

**IDENTIFIKASI STRUKTUR METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI NON AKTIF TERHADAP *Artemia salina* LEACH
DARI SPONS *Clathria reinwardtii***

*STRUCTURAL IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITE
OF NON ACTIVE FRACTION ON *Artemia salina* Leach
FROM *Clathria reinwardtii* SPONGE*

ROSMAWATY



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2008

**IDENTIFIKASI STRUKTUR METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI NON AKTIF TERHADAP *Artemia salina* LEACH
DARI SPONS *Clathria reinwardtii***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Kimia

Disusun dan diajukan oleh

ROSMAWATY

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2008

TESIS**IDENTIFIKASI STRUKTUR METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI NON AKTIF TERHADAP *Artemia salina* LEACH
DARI SPONS *Clathria reinwardtii***

Disusun dan diajukan oleh

ROSMAWATY

Nomor Pokok P1100205002

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 29 Agustus 2008

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,

Prof. Dr. Nunuk Hariani S., MS

Ketua

Ketua Program Studi
Ilmu Kimia,

Dr. Paulina Taba, M.Phil

Prof. Dr. Alfian Noor, M.Sc

Anggota

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin.

Prof. Dr. dr. Razak Thaha, M.Sc

Niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat

Q.S. Al-Mujaadilah/58:11

Karya kecil ini ku persembahkan kepada:

Ayahanda Tercinta (H. Djuhandi)

Ibunda Tersayang (Hi. Hindun
Tuasamu)

Kakek Tercinta (Alm. H. Ilyas
Tuasamu)

Nenek Tersayang (Aisyah Marasabessy)

Seluruh Keluarga dan Sahabah-sahabat Terbaikku

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat **Allah SWT** atas pertolongan dan izin-Nya, penelitian dan penulisan tesis ini dapat selesai. Shalawat dan salam semoga dilimpahkan kepada **Nabi Muhammad SAW**, keluarga, sahabat dan orang-orang yang senantiasa berada di Sunnahnya.

Sembah sujud dan terima kasih yang tiada batas kepada kedua orang tua **Ayahanda tercinta H. Djuhandi** dan **Ibunda tersayang Hj. Hindun Tuasamu** atas kasih sayang, bimbingan, pengertian, dan setiap untaian doa tulus yang dipanjatkan serta tetesan keringat yang dikururkan dengan ikhlas buat penulis. Hanya **Allah SWT** yang dapat membalas keduanya. Semoga limpahan rahmat dan kemuliaan dari **Allah SWT** senantiasa tercurah serta kebahagiaan di dunia dan akhirat diperoleh keduanya. Terima kasih dan doa yang sama penulis ucapkan kepada **Nenek Aisyah Marasabessy, Kakek Alm. H. Ilyas Tuasamu**, dan **seluruh keluargaku tercinta**.

Penulis menyadari bahwa tesis ini dapat terwujud karena adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini, penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu **Prof. Dr. Nunuk Hariani S., MS** dan Bapak

Prof. Dr. Afian Noor, M.Sc sebagai ketua dan anggota komisi penasihat atas waktu yang telah diluangkan, curahan pikiran, doa yang tulus, dan tenaga dalam membimbing penulis sejak awal persiapan penelitian hingga selesainya penulisan tesis ini. Rasa terima kasih yang setinggi-tingginya pula penulis sampaikan kepada **Prof. Dr. Rauf Patong, Prof. Dr. M. Sjahrul, M.Agr.**, dan **Dr. Ir. Prastawa Budi**, atas kesediaannya sebagai penguji serta saran perbaikan terhadap tesisi ini.

Ucapan terima kasih tidak lupa penulis haturkan kepada :

1. Direktur dan Asisten Direktur PPS-Unhas beserta seluruh staf.
2. Ketua Program Studi Kimia PPS-Unhas Dr. Paulina Taba, M.Phil dan seluruh staf dosen pengajar.
3. Ketua dan staf Laboratorium Kimia Organik dan Kimia Radiasi FMIPA-Unhas.
4. Ketua dan staf Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong atas bantuannya untuk pengukuran data UV, IR, dan NMR.
5. Rekan-rekan kuliah angkatan 2005/2006 Program Studi Kimia (Bu Ani, Bu Eva, Bu Suryani, Kak Difa, Nini dan Pak Dissing) yang telah sama-sama berjuang dan membantu penulis selama proses perkuliahan dan penelitian.
6. Para peneliti Kimia Bahan Alam *Altilis Group* (S1), *Spons Group* (S2, S3), *Sterculiaceae Group* (S2, S3), dan *Gedi* di Laboratorium Kimia Organik atas kerjasama dan bantuan yang diberikan.

7. Adik-adik tersayang di Pondok Ikhlas (Irma, Bia, Aziza, Eno, Erni, Lina, Ami, Ririn, dan Arie) atas bantuan dan keceriaan yang menghiasi hari-hari penulis. Dan spesial *thank's* buat Hindra, Fithy, Ommie, dan K' Waya atas pengertian, doa, waktu, dan tenaga yang kalian berikan.
8. Seluruh pihak yang telah membantu namun tak sempat penulis sebut satu persatu. Hanya Allah SWT yang dapat membalas segalanya.

Harapan penulis semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan Khususnya Kimia Bahan Alam.

Makassar, Agustus 2008

ROSMAWATY

ABSTRAK

ROSMAWATY. *Identifikasi Struktur Metabolit Sekunder pada Fraksi Non Aktif terhadap Artemia salina Leach dari Spons Clathria reinwardtii (dibimbing oleh Nunuk Hariani S. dan Alfian Noor).*

Identifikasi struktur metabolit sekunder pada fraksi non aktif dari spons *Clathria reinwardtii* telah dilakukan. Uji bioaktivitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) menggunakan *Artemia salina* Leach. Teknik pemisahan yang digunakan terdiri atas ekstraksi, fraksinasi, dan pemurnian. Senyawa yang diperoleh diuji golongan senyawa dan dielusidasi strukturnya berdasarkan data fisik, spektrum UV, IR dan NMR. Dua senyawa yang diperoleh diduga sebagai senyawa : (1) golongan fenolik, (2) ?-sitosterol.

Kata kunci; ?-sitosterol, *Artemia salina* Leach, *Clathria reinwardtii*, fenolik.

ABSTRACT

ROSMAWATY. *Structural Identification of Secondary Metabolites of Non Active Fraction against Artemia salina Leach from Sponge Clathria reinwardtii* (supervised by Nunuk Hariani S. and Alfian Noor).

Structural Identification of secondary metabolites of non active fraction from sponge *Clathria reinwardtii* have been carried out. Bioactivity assay was conducted by *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) method using *Artemia salina* Leach. Separation techniques used consisted of extraction, fractionation, and purification. The classes of compounds obtained were tested and their structures were elucidated based on physical data as well as UV, IR, and NMR spectra. Two compounds that obtained were predicted as (1). fenolic, (2) β -sitosterol.

Key words; β -sitosterol, *Clathria reinwardtii*, *Artemia salina* Leach, fenolic.

DAFTAR ISI

| | halaman |
|---|-------------|
| PRAKATA | v |
| ABSTRAK | viii |
| <i>ABSTRACT</i> | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN | xvi |
| I. PENDAHULUAN | |
| A. Latar Belakang | 1 |
| B. Rumusan Masalah | 4 |
| C. Tujuan Penelitian | 4 |
| D. Manfaat Penelitian | 5 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| A. Uraian Spons | |
| 1. Morfologi spons | 6 |
| 2. Klasifikasi spons | 8 |
| 3. <i>Clathria reinwardtii</i> | 9 |
| B. Sifat Biologis Metabolit Sekunder dari Spons | 11 |

| | |
|--|----|
| C. Isolasi Bahan Alam | |
| 1. Pemilihan sumber organisme | 17 |
| 2. Ekstraksi bahan alam | 18 |
| 3. Fraksinasi bahan alam | 19 |
| 4. Uji bioaktivitas | 19 |
| III. METODE PENELITIAN | |
| A. Alat dan Bahan | |
| 1. Alat | 21 |
| 2. Bahan | 22 |
| B. Obyek Penelitian | 22 |
| C. Tempat dan Waktu Penelitian | 22 |
| D. Prosedur Kerja | |
| 1. Pengumpulan dan persiapan sampel | 23 |
| 2. Ekstraksi | 23 |
| 3. Isolasi | 24 |
| 4. Uji bioaktivitas | 24 |
| 5. Penentuan Struktur | 25 |
| IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | |
| A. Hasil | |
| 1. Ekstraksi | 26 |
| 2. Isolasi dan uji bioaktivitas | 26 |
| 3. Pengukuran spektroskopi | 33 |
| B. Pembahasan | 34 |

