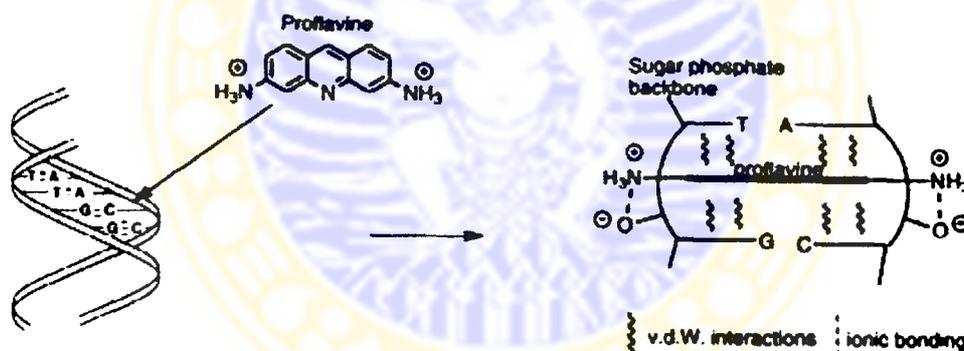
Suatu obat yang bekerja secara interkalasi mengikat DNA dengan menyisipkan dirinya di antara pasangan basa DNA. Proses interkalasi ini merusak struktur double helix DNA sehingga mencegah proses kopi DNA. Akibatnya sintesis protein jadi dihalangi. Obat yang bekerja dengan mekanisme seperti ini memiliki kegunaan yang cukup tinggi sebagai antibakteri dan antitumor.

Untuk dapat menyisipkan dirinya pada pasangan basa DNA, obat tersebut harus planar dengan ukuran yang sesuai. Selain itu juga harus bersifat hidrofobik, sehingga terjadi interaksi yang kuat antara obat dengan pasangan basa di bagian atas dan bawah. Persyaratan ini sesuai untuk senyawa golongan aromatis atau heteroaromatis.

Salah satu contoh obat yang bekerja melalui mekanisme ini adalah *proflavine* (21), yang mempunyai struktur molekul seperti di bawah ini.

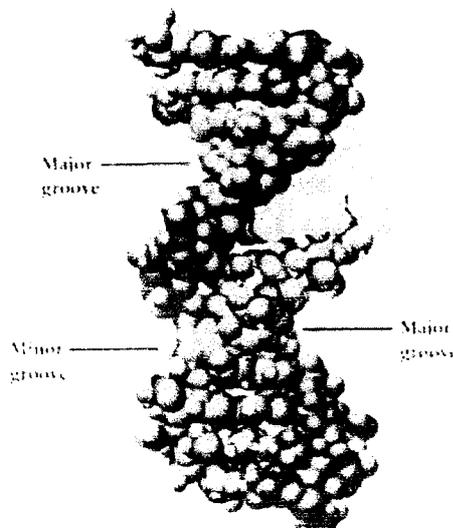


Sistem trisiklis ini mempunyai ukuran yang sesuai untuk dapat disisipkan dan dapat berinteraksi dengan basa asam nukleat melalui interaksi van der Waals. Proflavine juga mengandung dua buah gugus amino terionisasi yang dapat membentuk ikatan ionik dengan gugus fosfat pada kerangka DNA, sehingga memperkuat interaksi pengikatan.



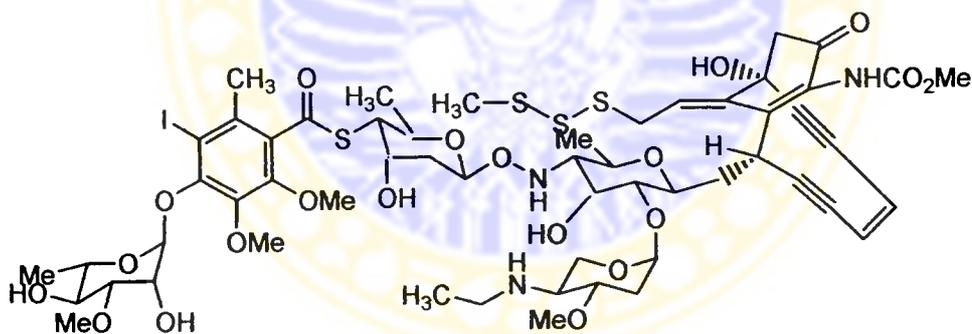
Gambar 4. Interkalasi Proflavine pada rantai DNA

Beberapa *interkalator* terikat pada sisi *groove* dari struktur heliks DNA. Terdapat dua macam sisi *groove*, yaitu *minor* dan *major*. Ukuran *groove* ini sangat penting, karena obat hanya menyukai salah satu dari dua macam sisi *groove* ini (Patrick, 2002).



Gambar 5. Sisi *Major groove* dan *Minor groove* pada rantai DNA.

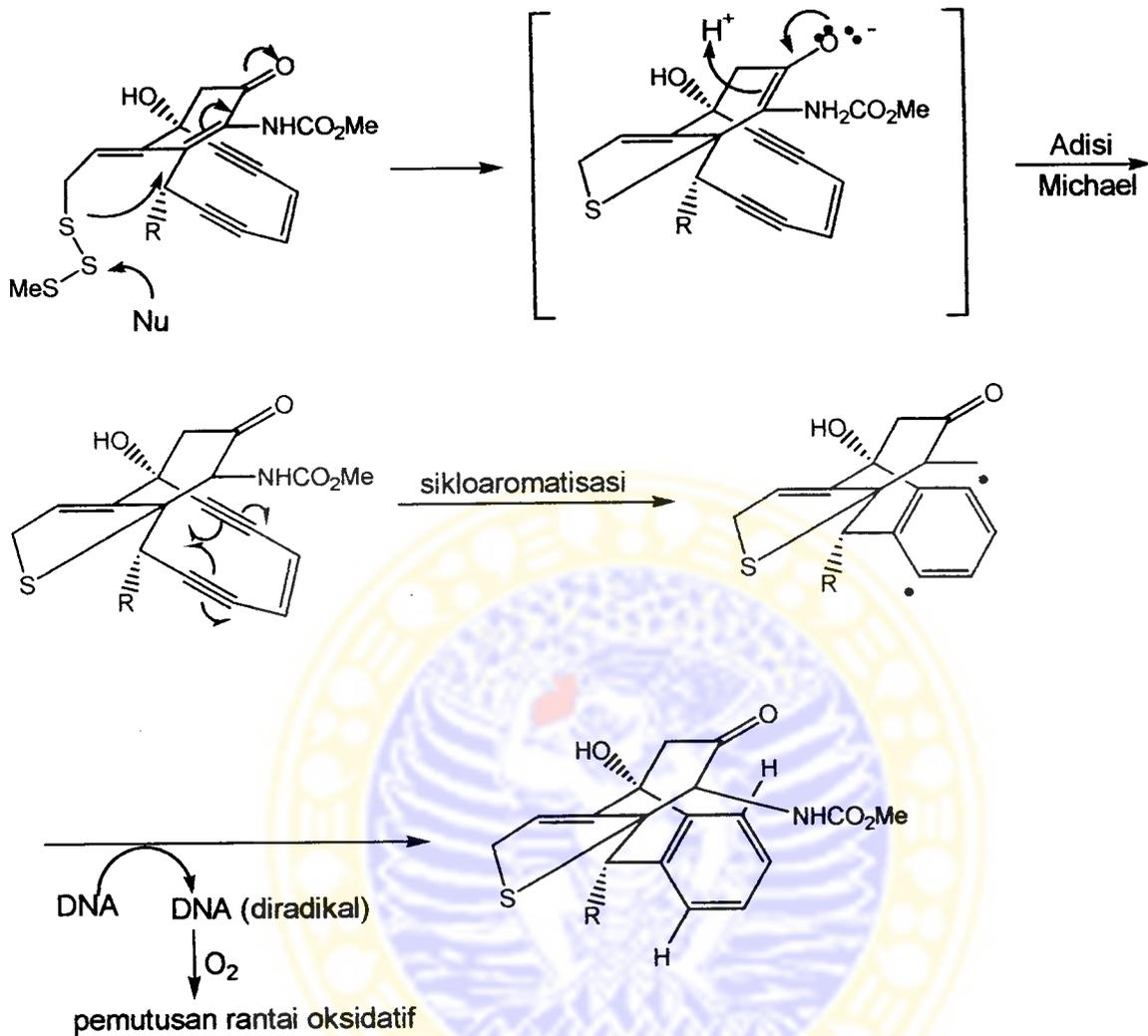
Obat dapat bereaksi dengan DNA, sehingga rantai DNA menjadi putus. Calicheamicin γ_1^1 **22** merupakan *agent* antitumor yang berhasil diisolasi dari suatu bakteri. Senyawa ini berikatan dengan DNA pada sisi *minor groove*, untuk kemudian memotong cincin DNA dengan cara membentuk suatu radikal yang reaktif (Patrick, 2002).



(22)

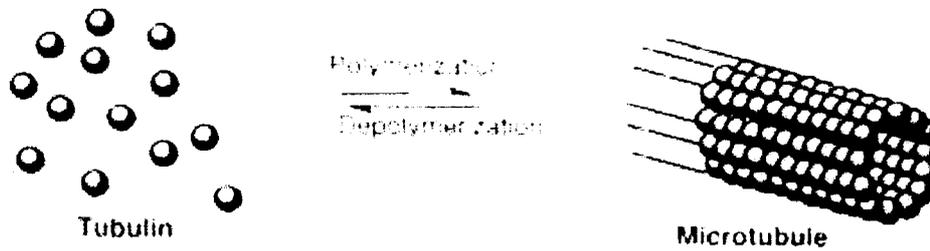
Reaksi ini dipicu melalui pembentukan cincin aromatis diradikal yang terbentuk dari sistem enadiina. Reaksi diawali dengan serangan nukleofil pada gugus trisulfida. Sulfur yang terbentuk kemudian mengalami reaksi adisi Michael dengan keton- α,β -tak jenuh. Selanjutnya hasil reaksinya mengalami siklisasi membentuk suatu diradikal aromatis. Spesies diradikal ini kemudian mengikat dua atom hidrogen dari DNA, sehingga terbentuk diradikal DNA. Reaksi diradikal

DNA dengan oksigen akan mengakibatkan pemutusan rantai DNA (Patrick, 2002). Persamaan reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut.



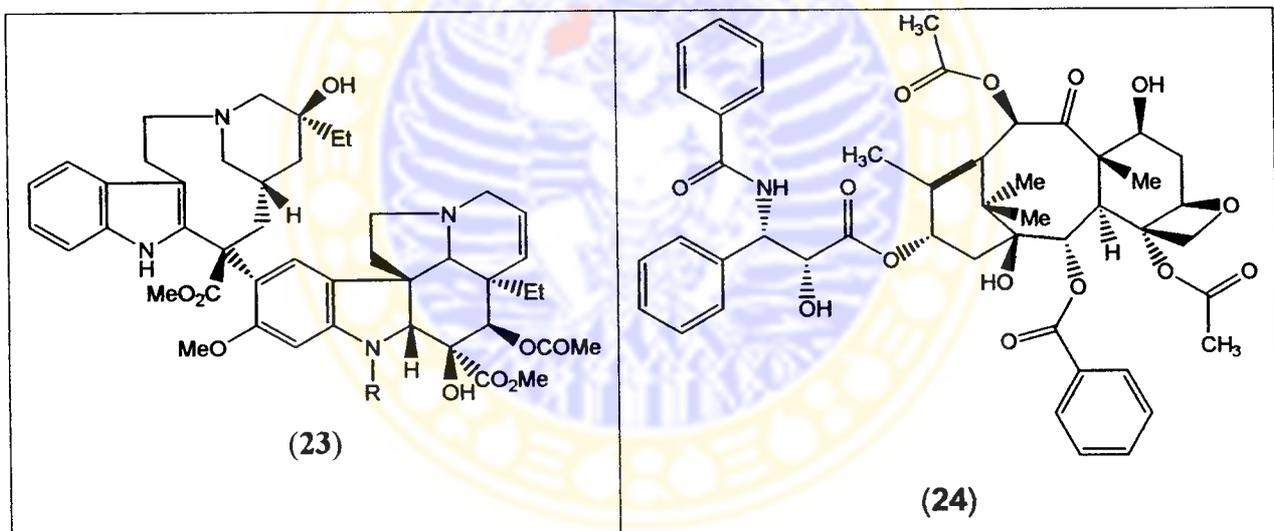
Gambar 6. Mekanisme reaksi pemutusan rantai DNA oksidatif oleh suatu antikanker.

Pada umumnya protein bukan merupakan target obat, kecuali protein yang disebut *Tubulin*. *Tubulin* mempunyai kemampuan untuk mengadakan polimerisasi membentuk suatu tabung kecil yang disebut *microtubules*. Mikrotubulus ini mempunyai fungsi selular yang bermacam-macam dan penting bagi kesatuan struktur dan pergerakan sel.



Gambar 7. Reaksi polimerisasi dan depolimerisasi tubulin oleh suatu antikanker.

Obat-obat yang dapat menghambat proses depolimerisasi atau repolimerisasi mikrotubulus akan mampu menghambat pembelahan sel dan mempunyai potensi yang tinggi untuk terapi kanker. Vincristine **23** adalah suatu antikanker yang bekerja dengan menghambat polimerisasi mikrotubulus, sedang taxol **24** adalah obat kanker yang bekerja dengan mekanisme menghambat depolimerisasi mikrotubulus (Patrick, 2002).



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Lokasi dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium kimia Organik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilaksanakan selama 4 bulan, mulai bulan Juli 2004 sampai November 2004.

4.2. Bahan dan Alat penelitian

4.2.1. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah lumut *Plagiochila sandei* Dozy yang dikumpulkan dari lereng Gunung Halimun, Jawa Barat. Sampel ini selanjutnya dideterminasi di LIPI Bogor. Telur *Artemia salina* Leach diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Pelarut yang digunakan untuk isolasi adalah n-heksana dan metanol dengan kualitas teknis yang telah didistilasi, sedang kloroform yang digunakan mempunyai kualitas pro analisa (p.a). Untuk pemurnian digunakan pelarut yang mempunyai kualitas pro analisa (p.a). Bahan kimia yang digunakan adalah kolom silika gel (E.Merck 77341), pelat KLT (E.Merck GF₂₅₄), pereaksi CeSO₄, silika gel cosmosil RP 75, sephadex LH 20 (E.Merck).

4.2.2. Alat Penelitian

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium, seperangkat alat kromatografi kolom, *rotary vacuum evaporator*, spektrofotometer IR JASCO FT-IR 5300, GC-MS HP, *Fisher Johns melting point apparatus*, spektrometer NMR Bruker AM 400 dan 500 MHz.

4.3. Prosedur Penelitian

4.3.1. Pembuatan ekstrak *Plagiochila sandei* Dozy.

Sebanyak 1145,4 gr lumut *Plagiochila sandei* Dozy kering dimaserasi dengan pelarut n-heksana sebanyak tiga kali. Ekstrak n-heksana yang diperoleh digabung, kemudian dipekatkan dengan penguap vakum putar. Ekstrak ini selanjutnya disebut sebagai ekstrak **A**. Residu yang diperoleh selanjutnya dimaserasi dengan pelarut kloroform sebanyak tiga kali. Ekstrak kloroform yang diperoleh dijadikan satu, kemudian dipekatkan dengan penguap vakum putar. Ekstrak yang diperoleh disebut dengan ekstrak **B**. Residu yang diperoleh kemudian dimaserasi lebih lanjut dengan pelarut metanol sebanyak tiga kali. Ekstrak metanol yang diperoleh dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan penguap vakum putar. Ekstrak ini disebut dengan ekstrak **C**.