V. KESIMPULAN DAN SARAN

| | |
|---------------|----|
| A. Kesimpulan | 41 |
| B. Saran | 41 |

DAFTAR PUSTAKA**LAMPIRAN**

DAFTAR TABEL

| nomor | halaman |
|---|----------------|
| 1. Penyebaran spons di perairan Kepulauan Spermode | 10 |
| 2. Berat dan nilai aktivitas (LC_{50}) ekstrak n-heksan, kloroform, dan etil a setat | 27 |
| 3. Berat dan nilai aktivitas (LC_{50}) fraksi utama hasil fraksinasi ekstrak n-heksan | 28 |
| 4. Berat dan nilai aktivitas (LC_{50}) fraksi utama hasil fraksinasi ekstrak $CHCl_3$ | 33 |
| 5. Perbandingan data spektrum IR senyawa (2) dan ?-sitosterol | 39 |

DAFTAR GAMBAR

| nomor | halaman |
|--|---------|
| 1. Spons <i>Clathria reinwardtii</i> | 9 |
| 2. Senyawa-senyawa yang memiliki bioaktivitas anti-kanker | 14 |
| 3. Senyawa-senyawa yang memiliki bioaktivitas anti-HIV | 15 |
| 4. Senyawa-senyawa yang memiliki bioaktivitas anti-fungi | 16 |
| 5. Kromatogram 9 fraksi utama n-heksan (A-I) | 27 |
| 6. Kromatogram 9 fraksi gabungan hasil fraksinasi fraksi D | 29 |
| 7. Kromatogram 17 fraksi hasil fraksinasi fraksi D ₁ | 30 |
| 8. Kromatogram fraksi D _{1,2} dengan tiga macam sistem eluen | 30 |
| 9. Kromatogram fraksi D ₅ dan fraksi F _{10,6} dengan tiga macam sistem eluen | 31 |
| 10. Kromatogram 14 fraksi utama kloroform | 32 |
| 11. Spektrum UV senyawa (1) | 35 |
| 12. Spektrum IR senyawa (1) | 35 |
| 13. Spektrum ¹ H-NMR senyawa (1) | 37 |
| 14. (a) Spektrum IR senyawa (2) | 38 |
| (b) Spektrum IR pembanding β -sitosterol | 38 |
| 15. Struktur molekul β -sitosterol | 39 |

DAFTAR LAMPIRAN

| nomor | halaman |
|---|----------------|
| 1. Bagan ekstraksi | 47 |
| 2. Bagan fraksinasi ekstrak n-heksan | 48 |
| 3. Bagan isolasi fraksi D | 49 |
| 4. Bagan fraksinasi ekstrak kloroform | 50 |
| 5. Kromatogram hasil maserasi | 51 |
| 6. Kromatogram eluen yang sesuai untuk ekstrak n-heksan | 52 |
| 7. (a) Kromatogram eluen yang sesuai untuk fraksi D | 53 |
| (b) Kromatogram eluen yang sesuai untuk fraksi D ₁ | 53 |
| 8. Kromatogram senyawa (2) dan standar β -sitosterol dengan tiga macam sistem eluen | 54 |
| 9. Kromatogram eluen yang sesuai untuk ekstrak CHCl ₃ | 55 |
| 10. (a). Spektrum ¹ H-NMR senyawa (1) | 56 |
| (b). Spektrum ¹ H-NMR senyawa (1) | 57 |
| 11. Prosedur uji BST | 58 |
| 12. Bagan kerja uji senyawa terpenoid, steroid, dan fenolik | 60 |

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

| Lambang/Singkatan | Arti dan Keterangan |
|-------------------|------------------------------------|
| ABS | absorban |
| BST | brine shrimp lethality test |
| IC ₅₀ | median inhibition concentrate |
| IR | infra red |
| KKG | kromatografi kolom gravitasi |
| KKT | kromatografi kolom tekan |
| KKV | kromatografi kolom vakum |
| KLT | kromatografi lapis tipis |
| LC ₅₀ | median lethal concentrate |
| MIC | minimum inhibition concentrate |
| NMR | nucleus magnetic resonance |
| ppm | part per million (bagian per juta) |
| R _f | ratio force |
| v/v | volume per volume |
| UV | ultra violet |
| µg/mL | mikrogram per milliliter |
| µL | mikro liter |
| µM | mikro molar |
| λ _{max} | panjang gelombang maksimum |
| ν _{max} | bilangan gelombang |
| δ _H | pergeseran kimia atom hidrogen |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Terumbu karang di daerah tropis merupakan suatu ekosistem yang khas, mempunyai produktivitas senyawa organik yang sangat tinggi termasuk keanekaragaman biota laut yang hidup di dalamnya. Jenis biota laut yang terdapat di terumbu karang tersebut bisa dibandingkan dengan keanekaragaman hayati yang tumbuh di hutan tropis (Supriyono, 2000). Beberapa jenis organisme tersebut merupakan sumber vitamin, protein, dan mineral. Selain itu, ada juga beberapa jenis organisme yang mensintesis dan menyimpan senyawa toksin (*marine toxin*) pada bagian tubuhnya atau dikeluarkan ke lingkungan hidupnya (Satari, 2003). Senyawa tersebut merupakan metabolit sekunder yang digunakan dalam sistem pertahanan diri, yaitu untuk mempertahankan hidup dan menghindari gangguan dari organisme lain di lingkungan hidupnya. Karena aktivitas farmakologiknya maka senyawa tersebut memiliki prospek untuk diisolasi dan dimanfaatkan dalam bidang pengobatan (Sardjoko, 1996).

Berbagai jenis penyakit akhir-akhir ini muncul dengan tingkat keganasan yang berbeda dan cenderung meningkat. Saat ini upaya kebutuhan obat baru dipenuhi melalui kerja eksploratif yaitu pencarian

dengan memodifikasi struktur senyawa obat yang secara klinis masih digunakan dan memanfaatkan sumber daya alam. Salah satu sumber daya alam yang belum dikembangkan secara maksimal adalah sumber alam kelautan (Wahyuono, 2003).

Salah satu jenis organisme yang berpotensi cukup besar dan berpeluang mengandung senyawa aktif adalah spons. Spons merupakan hewan laut yang hidup di kedalaman sampai dengan 50 meter di bawah permukaan laut. Penyebarannya sangat luas, terdapat 15.000 spesies spons laut di seluruh dunia dan sekitar 45 % senyawa bioaktif ditemukan pada spons laut (Anonim, 2006). Perjalanan pencarian obat dari spons di beberapa perairan di Indonesia sudah dilakukan, namun masih banyak lokasi di Indonesia yang belum tersentuh (Wahyuono, 2003). Di Perairan kepulauan Spermonde saja telah ditemukan 199 spesies spons dan diduga berpotensi untuk memiliki sampai 2000 spesies asalkan diteliti secara intensif (de Voogd, 2005 dalam Noor, 2007), salah satu pulau diantaranya yaitu Pulau Barang Lompo.

Spons dengan populasi terbesar yang tumbuh di perairan sekitar Pulau Barang Lompo yaitu *Clathria reinwardtii* (de Voogd *et al.*, 2006). Ekstrak dari *Clathria sp.* memberikan aktivitas antibiofouling yang tinggi dan aktivitas dalam menghambat jamur *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sp.*, dan *Fusarium sp.* (Suryati *et al.*, 2005).

Sejumlah senyawa metabolit pada spons yang mempunyai bioaktivitas tertentu telah diisolasi dan diidentifikasi. Senyawa-senyawa

yang bersifat sitotoksik antara lain : jaspine B (1), mycaperoxide H (2), microcionamides A (3) dan B (4), barangamide A–D (5-8), bitungolide A-F (9-14), irciniastatin A (15) dan B (16). Dehydrocrambine A (17) dan clathsterol (18) merupakan senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai anti-HIV. Senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai anti-fungi, yaitu : aurantoside B (19) dan meridine (20). Senyawa golongan alkaloid dari ekstrak spons *Callyspongia* sp. mempunyai bioaktivitas sebagai anti-oksidan (Hanani *et al.*, 2005).

Penentuan sifat-sifat bioaktif suatu ekstrak atau suatu senyawa bahan alam dapat dilakukan melalui uji bioaktivitas dengan cara mempengaruhi sistem metabolisme organisme hidup. Uji bioaktivitas primer yang lazim digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Uji aktivitas ini menggunakan benur udang *Artemia salina* Leach. Uji ini mempunyai korelasi positif dengan uji-uji sekunder yang lain, seperti sebagai anti-tumor sel murin leukemia P-388 dan anti-kanker. Selain itu uji ini memiliki beberapa keunggulan antara lain prosedurnya mudah, dan biayanya relatif murah (Mayer *et al.*, 1982).

Ekstrak atau senyawa yang non aktif terhadap *A. salina* kemungkinan dapat memberikan efek biologi yang lain seperti anti-inflamasi, anti-oksidan, dan anti-mikroba. Senyawa turunan steroid, yang diduga β -sitosterol, memiliki aktivitas yang tinggi terhadap *A. salina* (LC_{50} 76,00 μ g/mL) telah berhasil diisolasi dari ekstrak spons *Biemna*

triraphis yang non aktif terhadap *A. salina* (LC₅₀ 543,00 µg/mL) (Sapar, 2003).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu untuk melakukan penelusuran senyawa metabolit sekunder pada fraksi non aktif terhadap benur udang *A. salina* yang ada dalam spons *C. reinwardtii*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, spons *C. reinwardtii* diduga mengandung senyawa kimia yang aktif. Permasalahannya adalah metabolit sekunder apa saja yang terdapat dalam fraksi non aktif terhadap *A. salina* dari spons *C. reinwardtii* serta bagaimana struktur dan bioaktivitas metabolit sekunder tersebut.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi struktur metabolit sekunder pada fraksi non aktif terhadap benur udang *A. salina* Leach dari spons *C. reinwardtii*.

D. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberi informasi tentang jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam spons *C. reinwardtii* dan toksisitasnya terhadap benur udang *A. salina* sehingga dapat bermanfaat dalam pengembangan obat tradisional ke arah fitofarmaka .
2. Memberikan kontribusi bagi ilmu pengetahuan khususnya bagi ilmu kimia organik bahan alam laut.
3. Memberi pengalaman secara praktis maupun teoritis bagi peneliti.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Uraian Spons

Spons, sering juga disebut bunga karang, merupakan organisme multiseluler yang termasuk filum porifera. Porifera berasal dari bahasa latin, *porus* berarti lubang kecil dan *ferre* berarti membawa atau mengandung atau mempunyai. Jadi, kata porifera berarti hewan yang mempunyai tubuh dengan struktur berpori dengan banyak permukaan yang terbuka (Hooper, 1997). Porifera atau binatang karang merupakan invertebrata yang paling rendah ditingkatannya, tanpa adanya jaringan sebenarnya (parazoa). Spesies ini kekurangan otot, saraf, dan organ-organ internal lainnya (Anonim b, 2007).

1. Morfologi spons

Morfologi luar spons sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindung atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi, memiliki tubuh yang lebih simetris dan lebih besar apabila dibandingkan dengan

jenis yang sama yang hidup pada perairan yang dangkal (Amir dan Budiyanoto, 1996).

Spons dapat berbentuk sederhana seperti tabung dengan dinding tipis, dan agak tidak teratur. Banyak spons juga terdiri dari segumpal jaringan yang tak tentu bentuknya, menempel dan membentuk kerak pada batu, cangkang, tonggak, atau tumbuh-tumbuhan. Kelompok lain dari spons mempunyai bentuk lebih teratur dan melekat pada dasar perairan melalui sekumpulan spikula. Bentuk-bentuk spons dapat beragam, misalnya beberapa jenis bercabang seperti pohon, lainnya berbentuk seperti sarung tinju, cawan atau kubah. Ukuran spons juga beragam, mulai dari ukuran sebesar kepala jarum pentul sampai yang mempunyai garis tengah 0,9 m dan tebalnya 30 cm. Jenis-jenis spons tertentu nampak berbulu getar karena spikulanya menyembul keluar dari badannya (Suparno, 2005). Banyak spons yang berwarna putih dan abu-abu, dan ada pula yang berwarna kuning, orange, ungu, merah, atau hijau. Warna hijau biasanya disebabkan oleh adanya alga simbiotik yang disebut Zoochlorellae yang terdapat di dalamnya (Romimohtarto, 2001).

Konsistensi tubuh spons pada umumnya elastis seperti busa karet tetapi ada beberapa jenis yang agak keras dan agak rapuh. Tubuh spons ini diperkokoh oleh suatu kerangka spikula yang merupakan kumpulan dari materi alam tak hidup yang mengandung kalsium karbonat atau silika dan juga didukung oleh kerangka serat-serat keratin atau spongin (Amir dan Budiyanoto, 1996).

Reseck (1988), menyatakan bahwa ada enam faktor ekologis yang sangat mempengaruhi bentuk dan pertumbuhan spons, antara lain kedalaman air, struktur dasar, arus air, suhu air, level nutrien, dan sedimentasi. Spons hidup di kedalaman sampai dengan 50 meter di bawah permukaan laut. Namun spons sangat baik pertumbuhannya dan tumbuh subur pada perairan yang mempunyai kedalaman 9-60 kaki (3-20 meter).

2. Klasifikasi spons

Menurut Kozloff (1990), spons dapat diklasifikasikan berdasarkan pada pengelompokan secara umum dan komponen rangka yang dimiliki, yaitu:

a. Kelas Calcarea atau Calcispongiae

Spons ini hidup di daerah pantai yang dangkal dengan bentuk tubuh sederhana. Spikula spons ini tersusun dari kalsium karbonat dan tidak mengandung spongin. Sebagian besar spons dari kelas ini bentuknya kecil-kecil dan berwarna putih keabu-abuan dan ada beberapa jenis berwarna kuning, merah jambu, dan hijau. Elemen kerangka dari Calcarea berbentuk spikula "triaxon". Beberapa jenis spons ini adalah *Sycon gelatinosum* (berbentuk silinder berwarna coklat muda), *Clathrina sp.* dan *Leucetta sp.* Spons ini jumlahnya sedikit, lebih kurang hanya 10 % dari jumlah hewan spons yang ada di laut.

b. Kelas Hexactinellida atau Hyalospongiae

Spons ini hidup di laut dalam dengan kedalaman 50 meter, tetapi ada pula yang dapat tumbuh pada 1 meter. Jenis ini disebut juga spons gelas, dimana spikula terdiri dari silika dan tidak mengandung spongin. Spikulanya berbentuk bidang "triaxon", dimana masing-masing bidang terdapat dua jari-jari (Hexactinal). Spons dari kelas ini belum banyak dikenal karena sulit didapatkan. Contoh spons ini yaitu *Euplectella sp* dan *Aspergillum sp*.

c. Kelas Demospongiae

Hampir 75 % jenis spons yang dijumpai di laut adalah kelas Demospongiae. Spons dari kelas ini tidak memiliki spikula "triaxon", tetapi spikulanya berbentuk "monoaxon", "tetraxon" yang mengandung silika. Beberapa jenis spons kelas ini ada yang tidak mengandung spikula tetapi hanya mengandung spongin. Contohnya *Cliona sp* dan *Spongia sp*.

3. *Clathria reinwardtii*



Gambar 1, Spons *Clathria reinwardtii*

Klasifikasi spesies spons yang menjadi objek penelitian, yaitu:

Filum : Porifera

Kelas : Demospongiae

Subkelas : Ceractinomorpha

Ordo : Poecilosclerida

Subordo : Microcionina

Famili : Microcionidae

Genus : Clathria

Spesies : *Clathria reinwardtii* (Hooper dan Soest, 2002)

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Nicole de Voogd (2006) di perairan Kepulauan Spermonde menunjukkan bahwa *Clathria reinwardtii* termasuk salah satu spesies spons yang kelimpahannya terbesar di wilayah tersebut.

Tabel 1 ; Penyebaran spons di perairan Kepulauan Spermonde (de Voogd, 2006)

| Spesies | Lokasi | | | | | | | | |
|--|--------|-----|------|------|-----|------------|------|------|-----|
| | LL | BB | SA-E | SA-W | BL | BA | KK-E | KK-W | LK |
| <i>Amphimedon paraviridis</i> Fromont | 64 | 248 | 52 | 847 | 212 | 22 | 66 | 326 | 58 |
| <i>Callyspongia</i> aff. <i>Pseudofibrosa</i> Desqueyroux-Faundez | 24 | 21 | 15 | 37 | 9 | 42 | 12 | 39 | 14 |
| <i>Callyspongia biru</i> de Voogd | 0 | 31 | 125 | 101 | 17 | 17 | 22 | 20 | 40 |
| <i>Chalinula hooperi</i> Bakus & Nishiyama | 4 | 83 | 12 | 29 | 9 | 5 | 76 | 56 | 165 |
| <i>Clathria reinwardtii</i> Vosmaer | 66 | 121 | 236 | 336 | 278 | 193 | 70 | 269 | 24 |
| <i>Haliclona</i> sp. 'blue' | 0 | 33 | 51 | 326 | 70 | 8 | 46 | 60 | 8 |
| <i>Hyrtios erectus</i> Keller | 8 | 39 | 147 | 185 | 138 | 157 | 42 | 86 | 94 |
| <i>Petrosia hoeksemai</i> de Voogd & van Soest | 2 | 33 | 41 | 153 | 35 | 75 | 13 | 84 | 23 |
| <i>Petrosia nigricans</i> Lindgren | 2 | 15 | 23 | 32 | 38 | 60 | 8 | 76 | 29 |
| <i>Sphacispongia congenera</i> Ridley | 10 | 68 | 15 | 70 | 26 | 12 | 12 | 15 | 4 |

Keterangan: LL: Laelae; BB: Bone Baku; SA: Samalona; BL: Bone Lola; BA: Barang Lompo; KK: Kudingareng Keke; LK: Langkai; E: timur, W: Barat

B. Sifat Biologis Metabolit Sekunder dari Spons

Metabolit sekunder merupakan produk detoksifikasi dari timbunan metabolit yang beracun. Metabolit sekunder tidak bersifat esensial bagi kehidupan organisme tetapi penting bagi organisme yang menghasilkannya yaitu sebagai pertahanan terhadap serangan-serangan organisme lain, sebagai penarik seks, dan lain sebagainya (Sapar, 2004).