4.3.2. Isolasi senyawa dari ekstrak n-heksana.

Ekstrak n-heksana (A) sebanyak 8,6 gr yang diperoleh dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel sebagai fasa diam dan campuran n-heksana-etilasetat: 9:1 sebagai fasa gerak, sehingga diperoleh 83 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama dijadikan satu sehingga diperoleh lima macam fraksi yaitu fraksi A.I. (dari fraksi no 1-16), fraksi A.II. (dari fraksi no 17-32), fraksi A.III. (dari fraksi 33-41), fraksi A.IV. (dari fraksi 42-72), dan fraksi A.V. (dari fraksi 73-83).

Fraksi A.II. (0,4 gr) dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel sebagai fasa diam, dan campuran n-heksana:etilasetat: 4:1 sebagai fasa gerak, sehingga diperoleh 33 fraksi. Fraksi-fraksi yang menunjukkan noda dengan R_f yang sama dijadikan satu, sehingga diperoleh 3 macam fraksi, yaitu fraksi A.II.₁ (dari fraksi no 1-4), fraksi A.II.₂ (dari fraksi no 5-7), dan fraksi A.II.₃ (fraksi no. 8-28). Fraksi A.II.₂ menunjukkan 1 noda dengan uji KLT. Kemudian fraksi A.II.₃ dipisah dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel cosmosil RP 75 sebagai fasa diam dan campuran n-heksana:etilasetat: 4:1, diperoleh 21 fraksi. Fraksi yang sama dijadikan satu, sehingga diperoleh dua macam fraksi yaitu fraksi A.II._{3.1} (fraksi no 1-8), dan fraksi A.II._{3.2} (fraksi no 9-21). Fraksi A.II._{3.1} selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi lapis preparatif menggunakan eluen n-heksana:etilasetat: 4:1, sehingga diperoleh 1 nod a. Senyawa ini selanjutnya

diuji kemuniannya dengan tiga macam eluen yang berbeda dengan senyawa pembanding spatulenol, dan dianalisis dengan spektrometer IR, ^1H – dan ^{13}C – NMR.

Fraksi A.IV. (0,9 gr) selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom silika dengan eluen campuran n-heksana:etilasetat = 4:1, diperoleh tiga macam fraksi yaitu fraksi A.IV.₁ (fraksi no. 1-5), fraksi A.IV.₂ (fraksi no. 6-11), dan fraksi A.IV.₃ (fraksi no 12-28). Fraksi A.IV.₂ selanjutnya dipisahkan lagi dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen n-heksana:etil asetat = 4:1. Hasil yang diperoleh 4 macam fraksi yaitu fraksi A.IV._{2.1}. (fraksi no 1-3), fraksi A.IV._{2.2}. (fraksi no 4-10), fraksi A.IV._{2.3} (fraksi no 11-25), fraksi A.IV._{2.4} (fraksi no 26-34). Fraksi A.IV._{2.4} menunjukkan 3 noda dan selanjutnya fraksi ini diuji bioaktivitasnya dengan menggunakan BST tes. Fraksi A.IV.₃ dipisahkan secara kromatografi kolom silika dengan eluen n-heksana:etilasetat = 4:1. Pemisahan ini menghasilkan tiga macam fraksi, yaitu fraksi A.IV._{3.1} (fraksi no 1-5), fraksi A.IV._{3.2}. (fraksi no 6-10), fraksi A.IV._{3.3} (fraksi no 11-29).

Fraksi A.V. (0,6 gr) selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom silika menggunakan campuran n-heksana:etilasetat = 4:1 sebagai eluen. Pemisahan ini menghasilkan tiga macam fraksi, yaitu fraksi A.V.₁ (fraksi no 3-8), fraksi A.V.₂ (fraksi no 9-18), dan fraksi A.V.₃ (fraksi 19-42). Fraksi A.V.₃ selanjutnya diuji bioaktivitasnya menggunakan tes BST.

4.3.3. Isolasi senyawa dari ekstrak kloroform.

Ekstrak kloroform (B) sebanyak 17,9 gr dipisahkan dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen campuran n-heksana:etilasetat = 4:1, dihasilkan 63 fraksi. Fraksi-fraksi yang menunjukkan noda-noda yang sama dikumpulkan, dihasilkan lima macam fraksi yaitu fraksi B.I (fraksi no 2), fraksi B.II. (fraksi no 3-5), fraksi B.III. (fraksi no 6, 11-27), fraksi B.IV. (fraksi no 7-9), fraksi B.V. (fraksi no 28-63).

Fraksi B.I dipisahkan dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen campuran n-heksana:etilasetat = 4:1, diperoleh 21 fraksi. Fraksi yang menunjukkan harga R_f sama dijadikan satu sehingga diperoleh tiga macam fraksi

yaitu fraksi B.I.₁ (fraksi no 1-2), fraksi B.I.₂ (fraksi no 3-15), fraksi B.I.₃ (fraksi 16-17). Berdasarkan analisis dengan KLT, fraksi B.I.₁, fraksi B.IV, dan fraksi B.I.₃ dicampur. Campuran fraksi ini selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen campuran n-heksana:etilasetat = 4:1, diperoleh 53 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama dijadikan satu sehingga diperoleh 5 macam fraksi yaitu fraksi B.I._{2.1} (fraksi no 1-2), fraksi B.I._{2.2} (fraksi no 3-8), fraksi B.I._{2.3} (fraksi no 9-23), fraksi B.I._{2.4} (fraksi no 24-29), dan fraksi B.I._{2.5} (fraksi no 30-53). Fraksi B.I._{2.3} (0,486 gr) dipisahkan dengan kolom sephadex dengan eluen campuran kloroform:metanol = 1:1 diperoleh 9 fraksi. Fraksi yang menunjukkan harga R_f sama digabung sehingga diperoleh 3 macam fraksi yaitu fraksi B.I._{3.1} (fraksi no 1-2), fraksi B.I._{3.2} (fraksi no 3-7), dan fraksi B.I._{3.3} (fraksi no 8-9). Fraksi B.I._{3.2} dipisahkan lebih lanjut menggunakan kolom silika dengan eluen n-heksana:etilasetat = 4:1, diperoleh 53 fraksi. Fraksi yang sama dijadikan satu, sehingga diperoleh 4 macam fraksi yaitu fraksi B.I._{3.2.1} (fraksi no 16-18), fraksi B.I._{3.2.2} (fraksi no 19-21), fraksi B.I._{3.2.3} (fraksi no 22-24), dan fraksi B.I._{3.2.4} (fraksi no 25-26). Fraksi-fraksi ini selanjutnya dipisahkan dengan KLT preparatif, diperoleh 5 noda, dengan harga R_f masing-masing (1) 0,33; (2) 0,46; (3) 0,48; (4) 0,57; dan (5) 0,46. Noda dengan harga R_f 0,33 dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen n-heksana:aseton = 9:1, menghasilkan 40 fraksi. Fraksi yang sama dikumpulkan, diperoleh 8 macam fraksi, yaitu fraksi B.I._{4.1} (fraksi no 1-2), fraksi B.I._{4.2} (fraksi no 3-7), fraksi B.I._{4.3} (fraksi no 8), fraksi B.I._{4.4} (fraksi 9-11), fraksi B.I._{4.5} (fraksi no 12-13), fraksi B.I._{4.6} (fraksi no 14-15), fraksi B.I._{4.7} (fraksi no 16-22), dan fraksi B.I._{4.8} (fraksi no 23-40). Fraksi B.I._{4.4} dan fraksi B.I._{4.7} selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi lapis preparatif. Dari fraksi B.I._{4.4} noda dengan harga R_f 0,33 diambil dan dimurnikan, kemudian diuji kemurniannya dengan 3 macam eluen yang berbeda. Demikian pula dari fraksi B.I._{4.7}, noda dengan harga R_f 0,35 diambil dan dimurnikan.

Fraksi B.II dipisahkan dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen n-heksana:etilasetat = 9:1 diperoleh 32 fraksi. Fraksi yang sama digabung, sehingga diperoleh 4 macam fraksi yaitu fraksi B.II.₁ (fraksi no 1-13), fraksi B.II.₂ (fraksi no 14-22), fraksi B.II.₃ (fraksi no 23-27), dan fraksi B.II.₄ (fraksi

no 28-32). Fraksi B.II.1 selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom silika diperoleh 56 fraksi. Fraksi yang sama digabung, sehingga diperoleh 5 macam fraksi yaitu fraksi B.II.1.1(fraksi no 1-11), fraksi B.II.1.2. (fraksi no 12-27), fraksi B.II.1.3.(fraksi no 28-37), fraksi B.II.1.4 (fraksi no 38-45), fraksi B.II.1.5. (fraksi no 46-56). Fraksi B.II.1.2. selanjutnya dianalisis dengan GC-MS.

Fraksi B.III dipartisi dengan pelarut campuran eter dan air, dan dipisahkan antara fasa eter dan fasa airnya. Fasa eternya diuapkan pelarutnya menggunakan alat penguap vakum putar. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan kromatografi kolom silika dengan eluen n-heksana:aseton = 20:1, dan diperoleh 54 fraksi. Fraksi yang sama digabung, diperoleh fraksi 10 fraksi, yaitu fraksi B.III.1 (fraksi no 1-18), fraksi B.III.2 (fraksi no 19-28), fraksi B.III.3 (fraksi no 29-42), fraksi B.III.4 (fraksi no 43), fraksi B.III.5 (fraksi no 44-47), fraksi B.III.6 (fraksi no 48-50), fraksi B.III.7 (fraksi no 51), fraksi B.III.8 (fraksi no 52), fraksi B.III.9 (fraksi no 53), dan fraksi B.III.10 (fraksi no 54). Fraksi B.III.3 dan fraksi B.III.4 digabung dan dipisahkan dengan kromatografi kolom silika dengan eluen n-heksana:aseton = 9:1, diperoleh 27 fraksi. Fraksi-fraksi ini belum dikerjakan lebih lanjut. Demikian pula untuk fraksi B.IV dan B.V. juga belum dikerjakan lebih lanjut.

4.3.4. Isolasi senyawa dari ekstrak metanol.

Karena jumlah ekstrak metanol yang terlalu banyak, yaitu 48,9 gr, maka kolom dilakukan sebanyak dua kali.

Kolom I: sebanyak 20 gr ekstrak metanol dipisahkan menggunakan kromatografi kolom silika secara gradien dengan eluen kloroform dan metanol, diperoleh 35 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama dikumpulkan sehingga diperoleh 3 macam fraksi yaitu fraksi CAI (fraksi no 2-6; 0,06 gr), fraksi CAII (fraksi no 7-12; 3,24 gr), dan fraksi CAIII (fraksi no 13-35; 1,94 gr). Fraksi CAI merupakan bagian dari ekstrak kloroform. Fraksi CAII selanjutnya dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom sephadex sebanyak dua kali dengan eluen metanol. Kolom IA diperoleh 34 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama digabung, sehingga diperoleh 6 macam fraksi, yaitu fraksi CAII_{1A} (fraksi no 1-9), fraksi CAII_{2A} (fraksi no 10-17),

fraksi CAII_{3A} (fraksi no 18-22), fraksi CAII_{4A} (fraksi 23-26), fraksi CAII_{5A} (fraksi no 27-30), dan fraksi CAII_{6A} (fraksi no 31-34). Kolom IB diperoleh 36 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama digabung, sehingga diperoleh 5 macam fraksi yaitu fraksi CAII_{1B} (fraksi no 1-11), fraksi CAII_{2B} (fraksi no 12-18), Fraksi CAII_{3B} (fraksi 19-27), fraksi CAII_{4B} (fraksi no 28-32), fraksi CAII_{5B} (fraksi no 33-36). Fraksi-fraksi dari ke dua kolom yang sama digabung, yaitu fraksi CAII_{1A} dengan CAII_{1B} (disebut fraksi CAII_{1C}); fraksi CAII_{2A}, CAII_{3A} digabung dengan CAII_{2B} (disebut fraksi CAII_{2C}); fraksi CAII_{4A} dengan CAII_{3B} + CAII_{4B} (disebut fraksi CAII_{3C}); fraksi CAII_{6A} dengan CAII_{5B} (disebut fraksi CAII_{4C}).

Kolom II: sebanyak 22 gr ekstrak metanol (C) dipisahkan dengan kromatografi kolom silika secara gradien dengan eluen kloroform dan metanol, diperoleh 60 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama digabung, sehingga diperoleh 12 macam fraksi, yaitu fraksi CBI₁ (fraksi no 1-5), fraksi CBI₂ (fraksi no 6-8), fraksi CBI₃ (fraksi no 9-17), fraksi CBI₄ (fraksi no 18-24), fraksi CBI₅ (fraksi no 25-26), fraksi CBI₆ (fraksi no 27-29), fraksi CBI₇ (fraksi no 30-35), fraksi CBI₈ (fraksi no 36-41), fraksi CBI₉ (fraksi no 42-45), fraksi CBI₁₀ (fraksi no 46-52), fraksi CBI₁₁ (fraksi no 53-57), dan fraksi CBI₁₂ (fraksi no 58-60). Fraksi CBI₂ selanjutnya digabung dengan fraksi CAII_{1A} dan CAII_{1B}. Campuran ke tiga fraksi ini selanjutnya dipartisi dengan campuran eter dan air. Fasa eter dipisahkan dari fasa air, kemudian fasa eternya diuapkan dengan penguap vakum putar. Selanjutnya fraksi ini dipisahkan dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen n-heksana:etilasetat = 4:1, diperoleh 55 fraksi. Fraksi yang sama digabung sehingga diperoleh 6 macam fraksi, yaitu fraksi CBII₁ (fraksi no 1-3), fraksi CBII₂ (fraksi no 4-6), fraksi CBII₃ (fraksi no 7-10), fraksi CBII₄ (fraksi no 11-16), fraksi CBII₅ (fraksi no 17-24), dan fraksi CBII₆ (fraksi no 25-55). Selanjutnya fraksi CBII₂ dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen metanol:kloroform = 1:1, diperoleh 27 fraksi. Fraksi yang sama digabung, sehingga diperoleh 4 macam fraksi yaitu fraksi CBIII₁ (fraksi no 1-9), fraksi CBIII₂ (fraksi no 10-22), fraksi CBIII₃ (fraksi 23-31), dan fraksi CBIII₄ (fraksi no 32-37). Fraksi CBIII₂ dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom sephadex dengan eluen metanol:kloroform = 1:1, diperoleh 27 fraksi. Fraksi-fraksi yang sama digabung,

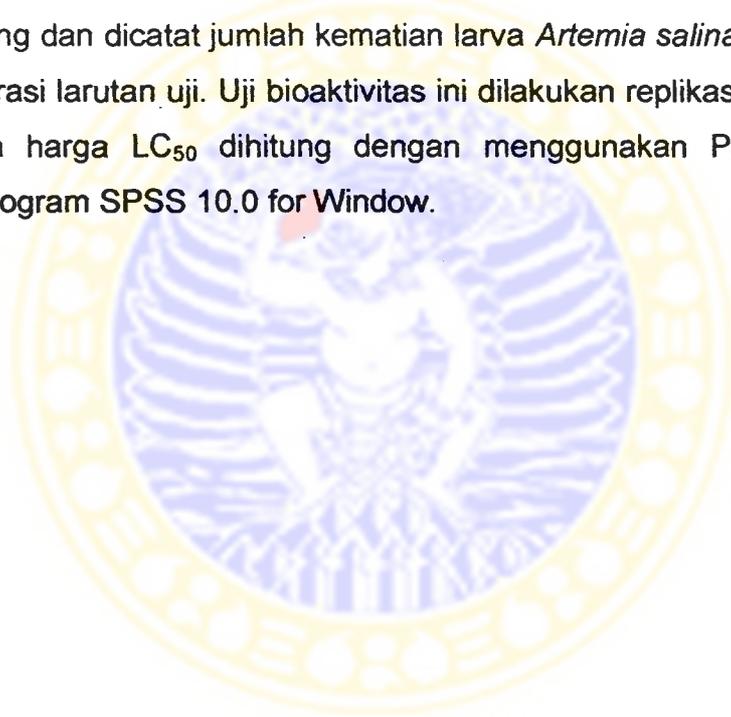
sehingga diperoleh 4 macam fraksi yaitu fraksi CBIV₁ (fraksi no 1-7), fraksi CBIV₂ (fraksi no 8-10), fraksi CBIV₃ (fraksi no 11-14), dan fraksi CBIV₄ (fraksi no 15-27). Fraksi CBIV₄ dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom silika menggunakan eluen n-heksana:aseton = 4:1 diperoleh 20 fraksi. Fraksi yang sama digabung sehingga diperoleh 4 macam fraksi yaitu fraksi CBV₁ (fraksi no 1-9), fraksi CBV₂ (fraksi no 10-13), fraksi CBV₃ (fraksi no 14-15), dan fraksi CBV₄ (fraksi no 16-20).

Fraksi CBIII₃ selanjutnya dipisahkan lebih lanjut dengan kolom silika menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat secara gradien, dan diperoleh tiga macam fraksi yaitu fraksi CBIII_{3,1} (terdiri dari fraksi no 1 – 8), fraksi CBIII_{3,2} (terdiri dari fraksi no 9 – 10), dan fraksi CBIII_{3,3} (terdiri dari fraksi no 11 – 17). Fraksi CBIII_{3,3} (0,02 gr) selanjutnya dipisahkan dengan kolom silika menggunakan eluen n-heksana dan aseton secara gradien, diperoleh 3 macam fraksi yaitu: fraksi CBIII_{4,1} (fraksi no 1 – 13), fraksi CBIII_{4,2} (fraksi no 14 – 15), dan fraksi CBIII_{4,3} (fraksi no 16 – 20). Selanjutnya ke tiga fraksi ini dipisahkan dengan kromatografi lapis preparatif diperoleh fraksi a – g. Fraksi b, c, dan e menunjukkan harga R_f yang sama sehingga digabung, untuk selanjutnya dipisahkan lagi dengan kromatografi lapis preparatif sehingga diperoleh 2 macam fraksi yaitu fraksi CBIII_{5,1} (5 mg) dan fraksi CBIII_{5,2} (3 mg) yang masing-masing berbentuk kristal putih. Ke dua kristal ini selanjutnya diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan beberapa macam eluen. Setelah itu ke dua kristal tersebut ditentukan struktur molekulnya dengan spektrometer NMR (¹H-, ¹³C-, dan DEPT 135).

4.3.5. Uji bioaktivitas fraksi-fraksi dari ekstrak *Plagiochila sandei* Dozy

Sebanyak 25 mg fraksi dari masing-masing ekstrak *Plagiochila sandei* Dozy dilarutkan dalam etanol p.a sebanyak 25 mL (di dalam labu ukur) sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan ini merupakan larutan induk. Selanjutnya dibuat larutan uji dengan konsentrasi 125, 100, 50, 10, dan 1 ppm melalui pengenceran larutan induk. Telur *Artemia salina* Leach dibiakkan dalam air laut dengan menginkubasinya selama 48 jam pada suhu ruang.

Sebanyak 18 buah botol vial putih 10 mL disiapkan dan ditara untuk volume 5 mL. Ke dalam 5 buah botol vial dimasukkan sejumlah tertentu larutan masing-masing ekstrak *Plagiochila sandei* Dozy dengan konsentrasi masing-masing 125, 100, 50, 10, dan 1 ppm, kemudian pelarut diuapkan sampai kering di lemari asam. Ke dalam masing-masing botol vial yang mengandung sampel ditambahkan 50 μ L DMSO, termasuk pada vial kontrol negatif. Setelah itu ditambahkan air laut secukupnya. Selanjutnya campuran tersebut dikocok dengan vortex sehingga sampel larut dalam air laut. Selanjutnya, ke dalam masing-masing botol vial dimasukkan larva *Artemia salina* Leach sebanyak 10 ekor dan ditambahkan air laut sampai volumenya tepat 5 mL. Selanjutnya larva *Artemia salina* Leach tersebut diinkubasi pada suhu ruangan selama 24 jam. Setelah itu dihitung dan dicatat jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach pada tiap-tiap konsentrasi larutan uji. Uji bioaktivitas ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Selanjutnya harga LC_{50} dihitung dengan menggunakan Persen Probit menggunakan program SPSS 10.0 for Window.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pembuatan Ekstrak *Plagiochila sandei* Dozy

Lumut *Plagiochila sandei* Dozy dikumpulkan dari lereng Gunung Halimun, Jawa Barat. Lumut tersebut selanjutnya diidentifikasi di LIPI Bogor. Foto lumut ditampilkan pada lampiran 1. Lumut yang diperoleh mula-mula dibersihkan dari kotorannya, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari langsung. Setelah kering dipotong-potong sehingga diperoleh serbuk halus sebanyak 1145,4 gr. Selanjutnya serbuk lumut ini dimaserasi dengan pelarut n-heksana sebanyak tiga kali. Ekstrak n-heksana dari masing-masing proses ekstraksi digabung, yang selanjutnya dipekatkan dengan penguap vakum putar. Ekstrak n-heksana yang diperoleh berjumlah 8,6 gr. Tujuan dari ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana adalah untuk mengekstraksi senyawa-senyawa non-polar yang terdapat pada lumut *Plagiochila sandei* Dozy.

Residu yang diperoleh dari proses maserasi menggunakan n-heksana kemudian dikeringkan. Setelah kering residu ini dimaserasi dengan pelarut kloroform sebanyak tiga kali. Ekstrak kloroform yang diperoleh dari masing-masing proses maserasi dikumpulkan untuk kemudian dipekatkan dengan penguap vakum putar. Ekstrak kloroform yang diperoleh berjumlah 17,9 gr. Dengan menggunakan pelarut kloroform, maka diharapkan senyawa-senyawa semi-polar dalam lumut *Plagiochila sandei* Dozy dapat terekstrak.

Residu dari proses ekstraksi menggunakan kloroform selanjutnya dimaserasi lebih lanjut sebanyak tiga kali menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh dari masing-masing tahap maserasi selanjutnya dikumpulkan untuk dipekatkan menggunakan penguap vakum putar. Ekstrak metanol yang diperoleh adalah sebanyak 48,9 gr. Tujuan penggunaan metanol sebagai pelarut adalah untuk mengekstraksi senyawa-senyawa polar dalam lumut *Plagiochila sandei* Dozy. Jadi proses ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi bertingkat berdasarkan tingkat kepolaran pelarut.

5.2. Analisis Ekstrak n-Heksana

Fraksi nomor 1 sampai 13 dari fraksi A.I. setelah dipisahkan diperoleh fraksi yang mempunyai konsistensi seperti minyak dan sukar dipisahkan dengan kromatografi kolom. Oleh sebab itu fraksi nomor 1-13 ini digabung dan dianalisis dengan menggunakan GC-MS. Berdasarkan kromatogram GC teramati adanya 20 puncak kromatogram, akan tetapi yang dianalisis menggunakan spektroskopi massa hanya 13 puncak kromatogram dengan intensitas tinggi. Analisis puncak kromatogram menggunakan spektroskopi massa menunjukkan bahwa semua puncak tersebut merupakan ester dari asam lemak. Ester asam lemak ini dapat diduga berasal dari lapisan lemak pada daun lumut *Plagiochila sandei* Dozy. Hasil lengkap analisis GC-MS ditampilkan pada tabel 2 berikut ini. Spektrum massa hasil analisis ditampilkan pada lampiran 2. Spektrum massa sampel dirujuk pada *library data* koleksi Wiley 38.L dan struktur molekul dianalisis menggunakan metode *Probability Based Matching*.

Tabel 2. Hasil analisis GC-MS fraksi nomor 1-16 dari fraksi A.I.

No	Waktu retensi (menit)	Senyawa
1	13,47	Metil dodekanoat
2	15,8	Metil tetradekanoat
3	17,93	Metil heksadodekanoat
4	18,03	Metil heksadodekanoat
5	18,86	Metil heptadodekanoat
6	19,54	Metil 10-oktadecenoat
7	19,7	Metil-13-oktadesenoat
8	19,74	Metil-9-oktadodekanoat
9	19,80	Metil oktadecenoat
10	20,37	Etil oktadodekanoat
11	23,32	Metil docosanoat
12	25,68	Metil tetracosanoat
13	25,95	(Z)-9-Asam oktadesenoat

Sedang fraksi nomor 12-16 dari fraksi A.I. setelah diuapkan pelarutnya membentuk kristal putih, yang selanjutnya dimetilasi menggunakan metanol dengan katalisator asam sulfat pekat. Hasil esterifikasi ini selanjutnya dianalisis menggunakan GC-MS, yang menunjukkan adanya 2 puncak kromatogram pada waktu retensi 17,85 menit dan 19,78 menit. Spektrum massa ke dua senyawa ini ditampilkan pada lampiran 3. Dengan membandingkan spektrum massa ke dua senyawa tersebut dengan *library data* dapat diketahui bahwa ke dua senyawa tersebut merupakan metil heksadekanat dan metil oktadekanat.

Kristal yang diperoleh dari fraksi A.II.2.1 diuji kemurniannya dengan menggunakan 3 macam eluen yang berbeda dan dibandingkan dengan spatulenol standar. Dengan ke tiga macam eluen, kristal tersebut menunjukkan hanya 1 noda. Hal ini menunjukkan bahwa kristal hasil isolasi sudah murni. Hasil uji kemurnian tersebut ditampilkan pada tabel 3 berikut.

Tabel 3. Hasil uji kemurnian fraksi A.II.2.1, menggunakan KLT

No	Eluen	Harga R _f	
		Kristal A.II.2.1	Spatulenol
1	n-heksana:CHCl ₃ = 3:2	0,13	0,13
2	n-heksana:CHCl ₃ = 4:1	0,10	0,10
3	n-heksana:aseton= 9:1	0,23	0,23

Senyawa hasil isolasi dari fraksi A.II.2.1 tersebut selanjutnya dianalisis secara spektroskopis dengan spektrofotometer FT-IR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa tersebut. Spektrum IR senyawa hasil isolasi ditampilkan pada lampiran 4. hasil analisis pita-pita serapan IR disusun dalam tabel 4. di bawah ini (Pretsch, et al, 1989).

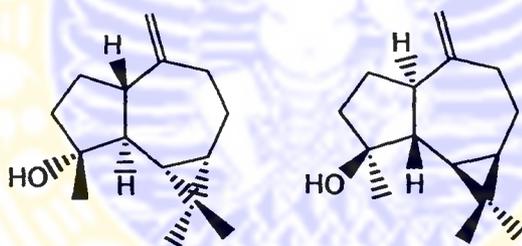
Spektrum ¹H - NMR dari senyawa ini ditampilkan pada lampiran 5. Spektrum tersebut mengindikasikan adanya signal proton dari tiga buah gugus metil pada δ 1,23 (m, br), dua buah signal yang saling mengadakan kopling pada δ 1,23 (m, br) dan 1,25 (m, br) adalah signal gugus metilen dan metin. Signal proton gugus hidroksil muncul pada δ 3,63 (s, 3H). Gugus ekso metilen teramati

pada δ 7.24 (d, 2H). Di samping itu identifikasi ini juga dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Asakawa et al. (2003).

Tabel 4. Pita serapan kristal dari fraksi A.II.2.1 dengan FT-IR dan interpretasinya

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi
3447,1	Vibrasi ulur –OH
2935,9	Vibrasi ulur =C-H
2868,4	Vibrasi ulur –C-H
1462,2	Vibrasi tekuk =C-H
1242,3	Vibrasi ulur –C-O-

Berdasarkan hasil analisis dengan spektrofotometer IR, ¹H-NMR dan hasil perbandingan dengan penelitian terdahulu dapat disimpulkan bahwa kristal hasil isolasi adalah spatulenol. Spatulenol merupakan suatu alkohol seskuiterpen yang selalu terdapat dengan pasangan enantiomernya dengan struktur molekul seperti di bawah ini.



Struktur molekul pasangan enantiomer spatulenol

Analisis fraksi A.V.3 menggunakan metode KLT menunjukkan bahwa hanya mengandung satu senyawa yang ditunjukkan oleh hanya terjadinya satu noda. Kemudian pemisahan fraksi A.V.2 menggunakan KLP memberikan satu senyawa yang jika dianalisis dengan KLT juga menunjukkan noda dengan harga R_f yang sama dengan senyawa dari fraksi A.V.3. Oleh sebab itu ke dua senyawa ini digabung. Selanjutnya senyawa ini diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan eluen n-heksana:kloroform = 3:2, memberikan harga R_f 0,18. Senyawa ini mempunyai titik leleh 159 – 161⁰C.

Untuk mengetahui gugus fungsi yang ada pada senyawa hasil isolasi maka senyawa tersebut dianalisis dengan spektrofotometer infra merah. Spektrum infra merah senyawa tersebut ditampilkan pada Lampiran 6. Hasil analisis dari spektrum infra merah tersebut ditampilkan pada tabel 5 sebagai berikut.

Tabel 5. Analisis spektrum infra merah senyawa dari fraksi A.V.₃

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi
2930	Vibrasi ulur =C-H
2852	Vibrasi ulur -C-H
1219	Vibrasi ulur -C-O

Spektrum ¹H – dan ¹³C – NMR dari kristal ini ditampilkan pada lampiran 7. Akan tetapi karena data pendukung masih belum mencukupi, maka struktur molekul kristal ini belum dapat dipastikan.

5.3. Analisis Ekstrak Kloroform

Fraksi yang menarik dan ingin diisolasi serta dianalisis dalam penelitian ini adalah fraksi yang menunjukkan fluoresensi biru yang intensif jika pada pelat KLT disinari dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Fraksi yang menunjukkan hal tersebut adalah fraksi B.I.4.4. dan B.I.4.7. Fraksi B.I.4.4 yang menunjukkan satu noda diuji kemurniannya dengan menggunakan KLT tiga macam eluen. Hasil yang diperoleh disusun dalam tabel 6 berikut.

Tabel 6. Uji kemurnian senyawa dari fraksi B.I.4.4 dengan KLT

No	Eluen	Harga R _f
1	n-Heksana:etilasetat : 4:1	0,38
2	n-Heksana:metanol : 3:2	0,48
3	n-Heksana: kloroform : 4:1	0,46

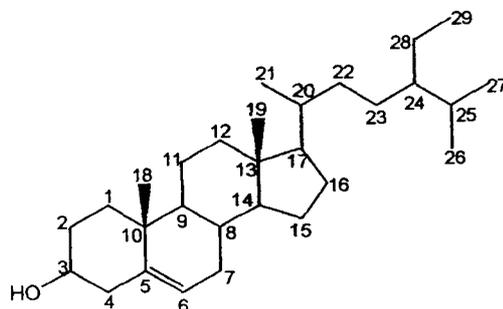
Selanjutnya kristal dari fraksi B.I.4.4 dianalisis dengan spektrofotometer infra merah. Spektrum infra merah hasil analisis ditampilkan pada lampiran 8. Analisis pita serapan infra merah disusun pada tabel 7 berikut ini.

Tabel 7. Analisis spektrum infra merah senyawa dari fraksi B.I.4.4.

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi
3476	Vibrasi ulur -OH
2924	Vibrasi ulur -CH ₃
2852	Vibrasi ulur -CH ₂ -
1647	Vibrasi ulur -C=C-
1219	Vibrasi ulur C-O

Spektrum NMR (¹H-, ¹³C-, DEPT 135) hasil analisis ditampilkan pada Lampiran 9. Dari spektrum ¹H-NMR teramati adanya proton yang terikat pada karbon ikatan rangkap (>C=C-H) yang muncul pada δ 5,35 ppm (d, $J = 3.25$ Hz). Proton gugus hidroksil teramati oleh signal pada δ 3.52 ppm (s). Signal proton pada δ 0,7 – 1,1 ppm menunjukkan adanya lima buah gugus metil (-CH₃), sedang signal pada δ 1.3 ppm (t) menunjukkan sebuah gugus metil pada posisi C-29.