Spons adalah salah satu biota laut yang menghasilkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons laut telah banyak diketahui manfaatnya. Senyawa bioaktif tersebut dihasilkan oleh sel-sel spons itu sendiri, mikrosimbiotanya, atau keduanya secara bersama-sama (Munro *et al.*, 1989).

Spons secara khusus berkompetisi untuk menempati dan menyingkirkan predator-predator dengan zat kimia. Spons tidak dapat menggigit, menyengat atau melarikan diri dari predator-predator, tetapi dapat mengeluarkan racun (bahan kimia) secara aktif dalam daerah pertumbuhannya. Bahan kimia tersebut digunakan untuk meracuni karang-karang dan binatang lainnya yang cenderung tumbuh melebihi spons. Bahan kimia disimpan dalam selnya dan hanya dikeluarkan pada saat predator menggigitnya. Bahan kimia yang paten secara khusus memberi banyak perlindungan untuk melawan predator, tetapi jika predator memiliki beberapa enzim yang dapat mendetoksifikasi bahan kimia tersebut maka predator memiliki keuntungan untuk mengeksploitasi spons. Spons mampu untuk menghasilkan racun yang banyak. Efek

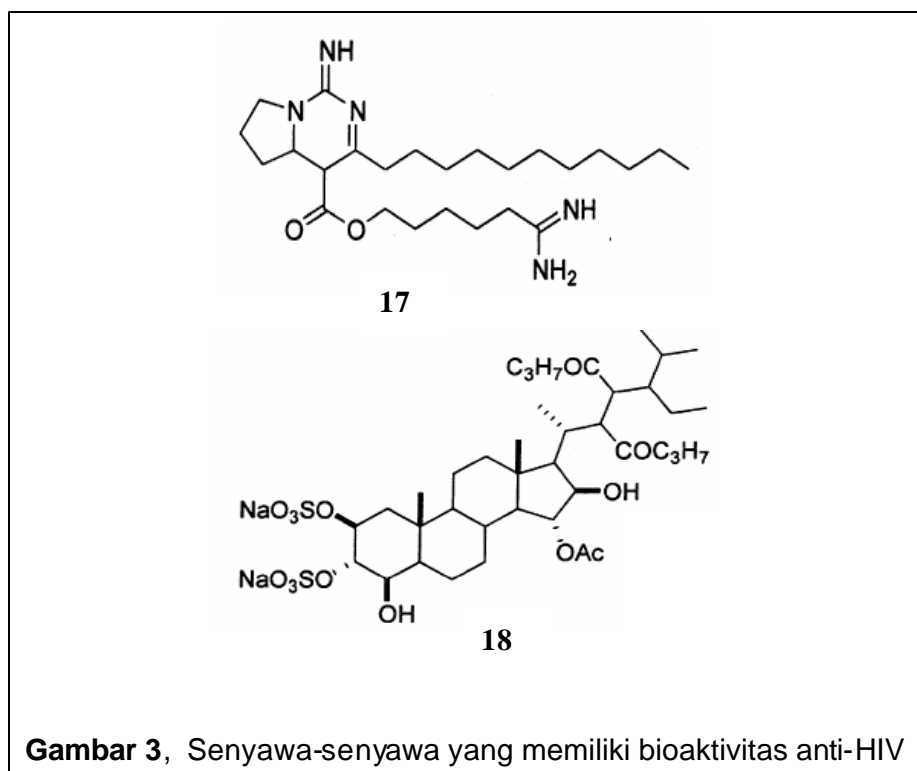
akhir dari spons merupakan kekebalan yang absolut tetapi masih ada predator yang dapat memakannya. Saat kedua spesies ini mendekati batasnya, keduanya memiliki kapasitas metabolik untuk menghasilkan racun atau enzim detoksifikasi.

Selain itu spons juga memproduksi senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang bermanfaat dalam proses pencernaan secara enzimatik, terutama untuk mencerna bakteri sebagai sumber nutrisi baginya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons tidak hanya bermanfaat untuk proses pencernaan makanannya, tetapi kandungan kimianya juga mampu menangkal dan menghambat pertumbuhan mikroba patogen yang mengganggu kelangsungan hidupnya (Haris, 2001).

Metabolit dari spons mengandung senyawa bioaktif yang diketahui berperan dalam aktivitas seperti: respirasi, kardiovaskuler, gastrointestinal, dan anti-biotik (Anonim a, 2007); sitotoksik dan anti-tumor (Kobayashi dan Rachmaniar, 1999); anti-virus (Munro *et al.*, 1989); anti-HIV dan anti-inflamasi (Proksch, 1999); anti-fungi (Muliani *et al.*, 1998); anti-bakteri (Ireland *et al.*, 1989; Munro, *et al.*, 1989; Muniarsih dan Rachmaniar, 1999); anti-leukemia (Soediro, 1999); anti-malaria (Konig dan Wright, 1999); dan penghambat aktivitas enzim (Soest dan Braekman, 1999). Selain sebagai sumber senyawa bahan alam, spons juga memiliki manfaat yang lain, seperti digunakan sebagai indikator biologi untuk pemantauan pencemaran laut (Amir, 1991), dan sebagai hewan penting untuk akuarium laut (Riseley, 1971 dan Warren, 1982).

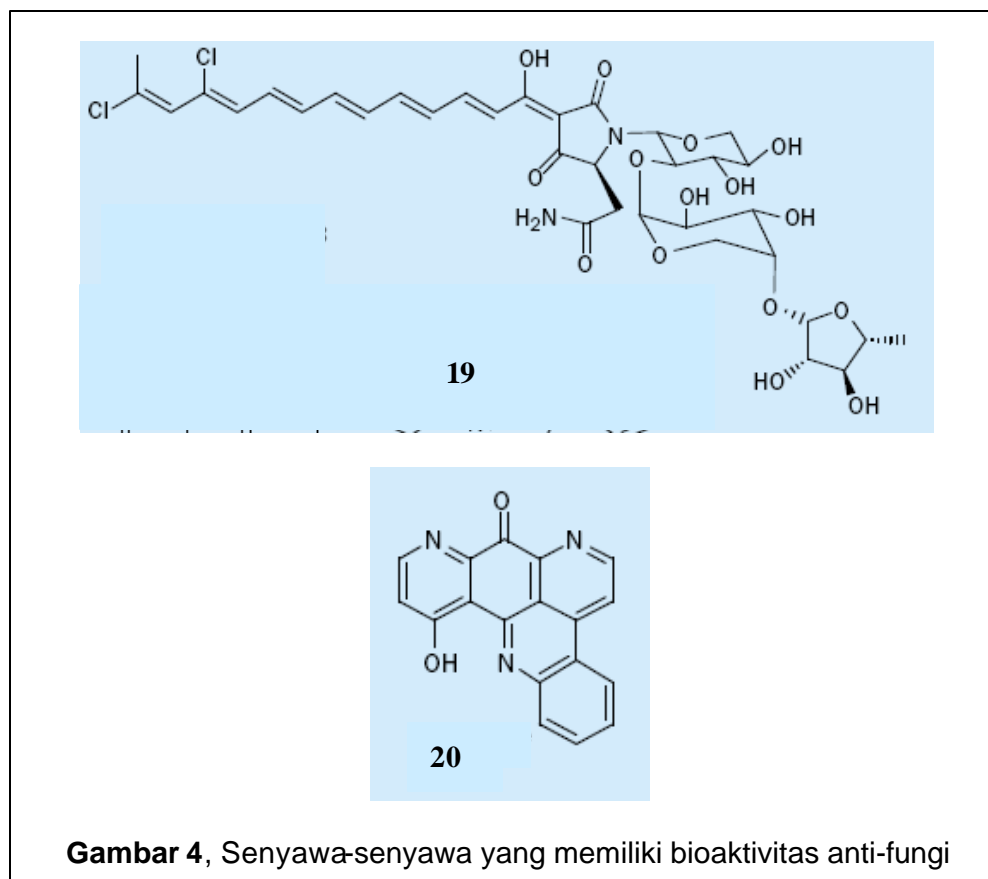
Sejumlah senyawa metabolit pada spons yang mempunyai bioaktivitas tertentu telah diisolasi dan diidentifikasi. Senyawa-senyawa yang bersifat sitotoksik antara lain : jaspine B (1), senyawa golongan alkaloid turunan sphingosine ini diisolasi dari spons *Jaspis sp.* dengan nilai IC_{50} 0,24 μ M (Ledcroit *et al.*, 2003); mycaperoxide H (2) merupakan sitotoksik peroksida norsesiterpen (IC_{50} 0,80 μ g/mL) yang diisolasi dari spons *Mycale sp.* (Phuwapraisiran *et al.*, 2003); microcionamides A (3) dan B (4) merupakan senyawa bioaktif peptida yang diisolasi dari spons Philipina *Clathria (Thalysias) abietina*, IC_{50} 0,80 μ g/mL (Davis *et al.*, 2004); barangamide A–D (5-8) yang merupakan sitotoksik peptida siklik (Higa *et al.*, 2001) dan sebuah rangkaian poliketida yang khas yaitu bitungolide A-F (9-14), telah berhasil diisolasi dari spons *Theonella swinhoei* yang berasal dari Pulau Barang Lompo Indonesia (Tanaka *et al.*, 2005); irciniastatin A (15) dan B (16), diisolasi dari spons Indo-Pasifik *Ircinia ramosa* yang mempunyai biaktivitas sebagai anti-neoplastik IC_{50} 0,80 μ g/mL (Pettit *et al.*, 2004).

Dehydrocrambine A (**17**), senyawa polisiklik guandin alkaloid yang telah diisolasi dari spons *Monachora sp.* (Chang *et al.*, 2003) dan Clathsterol (**18**), senyawa sterol yang telah diisolasi dari spons *Clathria sp* (Rudy *et al.*, 2001), keduanya merupakan senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai anti-HIV dengan konsentrasi berturut-turut $IC_{50} \approx 35 \mu M$ dan $IC_{50} 10 \mu M$.



Senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai anti-fungi, yaitu: aurantoside B (**19**), diisolasi dari spons *Sillguariaspongia japonica* yang merupakan senyawa poliketida, memiliki aktivitas penghambat jamur *Aspergillus fumigatus* MIC 0,63 $\mu g/mL$ dan *C. albicans* MIC 0,16 $\mu g/mL$ (Sata *et al.*, 1999). Meridine (**20**) merupakan senyawa alkaloid polisiklik

yang diisolasi dari *Corticium sp.* yang mempunyai aktivitas penghambat jamur *C. albicans* MIC 0,20 μ g/mL dan *Cryptococcus neoformans* MIC 0,80 μ g/mL (McCarthy *et al.*, 1992). Senyawa golongan alkaloid dari ekstrak spons *Callyspongia sp.* mempunyai bioaktivitas sebagai antioksidan (Hanani *et al.*, 2005).



Salah satu senyawa dari golongan steroid yang memiliki efek farmakologis yaitu β -sitosterol. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Rinai Sante Institute of Integrative Medicine menunjukkan bahwa β -sitosterol mampu menghambat kerja enzim yang mengkonversi testosteron menjadi

dehidrotosteron (DHT). DHT ini adalah penyebab kanker prostat. Selain itu menurut Yuk (2007), β -sitosterol merupakan senyawa yang efektif digunakan dalam penyembuhan penyakit asma, sehingga memungkinkan senyawa ini untuk dikembangkan sebagai obat terapi penyakit alergi.

C. Isolasi Bahan Alam

Pemisahan berbagai komponen kimia yang ada dalam ekstrak hewan dapat dilakukan dengan metode isolasi. Pemisahan ini didasarkan atas sifat adsorpsi dan partisi dari setiap komponen tertentu. Metode isolasi yang dilakukan dan telah banyak dikembangkan terdiri dari empat tahap, yaitu :

1. Pemilihan sumber organisme

Dalam upaya pencarian senyawa bioaktif dari alam, pendekatan (*approach*) yang dilakukan untuk pemilihan sampel sangat memegang peranan penting. Pemilihan material dari alam secara acak yang dikombinasikan dengan proses seleksi (*screening*) bioaktivitas merupakan metode yang banyak digunakan oleh industri-industri besar dalam pencarian bahan aktif dari alam (Hadi *et al.*, 2001). Cara ini sering dianggap tidak efisien dan akan lebih efektif apabila pencarian tersebut dikombinasikan dengan memberikan kriteria tertentu. Sebagai contoh, tumbuh-tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional sering memberikan senyawa-senyawa aktif secara farmakologi.

Pendekatan dalam pemilihan hewan maupun tumbuhan dari alam adalah berdasarkan hubungan kekerabatan tumbuhan yang diketahui sebelumnya mengandung senyawa kimia yang bermanfaat (pendekatan filogenetik). Pendekatan kemo-taksonomi yang didasarkan pada kedekatan kekerabatan tumbuhan yang telah diketahui memiliki kandungan kimia tertentu juga dapat dilakukan. Secara alami sering dijumpai tumbuh-tumbuhan atau organisme lain dalam satu famili memproduksi senyawa yang sama (Hostettmann *et al.*, 1995).

2. Ekstraksi bahan alam

Penarikan senyawa kimia bahan alam yang akan diisolasi dapat dilakukan dengan proses ekstraksi. Ekstraksi adalah proses pelarutan senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam suatu sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan komponen yang diinginkan. Metode maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel dalam pelarut organik selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Maserasi biasanya dilakukan bertahap, mulai dari pelarut yang paling nonpolar sampai pada pelarut yang paling polar. Bisa juga dilakukan dengan menggunakan pelarut polar seperti metanol secara langsung selanjutnya dilakukan partisi dengan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya melalui proses ekstraksi (Harborne, 1987; Zenta dan Kumanireng, 2002).

3. Fraksinasi bahan alam

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa kimia yang satu dengan senyawa kimia yang lain dari suatu ekstrak bahan alam. Metode fraksinasi yang digunakan adalah metode kromatografi dimana pemisahan senyawa kimia tergantung pada sifat partisi, adsorpsi, dan distribusi komponen kimia terhadap fase diam dan fase gerak. Beberapa metode fraksinasi yang dapat digunakan antara lain: Kromatografi Kolom Vakum (KKV), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), dan Kromatografi Kolom Tekan (KKT) (Hostettmann *et al.*, 1995).

4. Uji bioaktivitas

Penentuan sifat-sifat bioaktif suatu ekstrak atau suatu senyawa bahan alam dapat dilakukan melalui uji bioaktivitas dengan cara mempengaruhi sistem metabolisme organisme hidup. Uji bioaktivitas primer yang lazim digunakan pada ekstrak maupun senyawa-senyawa bahan alam adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Uji aktivitas ini menggunakan udang laut *A. salina* Leach untuk skining crude sampel atau monitoring pemisahan (McLaughlin *et al.*, 1991).

Meskipun penggunaan *A. salina* tidak spesifik terhadap aktivitas anti-kanker, akan tetapi dapat digunakan sebagai uji lethalitas sederhana dan menjadi dasar uji sitotoksitas serta sangat baik untuk evaluasi secara cepat terhadap hasil fraksinasi bahan alam yang mengandung senyawa bioaktif (Munro *et al.*, 1989 dalam Sapar, 2004).

BST telah dilakukan oleh Mayer pada tahun 1982 untuk penelitian bahan alam dengan menggunakan larva (*naupli*) udang *A. salina* yang diperoleh dengan menetasakan telur udang tersebut dalam medium air laut buatan. Aktivitas ekstrak atau isolat ditentukan oleh nilai LC_{50} dengan interval kepercayaan 95% yang dihitung menggunakan program komputer *Finney* ataupun program *Bliss Method*.

Nilai LC_{50} dari suatu senyawa digolongkan tidak aktif dari senyawa murni dan fraksi masing-masing adalah lebih dari 200 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$ (Anderson *et al.*, 1990). Aktivitas dari suatu senyawa yang tergolong bioaktif dapat menunjukkan sifat toksiknya terhadap benur udang *A. salina* dan metode ini telah digunakan untuk analisis residu pestisida, mikotoksin, polutan sungai, obat bius, morfin, dan bahan-bahan beracun pada lingkungan laut (Mayer *et al.*, 1982).

BAB III

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi penentuan lokasi pengambilan sampel, pemilihan spesies hewan, pengumpulan dan persiapan sampel, pengolahan sampel yang meliputi ekstraksi, isolasi, pemurnian, elucidasi struktur, dan uji bioaktivitas.

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan terdiri dari beberapa alat-alat gelas yang umum dipakai di laboratorium, seperangkat alat destilasi, corong Buchner, plat tetes, chamber untuk wadah KLT, pipa kapiler untuk penotol, serta alat kolom kromatografi yang digunakan pada proses fraksinasi, seperti KKV, KKT, dan KKG. Beberapa alat instrumentasi seperti oven, lampu UV, neraca digital, evaporator, alat penetapan titik leleh elektrotermal untuk menentukan titik leleh. Spektroskopi UV, IR, dan NMR untuk elucidasi struktur. Mikropipet, mikroplate, tabung ependorf, lampu untuk pencahayaan, dan wadah penetasan benur udang, digunakan pada uji BST.