Berdasarkan spektrum ¹³C-NMR teramati 29 atom karbon. Adanya atom karbon berikatan rangkap (>C=C<) ditunjukkan oleh signal pada δ 140.79 dan 121.71 ppm. Sedang atom karbon yang mengikat gugus hidroksil (-C-OH) teramati sebagai signal pada δ 71,81 ppm. Adanya sebelas atom karbon metilen (-CH₂-) teramati dengan eksperimen DEPT 135 yang muncul sebagai signal negatif pada δ : 60,36; 42,33; 39,79; 37,27; 31,69; 31,57; 29,68, 28,23; 24,29; 22,63; 21,08 ppm. Dua buah gugus metil pada posisi C-18 dan C-19 teramati sebagai signal pada δ 11.86 ppm dan 19.39 ppm. Spektrum ini juga dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu (Tanjung, 1994) dan literatur (Breitmaier, 1993). Berdasarkan hasil analisis secara spektroskopis dengan IR, ¹H- dan ¹³C-NMR dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah β -sitosterol yang mempunyai struktur molekul seperti gambar di bawah ini.

Struktur molekul β -sitosterol.

Nilai-nilai pergeseran kimia dari β -sitosterol ditampilkan pada tabel 8 di bawah ini.

Tabel 8. Nilai-nilai pergeseran kimia ^{13}C -NMR β -sitosterol dari Tanjung, (1994) dan hasil isolasi.

Posisi atom karbon	Tanjung (1994) (ppm)	Hasil isolasi (ppm)	Breitmaier (1993) (ppm)
1	37,30	37,28	37.30
2	31,68	31,69	31.60
3	71,83	71,82	71.70
4	42,35	42,34	42.30
5	140,77	140,79	140.80
6	121,75	121,71	121.60
7	31,92	31,93	31.92
8	31,68	31,69	31.94
9	50,17	50,18	50.20
10	36,53	36,53	36.50
11	21,09	21,10	21.10
12	39,82	39,71	39.80
13	42,35	42,34	42.30
14	56,80	56,80	56.80
15	24,31	24,31	24.30
16	28,26	29,20	28.30
17	56,11	56,10	56.10
18	11,89	11,98	11.90
19	19,42	21,01	19.40
20	36,20	36,15	36.20
21	18,81	14,19	18.80
22	34,00	36,15	34.00
23	26,14	25,39	26.10
24	45,89	45,89	45.85
25	29,20	29,68	29.20
26	19,83	21,10	19.80
27	19,06	19,39	19.10
28	23,09	23,10	23.10
29	12,01	11,86	12.30

Fraksi B.I.4.7. juga menunjukkan 1 noda, sehingga diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan tiga macam eluen. Hasil analisis tersebut disusun dalam tabel 9 berikut.

Tabel 9. Uji kemurnian senyawa fraksi B.I.4.7 dengan KLT

No	Eluen	Harga R_f
1	n-Heksana: kloroform : 3:2	0,24
2	n-heksana: aseton : 4:1	0,53
3	n-Heksana: Etilsetat : 4:1	0,44

Fraksi B.II.1.2. selanjutnya dianalisis dengan GC-MS. Masing-masing puncak dari kromatogram hasil analisis dengan GC selanjutnya dianalisis dengan spektrometer MS. Spektrum tersebut selanjutnya dirujuk dengan *library data* koleksi Wiley 38.1. Hasil analisis tersebut disusun dalam tabel 10 berikut ini.

Tabel 10. Hasil analisis GC-MS fraksi B.II.1.2.

No	Waktu retensi (menit)	Senyawa
1	15,95	7-Dihydroxanthotoxin
2	16,28	Dehydroaromadendrene
3	17,01	8,9-Dehydro-neoisolongifolene
4	17,88	Metilheksadekanoat
5	18,56	Etil heksadekanoat
6	19,46	Metil-(Z,Z)- 9,12-oktadekanoat
7	19,54	Metil 9-Oktadecenoat
8	19,59	Metil 10-Oktadesenoat
9	19,78	Metil oktadekanoat
10	20,08	Etil linoleat
11	20,15 & 20,19	Etil- (Z)-9-Oktadesenoat
12	20,37	Etil Oktadesenoat
13	20,60	Neophytadiene

5.3. Analisis Ekstrak Metanol

Fraksi yang menarik dan ingin diisolasi serta dianalisis dari ekstrak metanol dalam penelitian ini adalah fraksi yang menunjukkan fluoresensi biru yang intensif jika pelat KLT disinari dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Fraksi yang memenuhi hal tersebut adalah fraksi CBIII_{5.1}. dan fraksi CBIII_{5.2}.

Fraksi CBIII_{5.1}. yang diperoleh berupa kristal putih sebanyak 5 mg. Untuk menguji kemurnian kristal tersebut dilakukan dengan metode KLT menggunakan beberapa macam eluen. Hasil uji kemurnian tersebut ditampilkan pada tabel 11 berikut ini.

Tabel 11. Uji kemurnian senyawa fraksi CBIII_{5.1}. dengan KLT

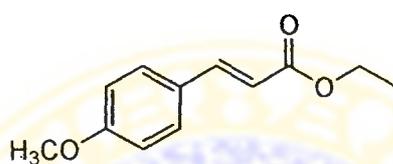
No	Eluen	Harga R _f
1	n-Heksana:aseton = 4:1	0,33
2	n-Heksana:Etil asetat = 4:1	0,38
3	n-Heksana:kloroform = 1:4	0,22

Spektrum NMR (¹H-, ¹³C- dan DEPT 135) ditampilkan pada lampiran 10. Spektrum ¹H-NMR memperlihatkan adanya tiga macam signal proton untuk gugus metil pada δ 1,35 ppm (t, 3H), metil karbonil (CH₃-CO-) pada δ 2,50 ppm (s, 3H), dan gugus metoksi (-OCH₃) pada δ 3,85 ppm (s, 3H). Tiga buah proton metilen juga teramati. Dua signal pada δ 3,75 ppm (m, 4H) merupakan signal yang mengindikasikan dua buah gugus metilen yang terikat pada satu gugus metin (-CH₂-CH-CH₂-), sedang satu gugus metilen yang terikat diantara satu ikatan rangkap C=C dan gugus metil muncul pada δ 3,95 ppm (m, 2H). Signal proton gugus metilen terkonjugasi muncul sebagai signal pada δ 6,27 – 8,30 ppm (dd / signal kompleks, 12H).

Spektrum ¹³C-NMR dan DEPT 135 menunjukkan adanya 3 buah karbon metil pada δ 14,1; 21,0; dan 50,9 ppm, tiga buah karbon metilen pada δ 22,5; 31,6, dan 60,4 ppm dan juga memperlihatkan satu karbon metin pada δ 55,4 ppm. Sebelas ikatan rangkap terkonjugasi yang berupa atom karbon metin teramati sebagai signal pada δ 111,8; 114,3; 115,6; 122,1; 124,6; 125,7; 126,0;

Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT 135 menyatakan adanya dua buah karbon metil pada δ 14,1 dan 55,3 ppm, satu buah karbon metilen pada δ 60,3. Di samping itu lima buah signal karbon metin dan satu buah atom karbon kuartener pada δ 114,9 – 129,7 ppm menunjukkan adanya sistem aromatis. Sebuah signal pada δ 172,4 ppm yang juga teramati, yang menunjukkan suatu karbon kuartener dari suatu atom karbon karbonil ester.

Data ini juga dibandingkan dengan data dari penelitian terdahulu (Tanjung, 1997). Berdasarkan data yang ada dapat disimpulkan bahwa senyawa fraksi CBIII_{5.2} merupakan Etil-p-Metoksi Sinamat (EPMS). Yang mempunyai struktur molekul seperti di bawah ini.



Struktur molekul Etil-p-Metoksi Sinamat

Senyawa ini dikenal sebagai konstituen yang terdapat pada spesies zingiberaceae, seperti *Curcuma galangal*, *C. zedoaria*, *Kaempferia galangal* dan *K. pandurata* (Panji, et al., 1993).

5.5. Uji bioaktivitas menggunakan *Artemia salina* Leach

Fraksi yang digunakan untuk uji bioaktivitas dengan metode BST adalah fraksi A.IV.2.4 dan fraksi A.V.3. Larutan uji yang digunakan memiliki konsentrasi 125, 100, 50, 10, dan 1 ppm. Selain itu juga dilakukan uji terhadap kontrol negatif. Larva *artemia salina* Leach masing-masing sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi ekstrak fraksi uji dengan konsentrasi tersebut di atas. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada temperatur ruang. Selanjutnya dihitung dan dicatat banyaknya larva *Artemia salina* Leach yang mati. Hasil uji bioaktivitas fraksi A.IV.2.4 menggunakan uji BST ditampilkan pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil Uji BST fraksi A.IV.2.4

Konsentrasi sampel (ppm)	Ulangan	Jumlah Total Larva Udang	Jumlah Larva Udang Mati
125	1	10	2
	2	10	3
	3	10	0
100	1	10	2
	2	10	0
	3	10	0
50	1	10	1
	2	10	0
	3	10	0
10	1	10	2
	2	10	0
	3	10	0
1	1	10	0
	2	10	0
	3	10	1

Untuk menghitung harga LC_{50} digunakan persen probit dengan menggunakan program SPSS 10.0 for window. Dari perhitungan tersebut diperoleh harga LC_{50} sebesar 295,2 ppm.

Prinsip dasar penggunaan *Artemia* dalam uji bioaktivitas adalah bahwa senyawa aktif bersifat toksik dalam sel hidup pada konsentrasi tinggi dan akan berkhasiat sebagai obat jika dosisnya sesuai. Uji bioaktivitas menggunakan *Artemia* ini merupakan uji pendahuluan sebelum digunakan uji bioaktivitas yang lebih spesifik. Sedang uji bioaktivitas fraksi a.V.3 tidak memberikan kematian terhadap larva udang yang diujikan. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi A.V.3 tidak mempunyai sifat bioaktif.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Seyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak n-heksana pada lumut *Plagiochila sandei* Dozy adalah spatulenol, Metil dodekanoat, Metil tetradekanoat, Metil heksadodekanoat, Metil heksadekanat, Metil heptadekanat, Metil 10-oktadecenoat, Metil-13-oktadesenoat, Metil-9-oktadekanat, Metil oktadecenoat, Etil oktadekanat, Metil docosanoat, Metil tetracosanoat, (Z)-9-Asam oktadesenoat.
2. Senyawa yang terdapat pada ekstrak kloroform pada lumut *Plagiochila sandei* Dozy adalah β -Sitosterol, ester asam lemak yang meliputi: Metilheksadekanat, Etil heksadekanat, Metil-(Z,Z)- 9,12-oktadecenoat, Metil 9-Oktadecenoat, Metil 10-Oktadesenoat, Metil oktadekanat, Etil linoleat, Etil- (Z)-9-Oktadesenoat, Etil Oktadesenoat, serta beberapa seskuiterpen yaitu: 7-Dihydroxanthotoxin, Dehydroaromadendrene, 8,9-Dehydro-neoisolongifolene, dan Neophytadiene.
3. Senyawa yang berhasil diisolasi dari ekstrak methanol adalah suatu turunan gliserol dan Etil-p-Metoksi Sinamat.
4. Fraksi A.IV.2.4. dari ekstrak n-heksana memiliki LC_{50} terhadap *Artemia salina* Leach pada konsentrasi 295,2 ppm.

5.2. Saran-saran

Berdasarkan penelitian diajukan saran sebagai berikut:

1. Penentuan struktur molekul dari fraksi-fraksi yang belum selesai dimurnikan.
2. Uji bioaktivitas antikanker menggunakan sel mieloma terhadap senyawa murni hasil isolasi dari lumut *Plagiochila sandei* Dozy.

DAFTAR PUSTAKA

Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., 1978, *Plagiochilide and Plagiochiline A, secoaromadendrane-Type Sesquiterpenes from the Moss Plagiochila yokogurensis (Plagiochilaceae)*, Tetrahedron Lett., 18, 1553-6.

Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., Kubo, I., Nakanishi, K., 1980, *Insect Antifeedant Secoaromadendrane-Type Sesquiterpene from Plagiochila species*, Phytochemistry, 19(10), 2147-54.

Asakawa, Y., Takikawa, K., Toyota, M., Takemoto, T., 1982, *Phytochemistry*, 21, 2481.

Breitmaier, E., 1993, *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry A Practical Guide*, John Willey and Sons, Ltd., England.

Connolly, J.D., Rycroft, D.S., Srivastava, D.L., 1999, *Aromatic Compounds from The Liverwort Plagiochila spinulosa*, Phytochemistry, 50, 1159-65.

Fox, M.A., Whitesell, J.K., 1997, *Organic Chemistry*, 2nd.Ed., Jones and Bartlett Publishers, Boston, 23(32) – 23(41)

Matsuo, A., Atsumi, K., Nadaya, K., Nakayama, M., Hayashi, S., 1981, *Carbon-13 NMR Shifts of Ovalifoliene and Related Compounds with The 2,3-secoalloaromadendrene Skeleton: Structure of (+)-9 α -acetoxyovalifoliene, a Plant Growth Inhibitor*, Phytochemistry, 20(5), 1065-68.

Matsuo, A., Nadaya, K., Nakayama, M., Hayashi, S., 1981, *Plant Growth Inhibitor Isolated from The Liverwort Plagiochila ovalifolia*, Nippon Kagaku Kaishi, 5, 665-70.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982, *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*, Planta Medica, 45, 31-34.

Mues, R., Zinsmeister, H.D., 1975, *Lucenins in The Liverwort Plagiochila asplenoides*, Phytochemistry, 18(9), 1568-9.

Mues, R., 1990, *The Significance of Flavonoids for The Classification of Bryophyte Taxa at Different Taxonomic Ranks, dalam Bryophytes Their Chemistry and Chemical taxonomy: Proceeding of the Phytochemical Society of Europe*, Clarendon Press, Oxford, 421-30.

Panji, C., Grim, C., Wrang, V., Witte, L., Proksch, P., 1993, *Phytochemistry*, 34, 12, 415-419.

Patrick, G., 2002, *Medicinal Chemistry*, 1st.Ed., Viva Books Private Limited, New Delhi, 24-34.

Tanjung, M., 1994, *Isolasi Beberapa Steroid dar Cryptocarya cariefolia*, Laporan Magang Penelitian, ITB, Bandung.

Tanjung, M., 1997, *Isolasi dan Rekayasa Senyawa Turunan Sinamat Dari Kaempferia Galanga L sebagai Tabir Surya*, Laporan Penelitian, Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.