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi serbuk spons *C. reinwardtii*, kloroform p.a., pelarut-pelarut yang dimurnikan seperti metanol, etil asetat, n-heksan, dan aseton. Beberapa pelarut berkualitas (p.a.) yang digunakan pada proses kristalisasi. Adsorben kolom kromatografi yaitu Si gel Merck 60 GF₂₅₄ dengan nomor katalog 7730, 7733, dan 7734, serta analisis KLT dilakukan pada pelat berlapis Si gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄. Larutan serum sulfat $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 2% dalam asam sulfat 2 N sebagai larutan penampak noda pada pelat KLT. Dimetil sulfoksida (DMSO), garam laut *sea salt* dengan nomor katalog S-9883, telur udang *A. salina*, dan aquabides yang digunakan untuk uji bioaktivitas. Besi (III) klorida, pereaksi Liebermann Burchard untuk uji kualitatif senyawa triterpenoid/steroid

B. Obyek Penelitian

Objek dalam penelitian ini yaitu spons *Clathria reinwardtii* sebagai salah satu upaya dalam pencarian metabolit sekunder dari fraksi non aktif terhadap benur udang *A. salina*.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel penelitian ini diambil di perairan sekitar Pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan. Sedangkan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Radiasi Jurusan

Kimia FMIPA UNHAS-Makassar yang meliputi kegiatan fraksinasi hasil partisi dan pemurnian isolat tunggal, uji golongan senyawa, serta uji bioaktivitas. Pengukuran spektroskopi UV, IR, NMR dilakukan di LIPI Serpong. Penelitian ini mulai dilakukan pada bulan Mei 2007.

D. Prosedur Kerja

1. Pengumpulan dan persiapan sampel

Spons *C. reinwardtii* yang telah dibersihkan, dikeringkan di udara terbuka (tanpa sinar matahari) kemudian dihaluskan dengan blender untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

2. Ekstraksi

Serbuk spons *C. reinwardtii* sebanyak 3,60 kg dimaserasi dengan metanol selama 1 x 24 jam pada suhu kamar, proses ini dilakukan tiga kali. Kemudian disaring menggunakan penyaring Buchner dan pelarutnya dipisahkan melalui evaporasi hingga diperoleh ekstrak metanol kering yang kemudian ditentukan beratnya. Ekstrak metanol diekstraksi cair-cair dengan pelarut pada kepolaran yang ditingkatkan mulai dari n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak setiap partisi dievaporasi, ditentukan beratnya dan dianalisis dengan KLT

3. Isolasi

Setiap hasil partisi difraksinasi menggunakan KKV menjadi beberapa fraksi dimana eluen yang digunakan dapat diketahui berdasarkan hasil analisis KLT. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian dimonitor dengan KLT dan fraksi yang mempunyai nilai Rf yang sama digabung menjadi satu fraksi utama kemudian dievaporasi hingga kering dan ditentukan beratnya serta diuji bioaktivitasnya terhadap benur udang *A. salina*.

Proses fraksinasi dari fraksi non aktif terhadap *A. salina* dilakukan berulang kali hingga diperoleh isolat murni menggunakan KKT atau KKG dengan eluen yang sesuai dan selanjutnya diuji bioaktivitasnya.

4. Uji bioaktivitas

Uji bioaktivitas yang digunakan adalah BST yang dilakukan terhadap benur udang *A. salina*. Uji ini mempunyai korelasi positif dengan uji-uji sekunder yang lain, seperti sebagai anti-tumor sel murin leukemia P-388 maupun anti-kanker (Mayer, 1982). Prosedur uji aktivitas sebagai berikut: 1 mg sampel dalam tabung ependorf dilarutkan dengan DMSO sebanyak 100 μ L kemudian diencerkan dengan 150 μ L aquabides. Dari pengenceran tersebut diambil 200 μ L diencerkan kembali dengan 600 μ L aquabides. Selanjutnya pengenceran dilakukan dalam mikroplate dengan variasi konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; dan 7,8 μ g/mL untuk tiap lubang pada mikroplate dan dilakukan secara triplo.

Benur udang *A. salina* yang berumur 48 jam dipipet sebanyak 100 ? L dengan jumlah benur 7-15 ekor lalu dimasukkan pada tiap lubang pada mikroplate yang berisi sampel, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Perlakuan ini juga dilakukan pada kontrol sebagai kontrol negatif. Setelah 24 jam jumlah benur udang yang mati dan yang hidup pada tiap lubang dihitung. Data jumlah rata-rata udang yang mati dan jumlah total udang pada tiap variasi konsentrasi sampel kemudian dimasukkan dalam program komputer "Bliss method" untuk menentukan nilai LC_{50} , pengeceran tambahan mungkin diperlukan untuk zat yang sangat aktif (Mayer, 1982).

5. Penentuan struktur

Penentuan struktur senyawa dilakukan berdasarkan pengukuran instrumen UV, IR, dan NMR terhadap senyawa murni yang diperoleh.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Ekstraksi

Maserasi serbuk spons *Clathria reinwardtii* menghasilkan ekstrak metanol kering sebanyak 126,25 gram (Lampiran 5). Partisi ekstrak tersebut dengan pelarut n-heksan, kloroform (CHCl₃), dan etil asetat (EtOAc) diperoleh ekstrak kering dengan berat berturut-turut 27; 16; dan 2,80 g.

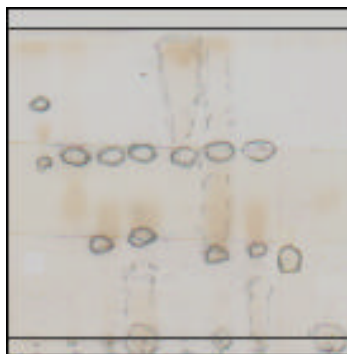
2. Isolasi dan uji bioaktivitas

Ekstrak kering dari n-heksan, CHCl₃, dan EtOAc diuji bioaktivitasnya dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2. Menurut Anderson (1990) untuk fraksi yang digolongkan tidak aktif terhadap benur udang *A. salina* memiliki nilai LC₅₀ > 500 µg/mL, maka ketiga fraksi tersebut tergolong fraksi yang non aktif.

Tabel 2; Berat dan nilai aktivitas (LC_{50}) ekstrak n-heksan, kloroform, dan etil asetat

| No | Ekstrak | Berat (g) | Aktivitas (LC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$) |
|----|-------------|-----------|--|
| 1. | n-Heksan | 27,00 | > 1000 |
| 2. | Kloroform | 16,00 | 589,01 |
| 3. | Etil asetat | 2,80 | > 1000 |

Ekstrak n-heksan selanjutnya difraksinasi dengan KKV yang dikemas dengan Si gel GF₂₅₄ 7730, menggunakan eluen yang sesuai dari hasil analisis KLT, yaitu perbandingan EtOAc : n-heksan (10 : 90 % v/v) (Lampiran 6), selanjutnya ditingkatkan kepolarannya dengan menambahkan EtOAc, aseton, dan metanol. Pada tahap ini diperoleh sembilan fraksi utama A-I (Gambar 5), yang merupakan gabungan fraksi-fraksi dengan Rf yang sama dari hasil fraksinasi. Fraksi-fraksi tersebut diuji bioaktivitasnya menggunakan benur udang *A. salina* Leach dengan metode BST. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.



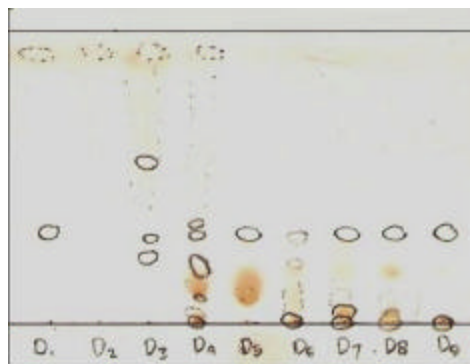
Gambar 5, Kromatogram 9 fraksi utama n-heksan (A-I)

Tabel 3 Berat dan nilai aktivitas (LC_{50}) fraksi utama hasil fraksinasi ekstrak n-heksan

| Fraksi | Berat (mg) | Nilai Aktivitas (LC_{50}) (μ g/mL) | Keterangan |
|--------|------------|---|------------|
| A | 147,50 | >1000 | Non aktif |
| B | 407,20 | >1000 | Non aktif |
| C | 140,00 | >1000 | Non aktif |
| D | 970,00 | >1000 | Non aktif |
| E | 132,00 | >1000 | Non aktif |
| F | 617,60 | >1000 | Non aktif |
| G | 410,00 | >1000 | Non aktif |
| H | 3200,00 | 86,34 | Aktif |
| I | 200,00 | >1000 | Non aktif |

Berdasarkan data uji bioaktivitas fraksi n-heksan, ada delapan fraksi yang non aktif yakni fraksi A, B, C, D, E, F, G, I karena memiliki nilai $LC_{50} > 500 \mu$ g/mL.