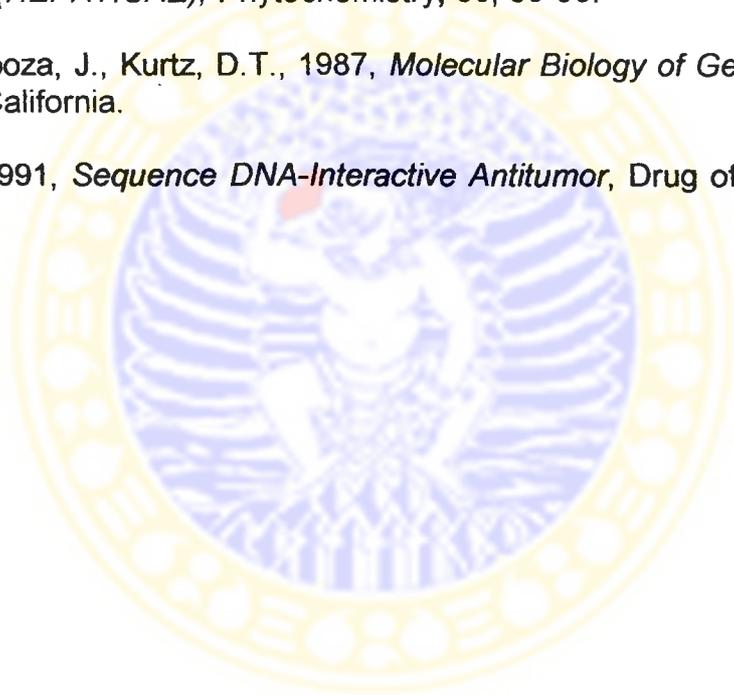
Tjitrosoepomo, G., 1994, *taksonomi Tumbuhan*, Bhatara, Yogyakarta, 164-205.

Toyota, M., Tanimura, K., Asakawa, Y., 1998, *Cytotoxic 2,3-Secoaromadendrane-Type Sesquiterpenoids from The Liverworts Plagiochila ovalifolia*, *Planta Medica*, 64(5), 462-4.

Valcic, S., Zapp, J., Becker, H., 1996, *Plagiochilines and Other sesquiterpenoids from Plagiochila (HEPATICAE)*, *Phytochemistry*, 56, 89-99.

Watson, J.D., Tooza, J., Kurtz, D.T., 1987, *Molecular Biology of Gen.*, Benjamin Cumming, Co., California.

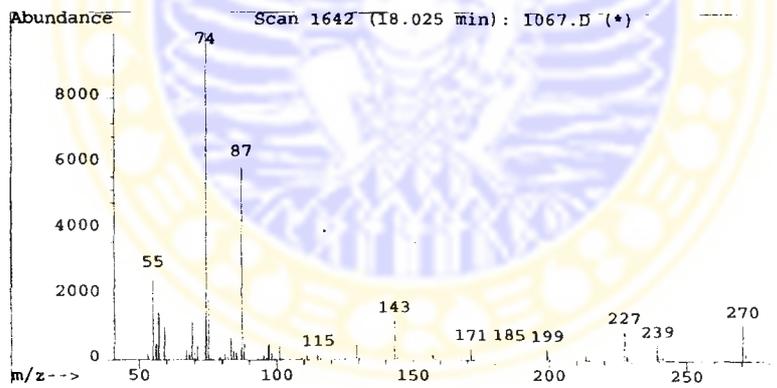
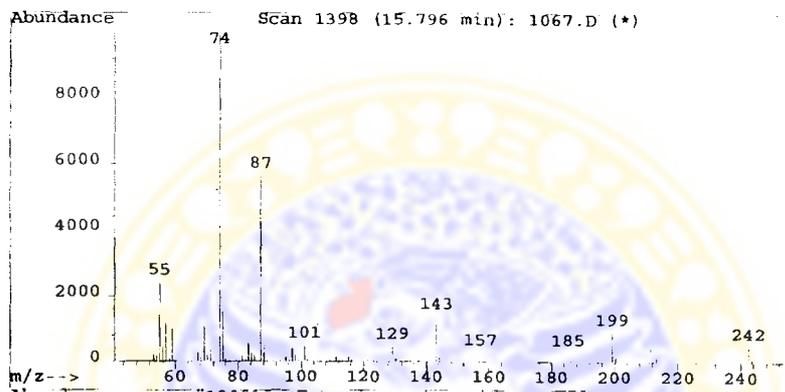
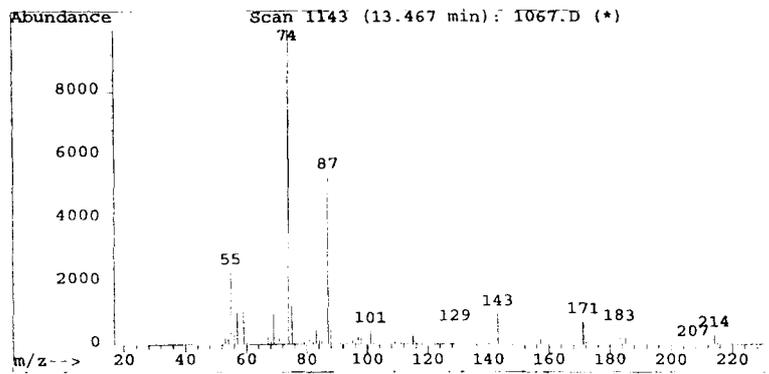
Wierenga, W., 1991, *Sequence DNA-Interactive Antitumor*, *Drug of The Future*, 16(8), 741-50.

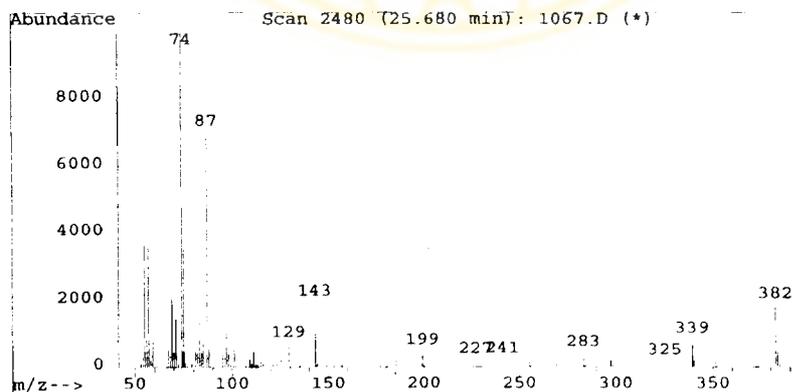
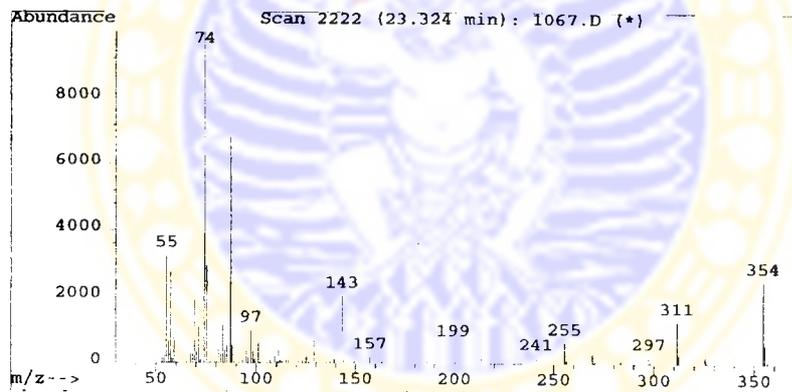
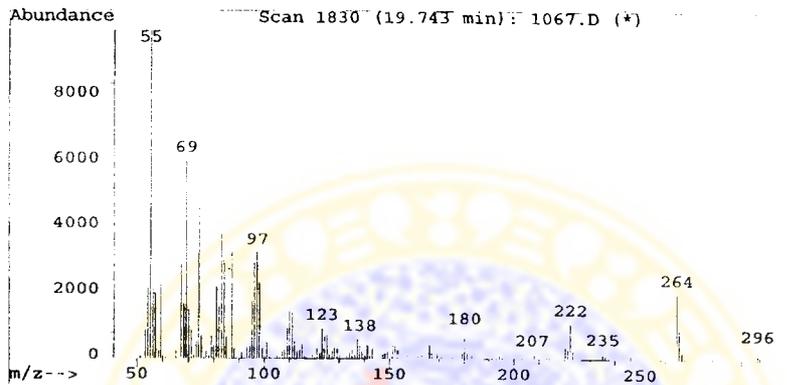
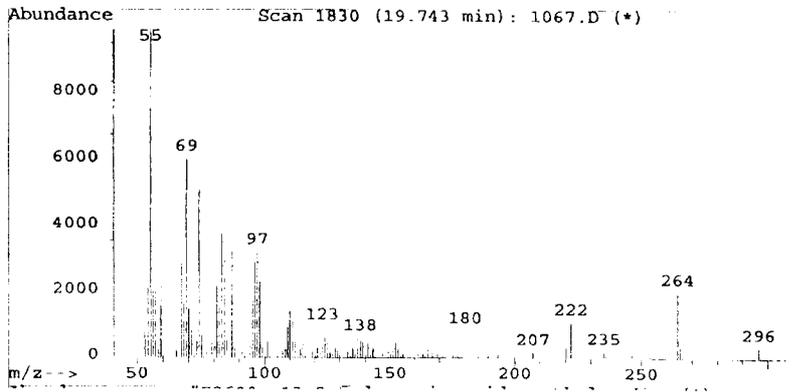


Lampiran 1:
Foto morfologi tanaman lumut *Plagiochila sandei* Dozy.

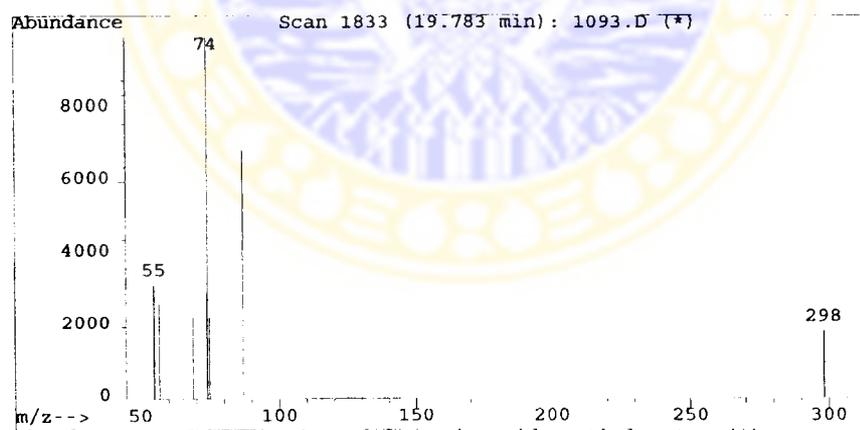
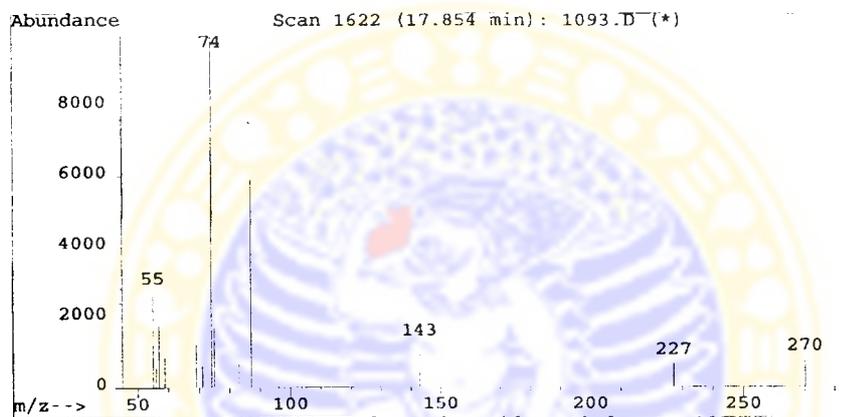
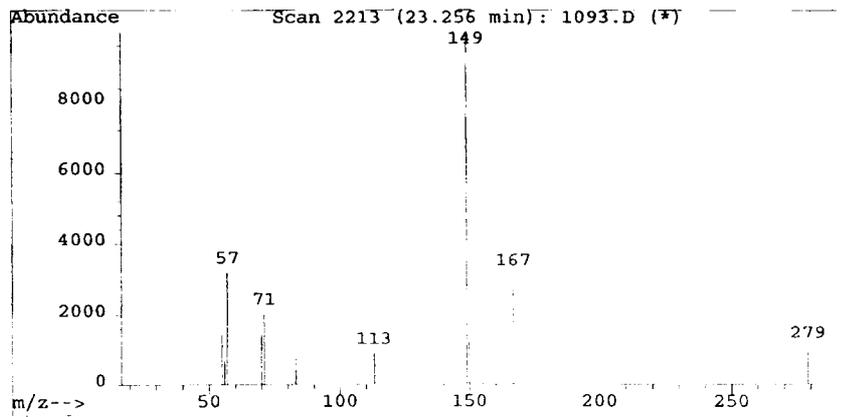


**Lampiran 2 :
Spektrum massa komponen fraksi AI ekstrak n-heksana (fraksi no 1 – 13)**

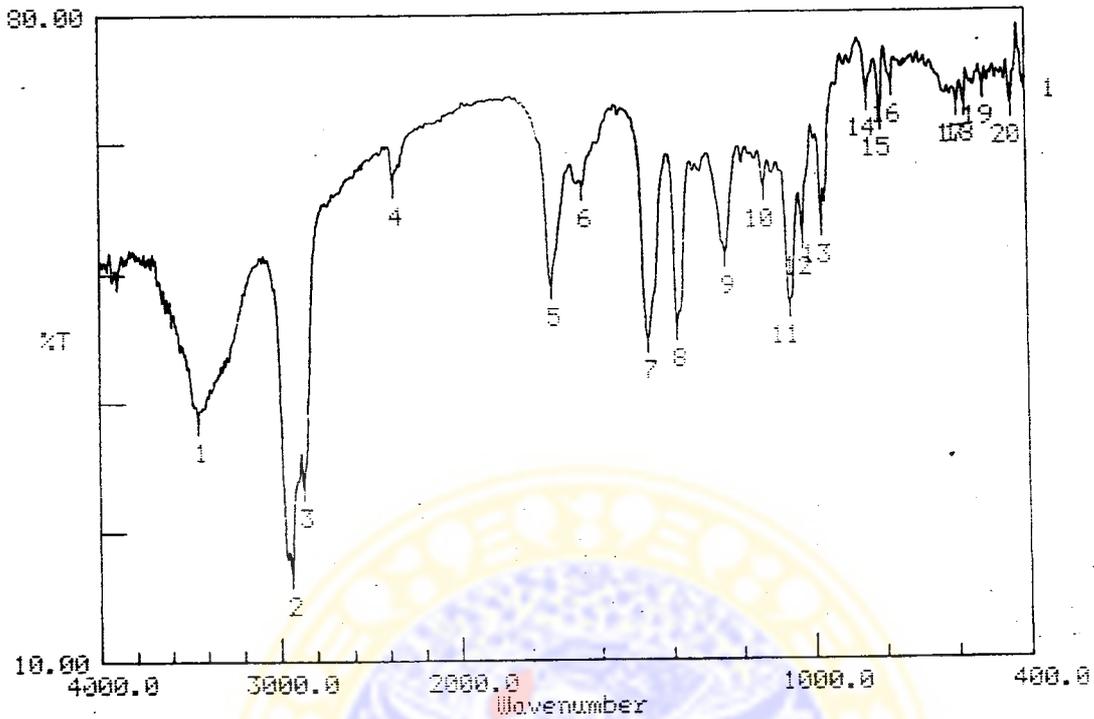




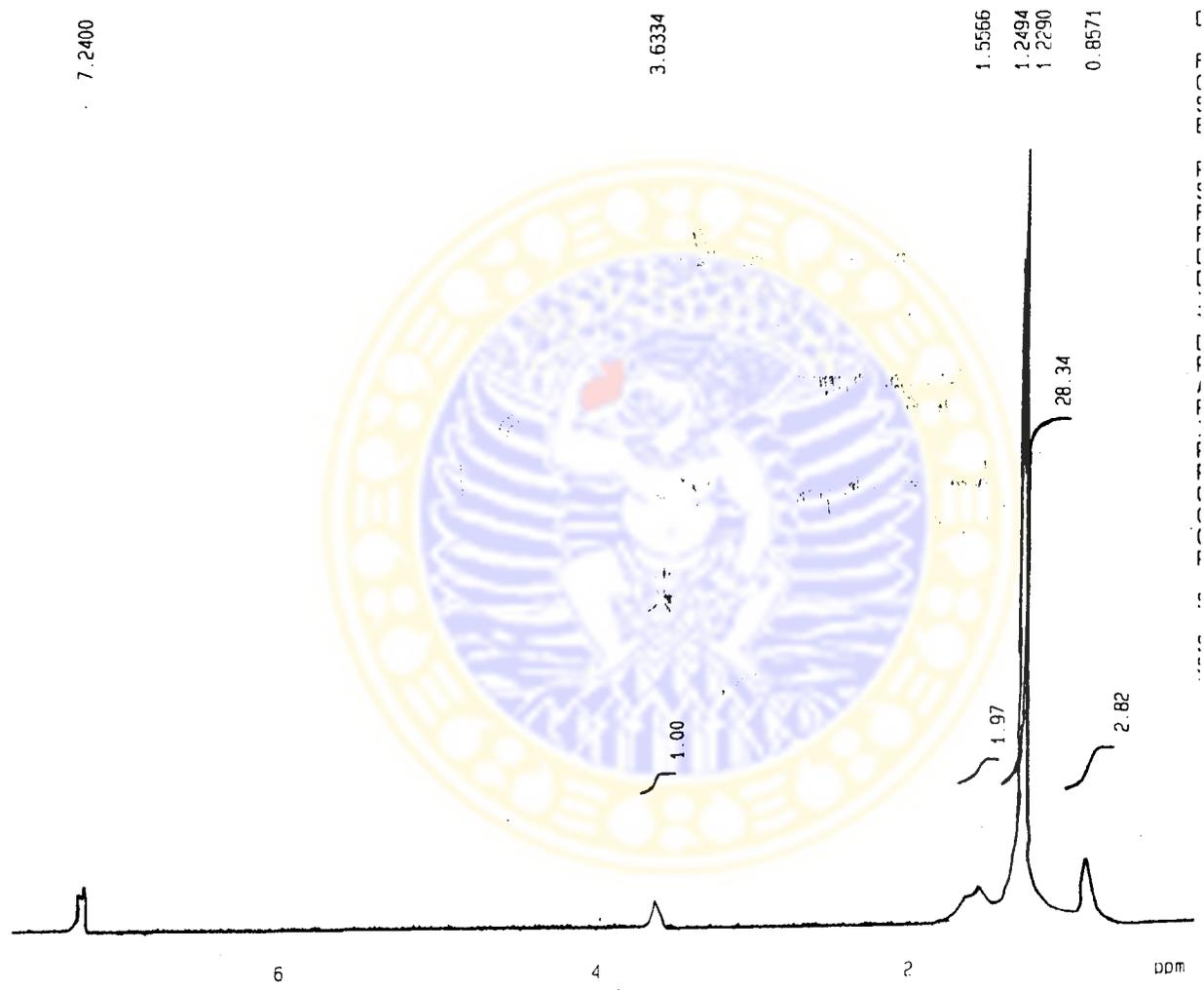
Lampiran 3:
Spektrum massa hasil metilasi komponen fraksi AI ekstrak n-heksana (fraksi no 12 – 16)



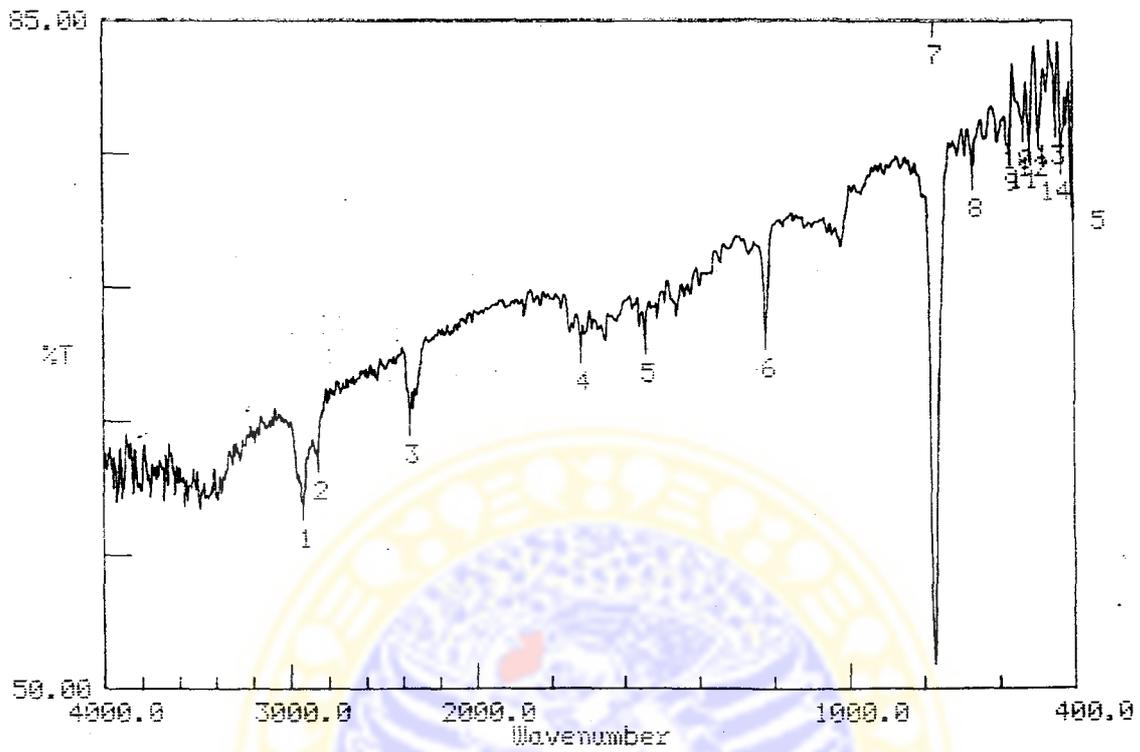
Lampiran 4 :
Spektrum IR kristal hasil isolasi fraksi A.II_{2.1} dari ekstrak n-heksana (Spatuleno!)



Lampiran 5:
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ kristal hasil isolasi fraksi A.II_{2.1} dari ekstrak n-heksana (Spatulenol)

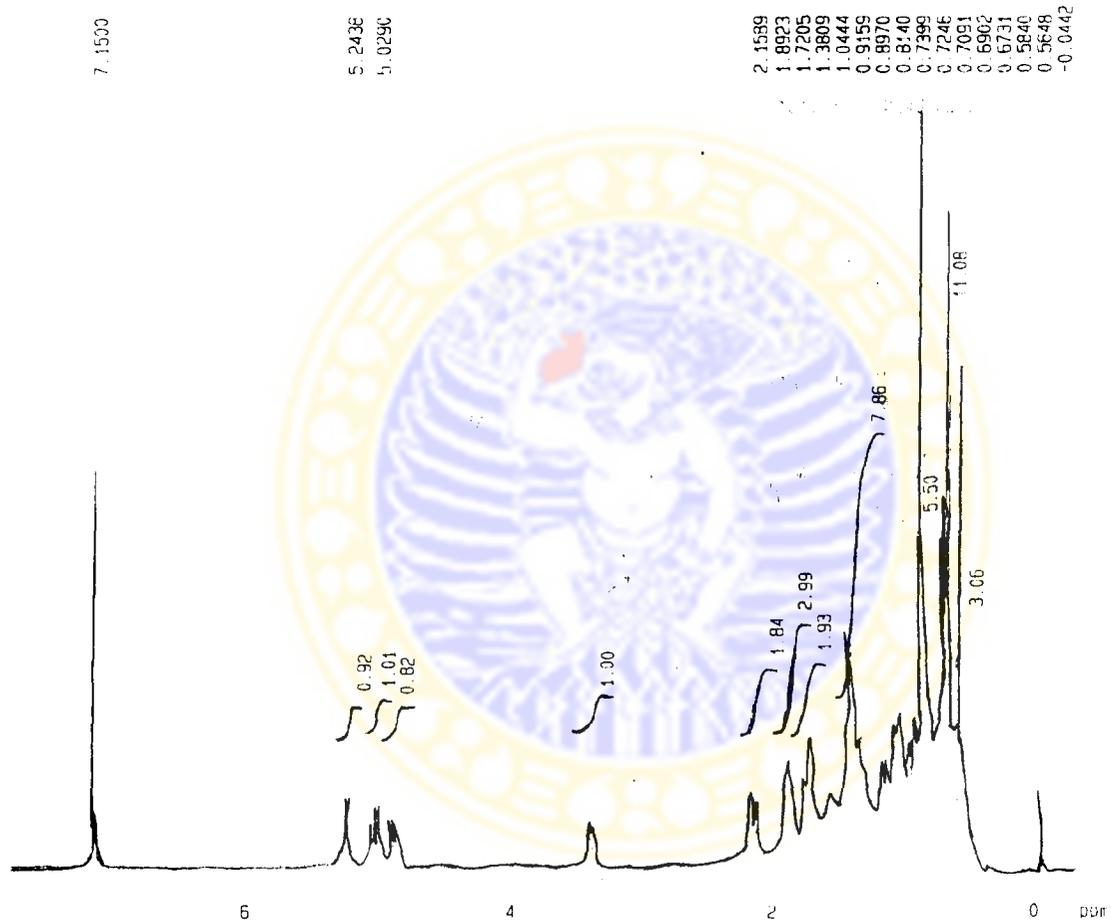


Lampiran 6:
Spektrum IR kristal hasil isolasi fraksi A.V.₃ dari ekstrak n-heksana