Sembilan fraksi gabungan (D_1 - D_9) diperoleh dari 18 fraksi hasil fraksinasi fraksi utama D dengan teknik KKT, menggunakan eluen dengan perbandingan EtOAc : n-heksan (5 : 95 % v/v) (Lampiran 7a), selanjutnya ditingkatkan kepolarannya dengan menambahkan EtOAc, aseton, dan metanol (Gambar 6).

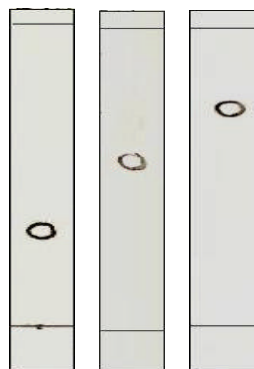


Gambar 6, Kromatogram 9 fraksi gabungan hasil fraksinasi fraksi D

Fraksi D₁ berupa padatan bening sebanyak 8,50 mg difraksinasi melalui KKG dengan eluen EtOAc : n-heksan (5 : 95 % v/v) (Lampiran 7b) dan diperoleh 17 fraksi yaitu D_{1.1}-D_{1.17} (Gambar 7). Senyawa (1) diperoleh dari fraksi gabungan D_{1.7}-D_{1.10} (D_{1.2}), berupa kristal bening sebanyak 1,90 mg. Senyawa ini berpendar warna hijau muda di bawah sinar UV, larut dalam n-heksan dan kloroform serta terlihat homogen pada kromatogram hasil analisis KLT dengan tiga macam sistem eluen (Gambar 8). Hal ini berarti senyawa tersebut telah murni dan dapat dikategorikan ke dalam senyawa fenolik sesuai dengan hasil uji kualitatif yang menunjukkan positif senyawa fenolik. Uji BST tidak dilakukan terhadap senyawa (1) karena berat sampel yang diperoleh sangat sedikit, sehingga tidak diketahui apakah senyawa ini aktif atau non aktif.



Gambar 7, Kromatogram 17 fraksi hasil fraksinasi fraksi D₁

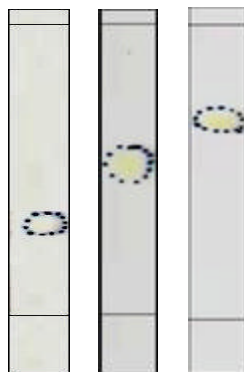


Gambar 8, Kromatogram fraksi D_{1,2} dengan tiga macam sistem eluen

- R_f 0,31 : Kloroform – n-heksan (70 : 30 % v/v)
- R_f 0,53 : EtOAc – n-heksan (12,5 : 87,5 % v/v)
- R_f 0,73 : EtOAc – Kloroform (5 : 95 % v/v)

Fraksi D₅ direkristalisasi dengan metanol menghasilkan senyawa (2) yang berbentuk kristal jarum berwarna putih sebanyak 30,40 mg dengan titik leleh 132-133 °C. Senyawa tersebut tidak berpendar di bawah sinar UV, namun dengan menggunakan pereaksi penampak noda serium sulfat menunjukkan noda mula-mula berwarna biru terang

kemudian menjadi coklat tua dan selanjutnya memudar. Hal ini berarti bahwa senyawa (2) termasuk dalam senyawa non fenolik, larut dalam kloroform. Senyawa ini juga diperoleh sebanyak 80,00 mg dari hasil rekristalisasi fraksi $F_{10.6}$ yang merupakan gabungan dari fraksi $F_{10.15}$, $F_{10.16}$, dan $F_{10.17}$. Selanjutnya senyawa (2) yang diperoleh dari kedua fraksi yang berbeda tersebut digabung sehingga berat total senyawa (2) sebanyak 110,40 mg. Kemurnian senyawa ini dibuktikan melalui analisis KLT yang menunjukkan noda tunggal dengan tiga macam sistem eluen (Gambar 9).



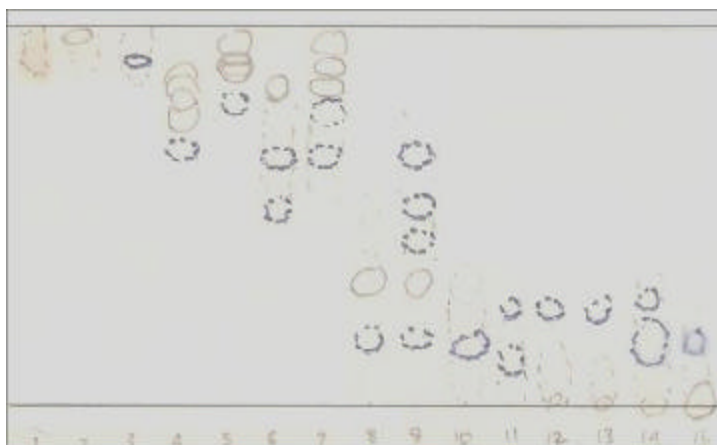
Gambar 9, Kromatogram fraksi D_5 dan fraksi $F_{10.6}$ dengan tiga macam sistem eluen

- Rf 0,32 : Kloroform – n-heksan (70 : 30% v/v)
- Rf 0,52 : EtOAc – n-heksan (12,5 : 87,5 % v/v)
- Rf 0,68 : EtOAc – Kloroform (5 : 95 % v/v)

Berdasarkan hasil KLT senyawa (2) yang dibandingkan dengan standar β -sitosterol pada tiga sistem eluen (Lampiran 8), senyawa tersebut memberikan nilai Rf yang sama. Hal ini berarti senyawa (2) diduga adalah β -sitosterol dan dari hasil uji kualitatif dengan pereaksi Liebermann Burchard menunjukkan positif steroid. Bioaktivitas

senyawa (2) tidak dapat ditentukan karena senyawa ini tidak larut dalam larutan uji yang digunakan.

Ekstrak CHCl_3 difraksinasi dengan KKV yang dikemas dengan Si gel GF₂₅₄ 7730, menggunakan eluen yang sesuai dari hasil analisis KLT, yaitu perbandingan EtOAc : n-heksan (65 : 35 % v/v) (Lampiran 9), selanjutnya ditingkatkan kepolarannya dengan menambahkan EtOAc, aseton, dan metanol. Pada tahap ini diperoleh 14 fraksi utama A-N (Gambar 10). Fraksi-fraksi tersebut diuji bioaktivitasnya menggunakan benur udang *A. salina* Leach dengan metode BST. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.



Gambar 10, Kromatogram 14 fraksi utama kloroform

Tabel 4; Berat dan nilai aktivitas (LC_{50}) fraksi utama hasil fraksinasi ekstrak $CHCl_3$

| Fraksi | Berat (mg) | Nilai Aktivitas (LC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$) | Keterangan |
|----------|------------|--|------------------|
| A | 7,60 | > 1000 | Non aktif |
| B | 346,50 | > 1000 | Non aktif |
| C | 127,60 | 107,30 | Aktif |
| D | 283,30 | 44,75 | Aktif |
| E | 126,80 | 48,51 | Aktif |
| F | 249,60 | 89,75 | Aktif |
| G | 417,80 | 78,04 | Aktif |
| H | 395,40 | 65,82 | Aktif |
| I | 324,10 | 89,71 | Aktif |
| J | 349,80 | 119,64 | Aktif |
| K | 109,50 | 128,08 | Aktif |
| L | 210,40 | 21,36 | Aktif |
| M | 1157,70 | 502,94 | Non Aktif |
| N | 1030,20 | > 1000 | Non Aktif |

Berdasarkan hasil uji BST, ada empat fraksi yang tergolong fraksi non aktif, yakni fraksi A, B, M, dan N.

3. Pengukuran spektroskopi

Senyawa (1) diperoleh berupa kristal tak berwarna (bening). UV (MeOH) λ_{max} : 224,5 dan 273,3; spektrum IR (KBr) $\lambda_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3450 (O-H), 3050 (C-H aromatik), 2920 dan 2850 (C-H alifatik), 1675 dan 1580 (C=C aromatik), 1460 dan 1380 (CH_2 dan CH_3); spektrum $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ_{H} 0,8-2 (*m*) CH alkana; δ_{H} 4,2 (*m*), δ_{H} 5,1 (*d*, $J = 7,35 \text{ Hz}$)

H-C=C alken; δ_{H} 7,51 (*t*, $J = 9,2$ Hz), δ_{H} 7,53 (*dd*, $J = 9,2$ dan 2,45 Hz), dan δ_{H} 7,70 (*dd*, $J = 9,2$ dan 2,45 Hz) H-C=C aromatik.