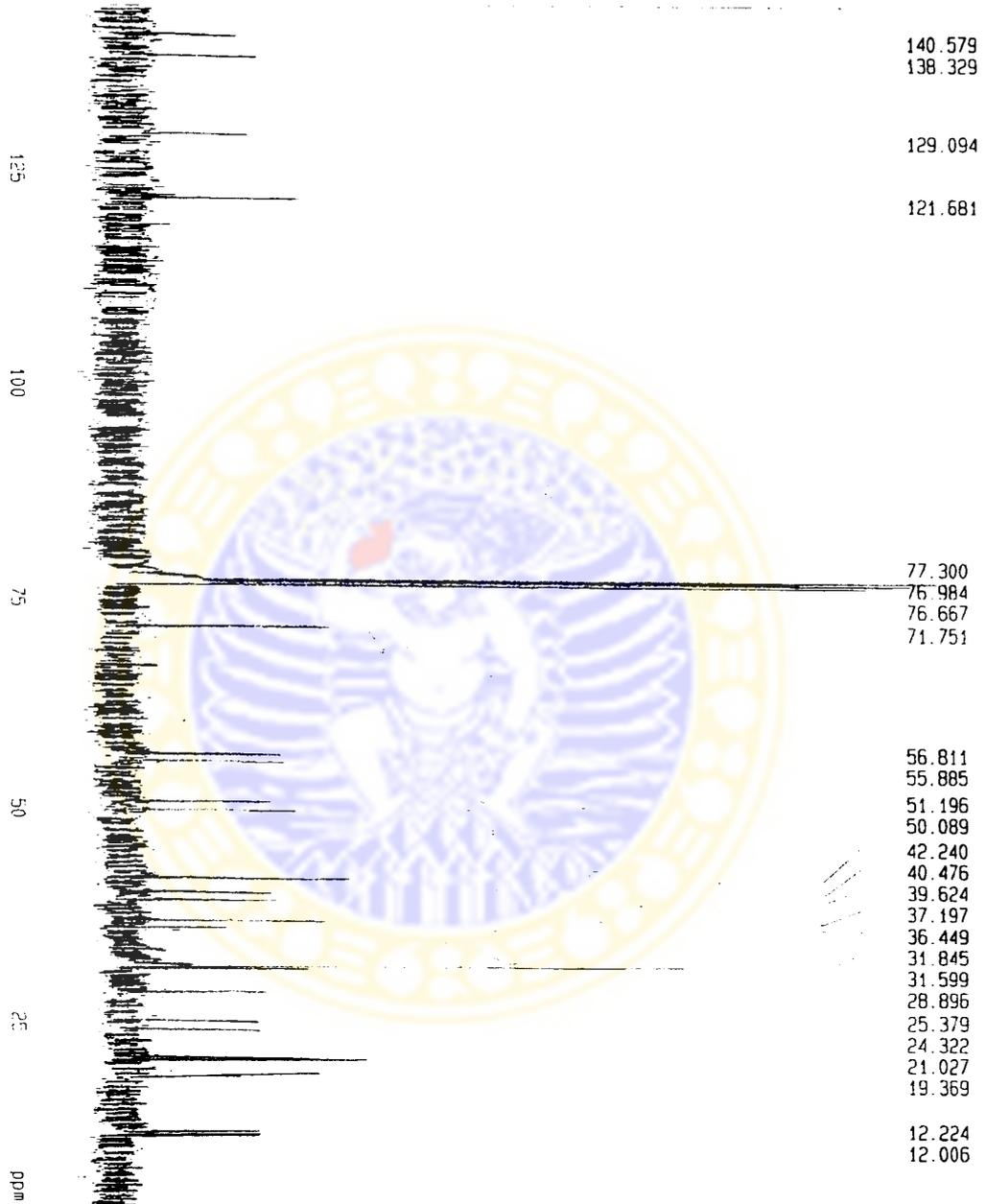


Lampiran 7:
Spektrum NMR kristal fraksi A.V.₃ dari ekstrak n-heksana

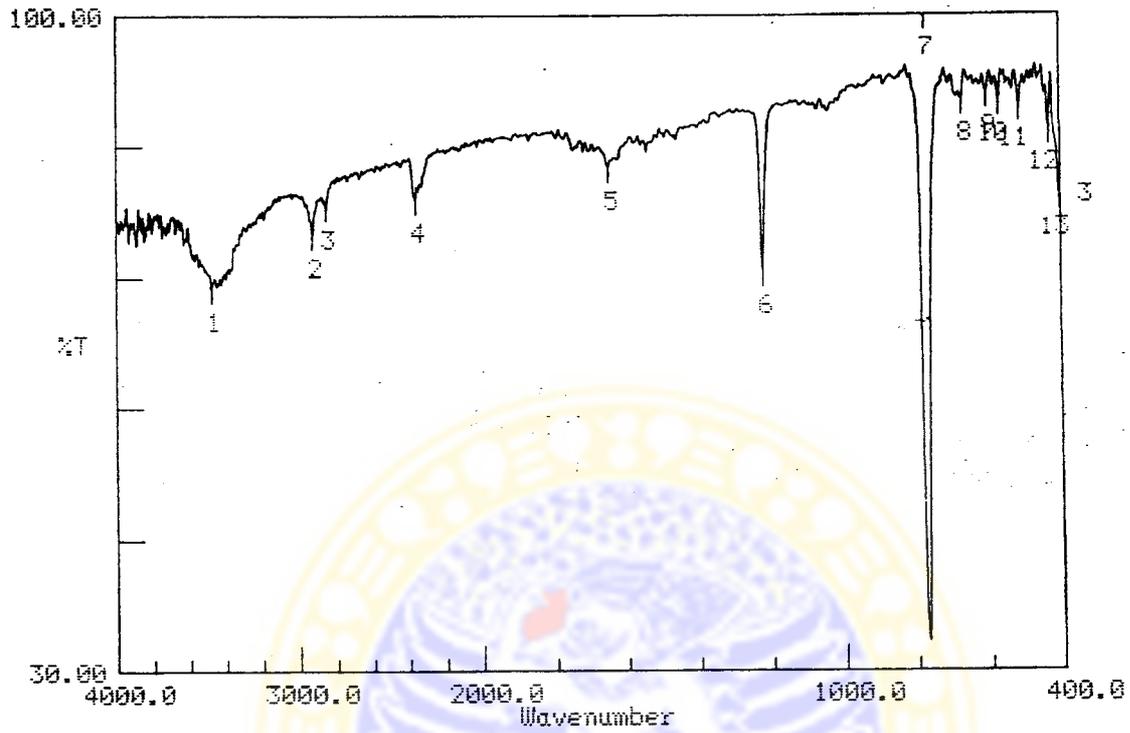
Spektrum ¹H-NMR



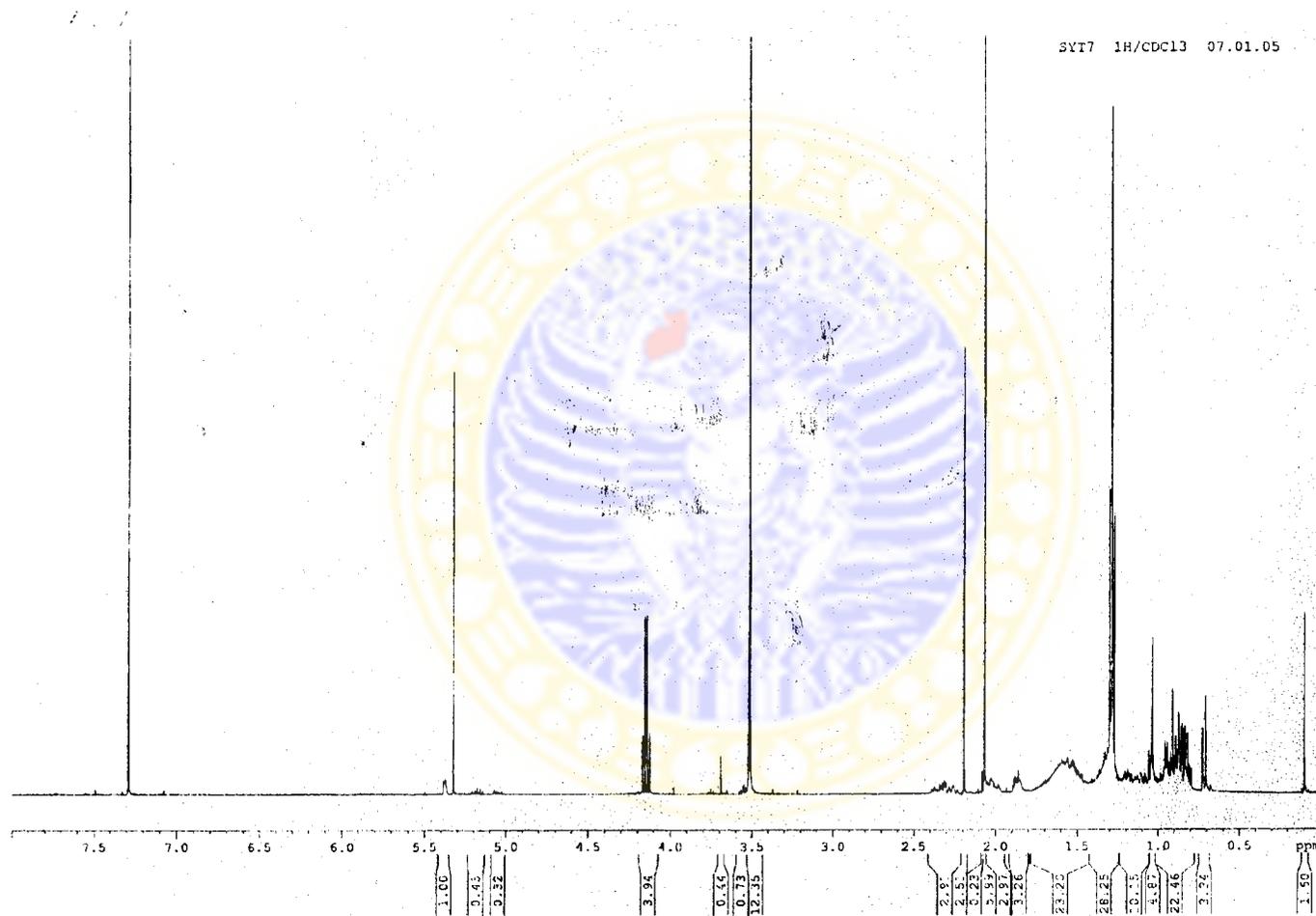
Spektrum ¹³C-NMR



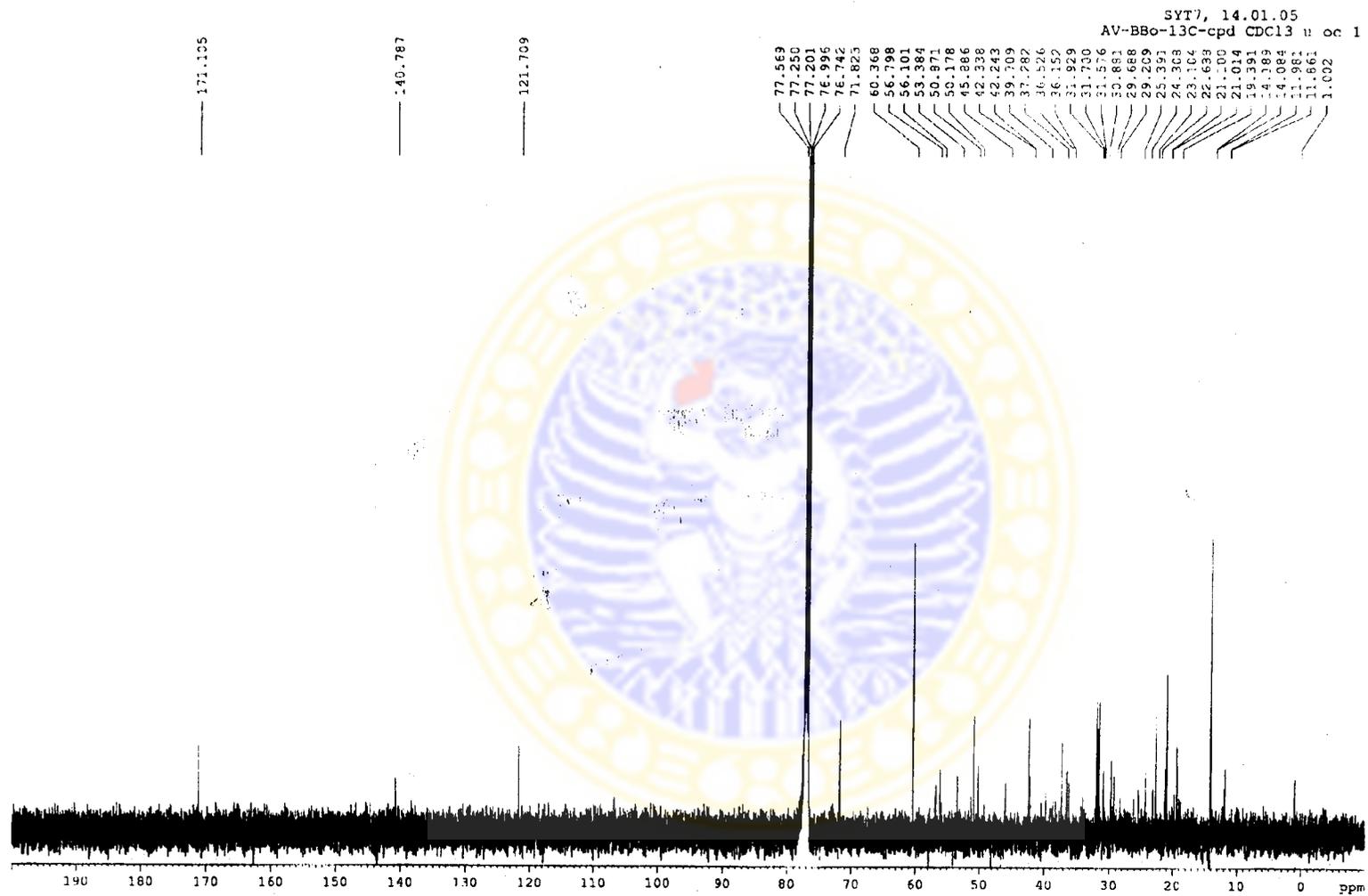
Lampiran 8:
Spektrum IR kristal hasil isolasi fraksi B.I._{4.4} dari ekstrak kloroform (β -Sitosterol)



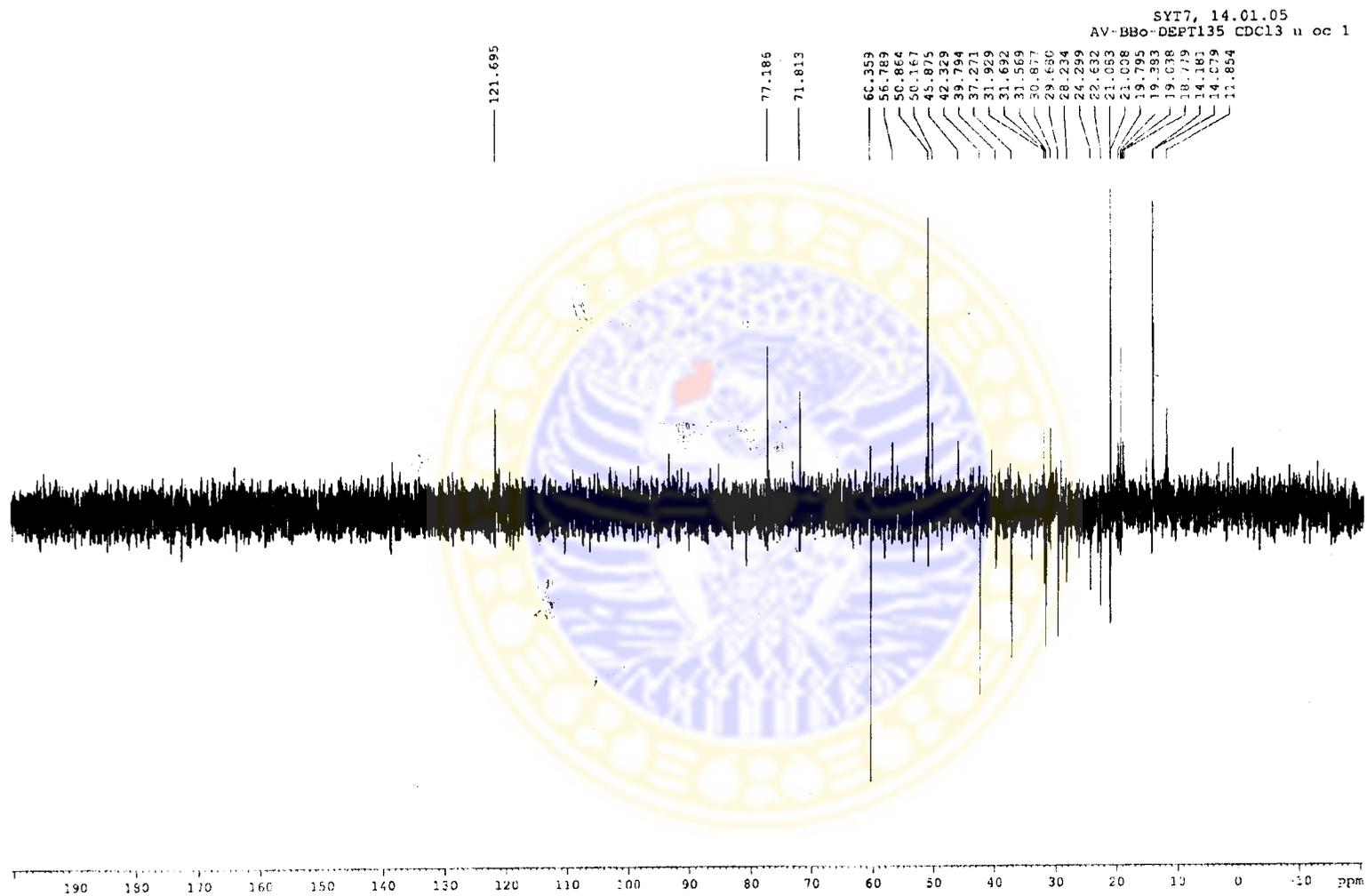
Lampiran 9:
Spektrum NMR kristal hasil isolasi fraksi B.I.4.4 dari ekstrak kloroform (β -Sitosterol)
Spektrum $^1\text{H-NMR}$



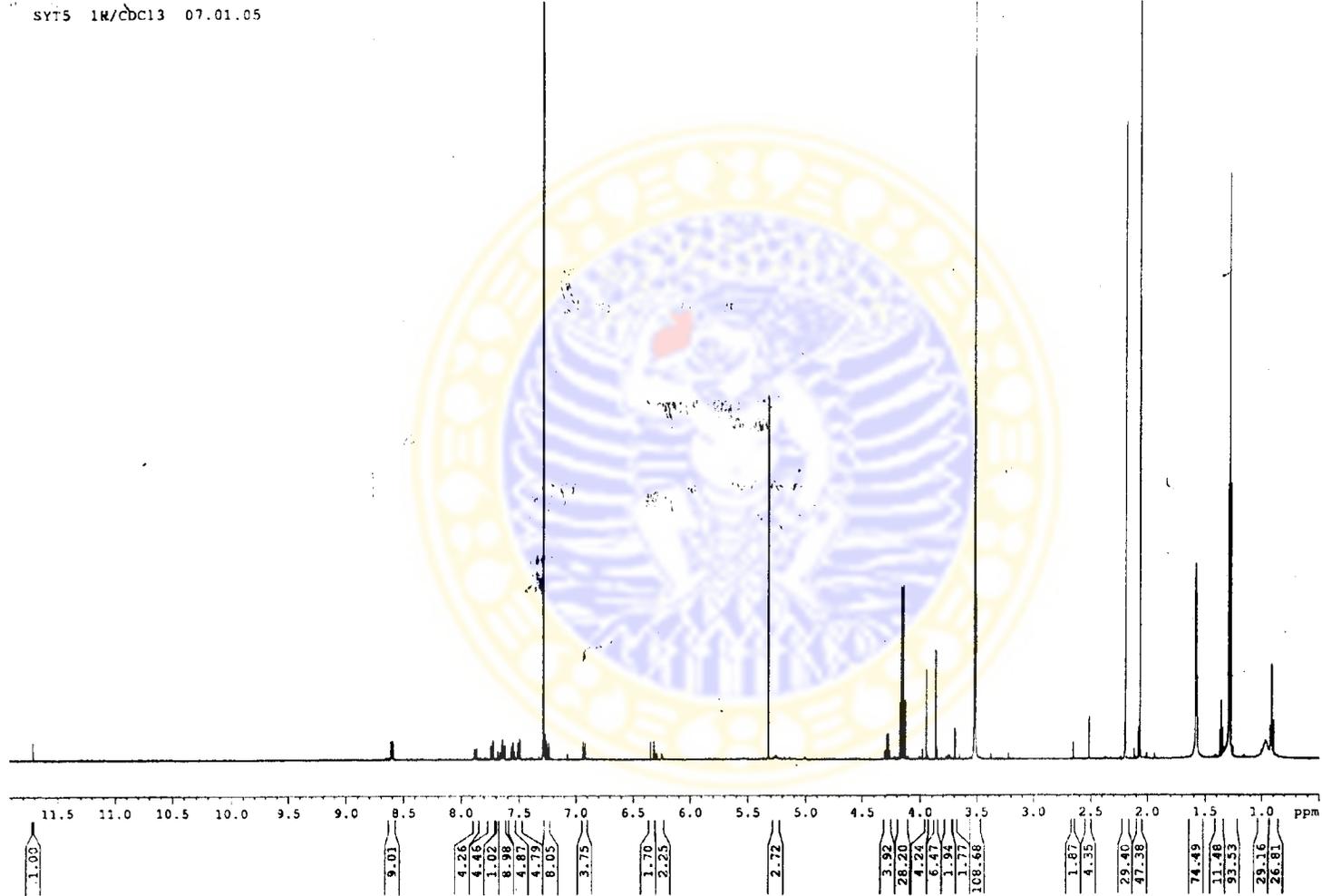
Spektrum ¹³C-NMR



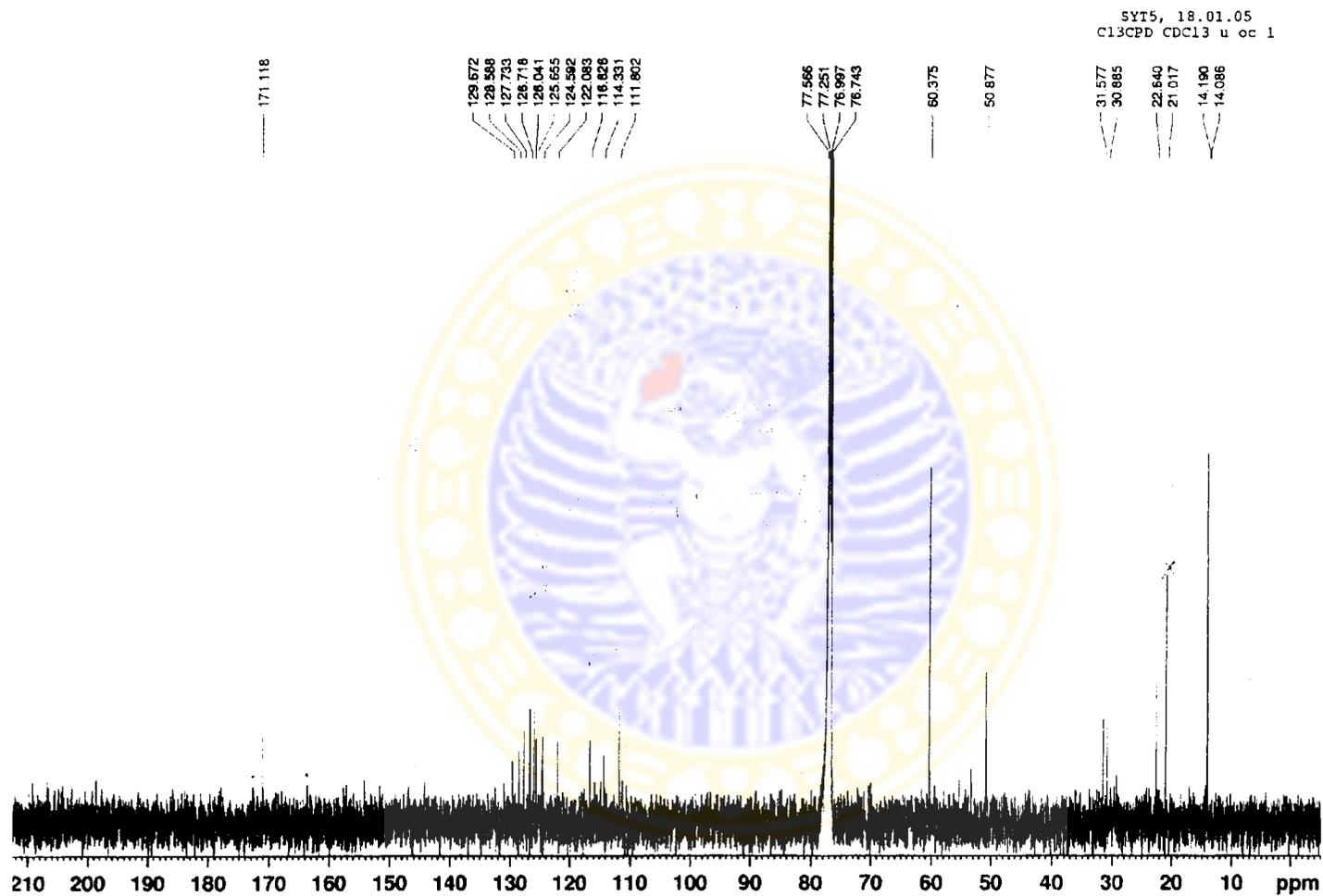
Spektrum DEPT 135



Lampiran 10:
Spektrum NMR kristal hasil isolasi fraksi CB.III.5.1. dari ekstrak metanol (derivat gliserol)
Spektrum ¹H-NMR

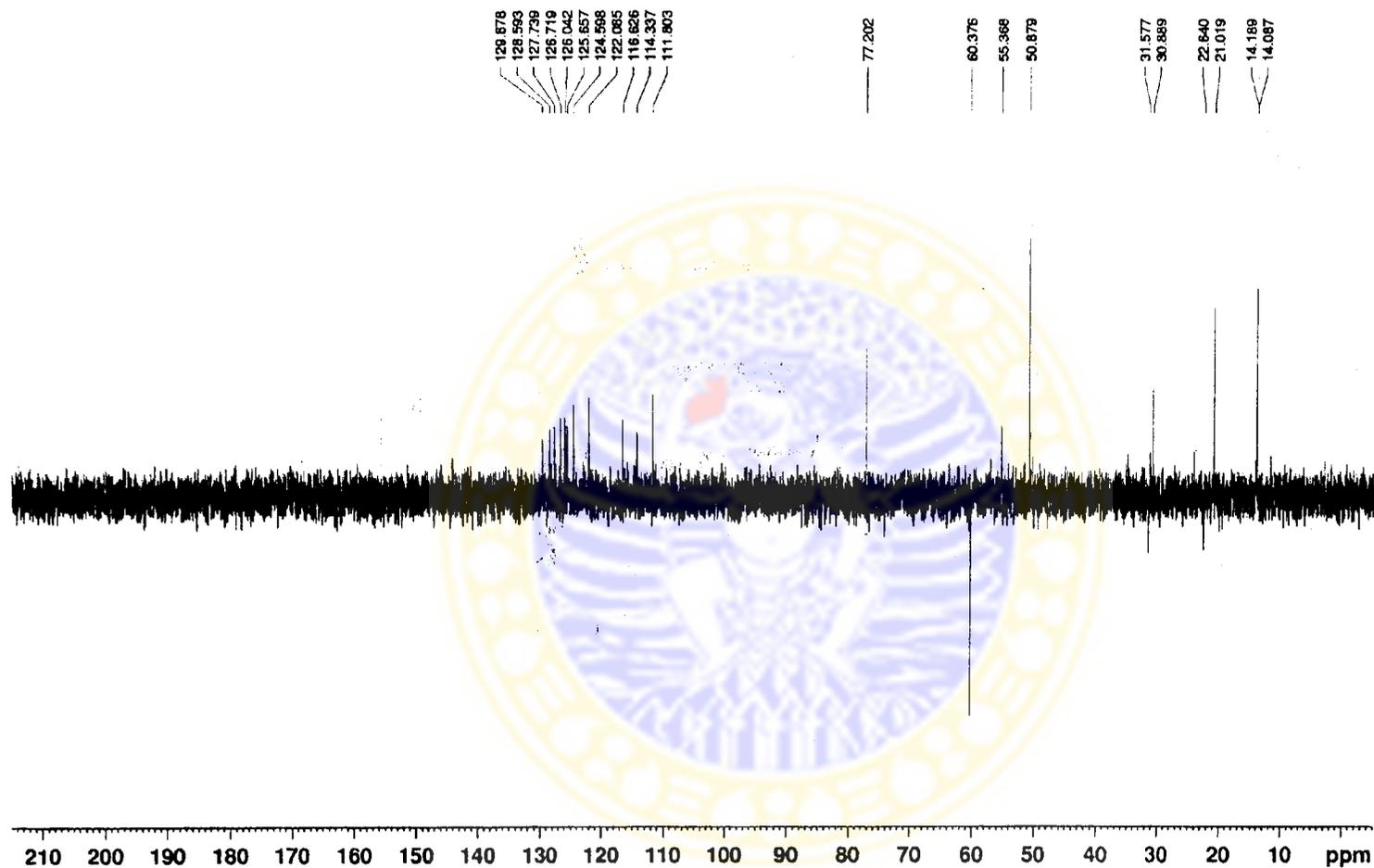


Spektrum ^{13}C -NMR

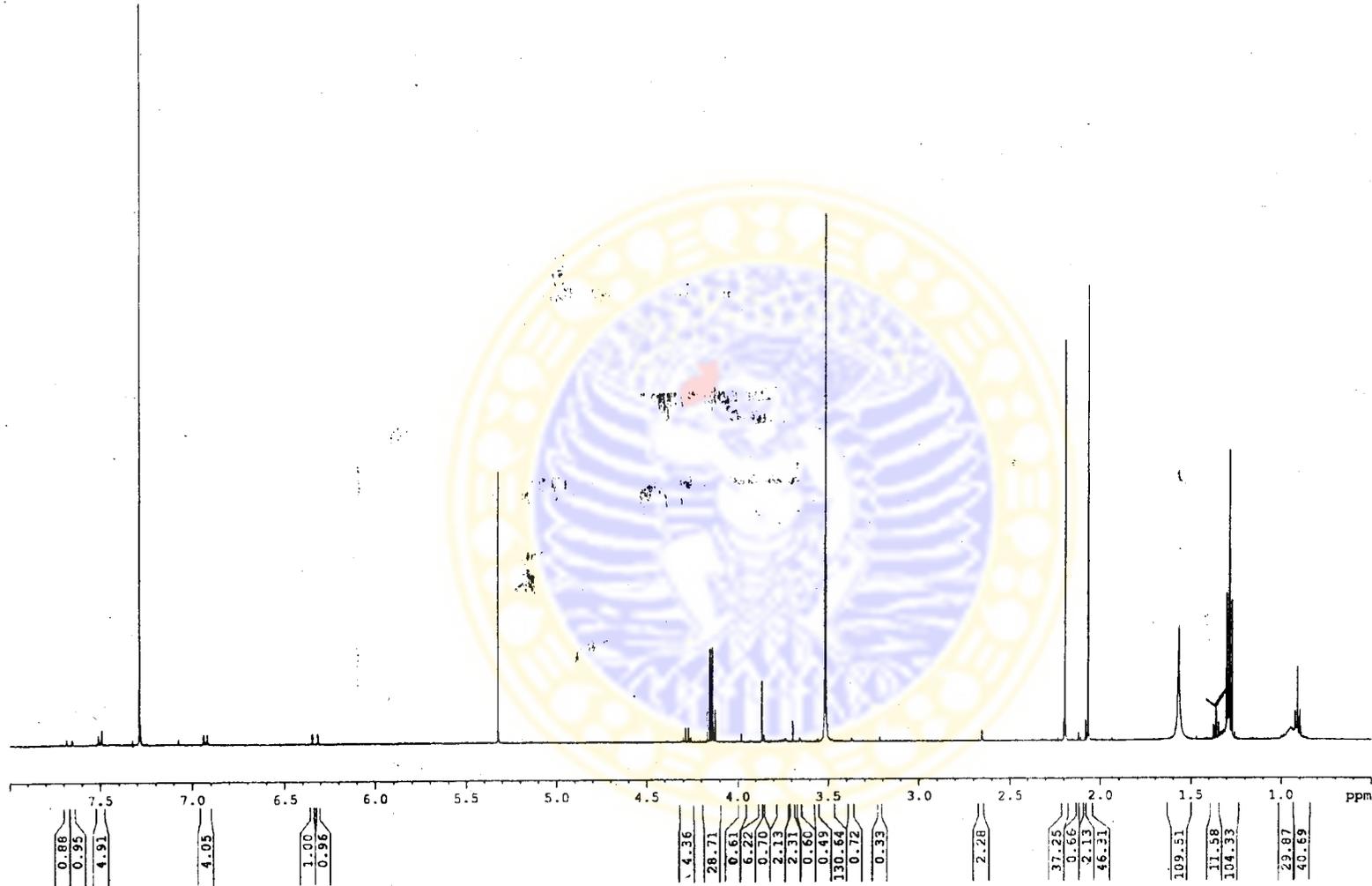


Spektrum DEPT 135

SYT5, 18.01.05
C13DEPT135 CDC13 v oc 1

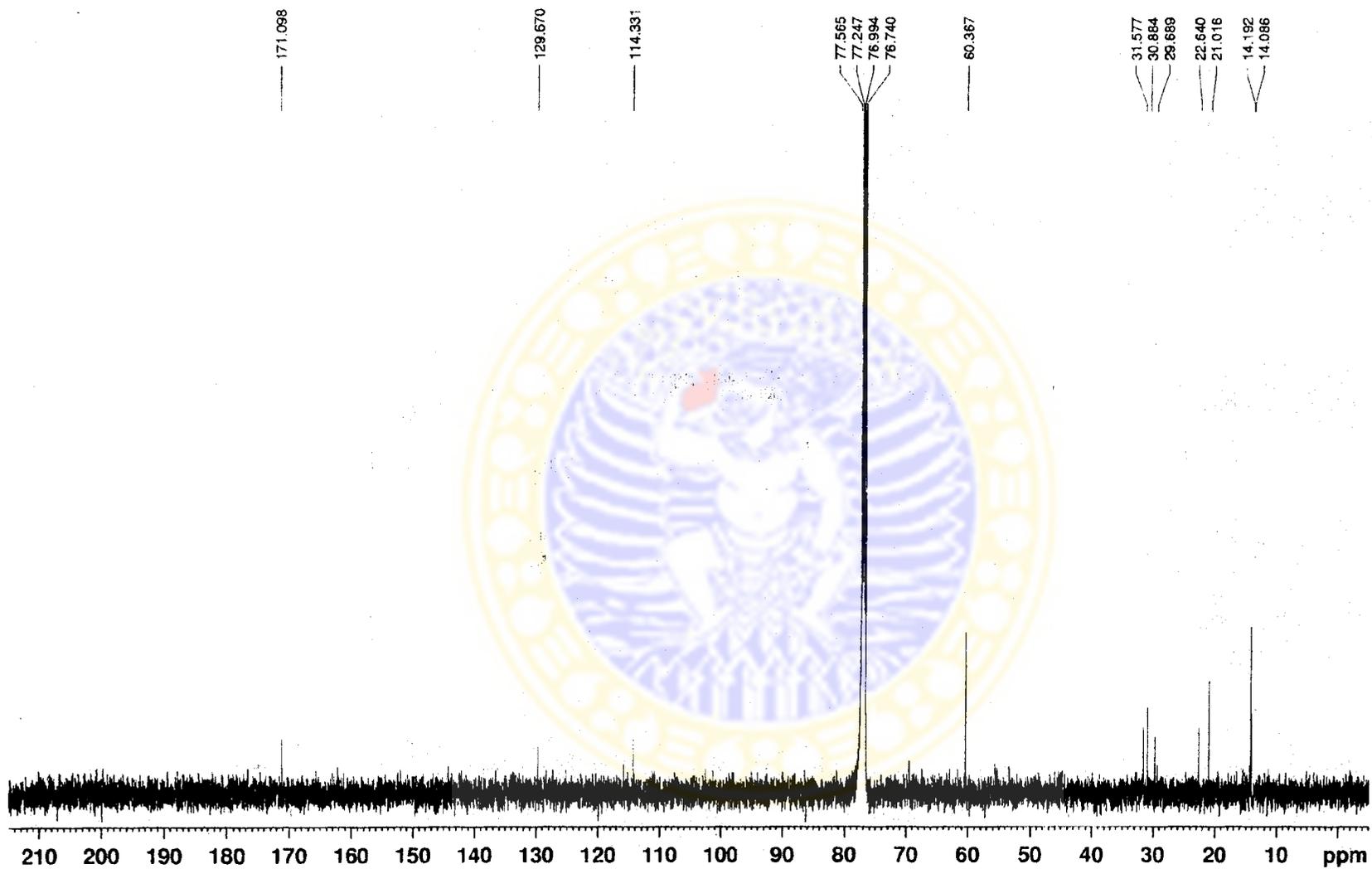


Lampiran 11:
Spektrum NMR kristal hasil isolasi fraksi CB.III.5.2 dari ekstrak metanol (EPMS)
Spektrum ¹H-NMR



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$



Spektrum DEPT 135