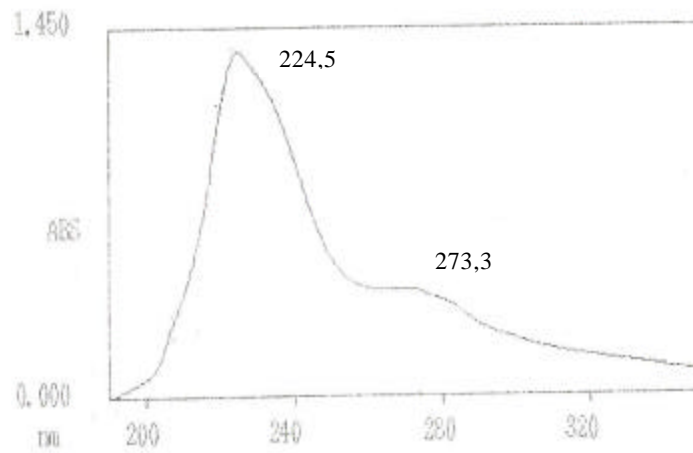
Senyawa (**2**) diperoleh sebagai kristal berbentuk jarum berwarna putih dengan titik leleh 132-133 °C; spektrum IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3417 (OH), 1053 (C-O), 2939, 2897, dan 2862 (C-H alifatik), 1662 (C=C), 1460 dan 1375 (CH₂ dan CH₃).

B. Pembahasan

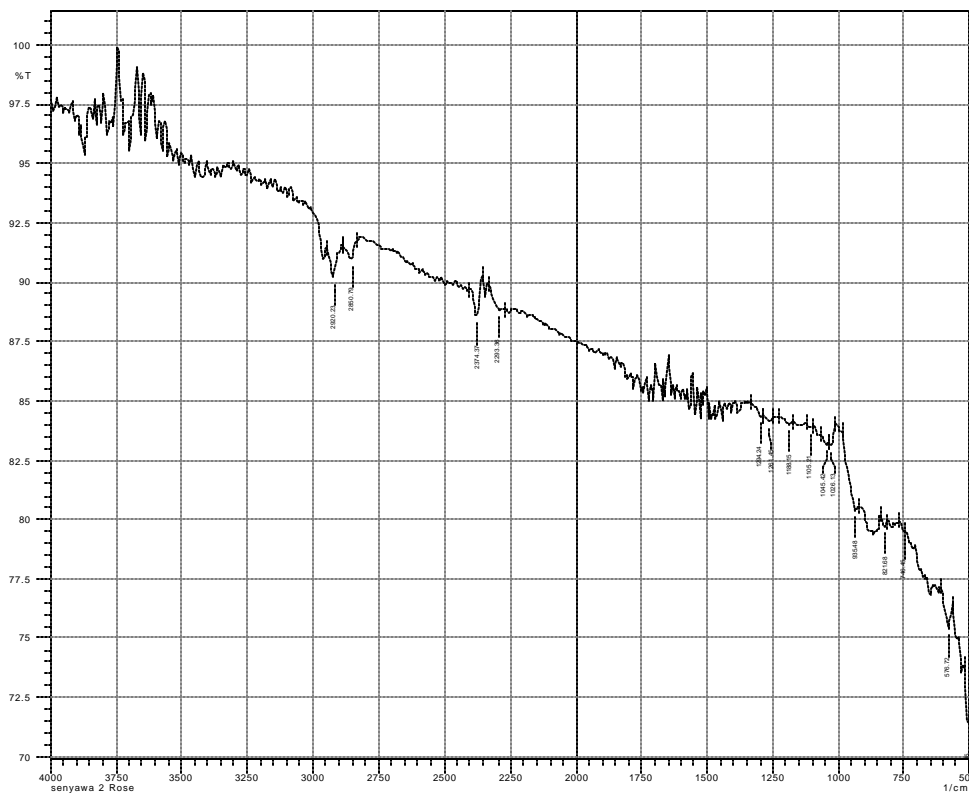
Pada ekstraksi spons *Clathria reinwardtii* melalui beberapa tahap fraksinasi yang dilanjutkan dengan proses pemurnian fraksi utama, dihasilkan 2 jenis senyawa sebagai isolat tunggal. Pengujian bioaktivitas terhadap benur udang *A.salina* juga dilakukan pada fraksi-fraksi utama.

Senyawa (**1**) diperoleh berupa kristal tak berwarna (bening). Spot senyawa ini pada kromatogram hasil KLT berpendar hijau muda di bawah sinar UV yang mengindikasikan adanya kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi. Berdasarkan hal tersebut karakterisasi struktur senyawa ini dilakukan berdasarkan analisis spektrum UV, IR, dan NMR

Dari data spektrum UV (Gambar 11) diperoleh serapan maksimum pada λ_{max} 224,5 dan 273,3. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa (**1**) memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Selanjutnya spektrum IR dapat dilihat pada Gambar 12.



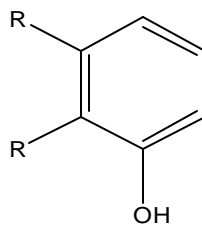
Gambar 11, Spektrum UV senyawa (1)

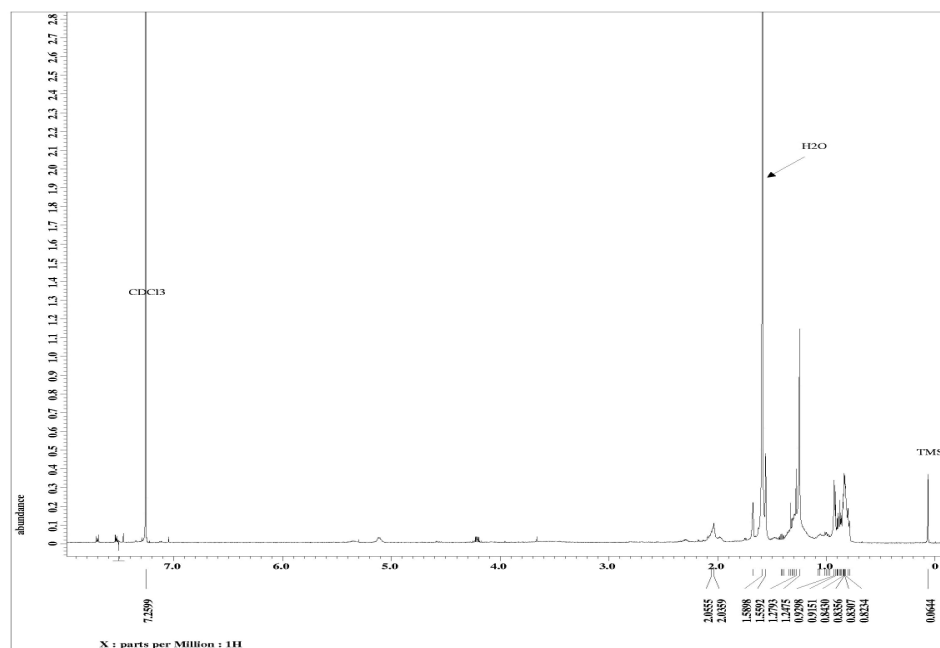


Gambar 12, Spektrum IR s enyawa (1)

Selanjutnya informasi mengenai senyawa (1) diperoleh dari spektrum Infra merah yang menunjukkan puncak pada serapan 3450 cm^{-1} sebagai serapan gugus OH, 3050 cm^{-1} sebagai serapan gugus C-H aromatik dan regang C=C aromatik pada serapan 1675 dan 1580 cm^{-1} , adanya serapan 2920 dan 2850 cm^{-1} sebagai regang C-H alifatik dengan tekukan CH_2 dan CH_3 pada serapan 1460 dan 1380 cm^{-1} .

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Gambar 13) menunjukkan adanya puncak-puncak serapan pada pergeseran kimia δ_{H} 0,8-2 (*m*) sinyal H untuk CH alkana; δ_{H} 4,2 (*m*) dan δ_{H} 5,1 (*d*, $J = 7,35\text{ Hz}$) sinyal H untuk H-C=C alken (Lampiran 10a); sinyal H untuk H-C=C aromatik pada δ_{H} 7,51 (*t*, $J = 9,2\text{ Hz}$), δ_{H} 7,53 (*dd*, $J = 9,2$ dan $2,45\text{ Hz}$) dan δ_{H} 7,70 (*dd*, $J = 9,2$ dan $2,45\text{ Hz}$) (Lampiran 10b). Data di atas mengindikasikan bahwa senyawa (1) memiliki gugus alifatik dan gugus aromatik. Analisis spektroskopi C-NMR dan NMR tiga dimensi lainnya tidak dilakukan terhadap senyawa (1) karena berat sampel yang diperoleh sangat sedikit. Kemungkinan senyawa tersebut mempunyai struktur dengan kerangka sebagai berikut:

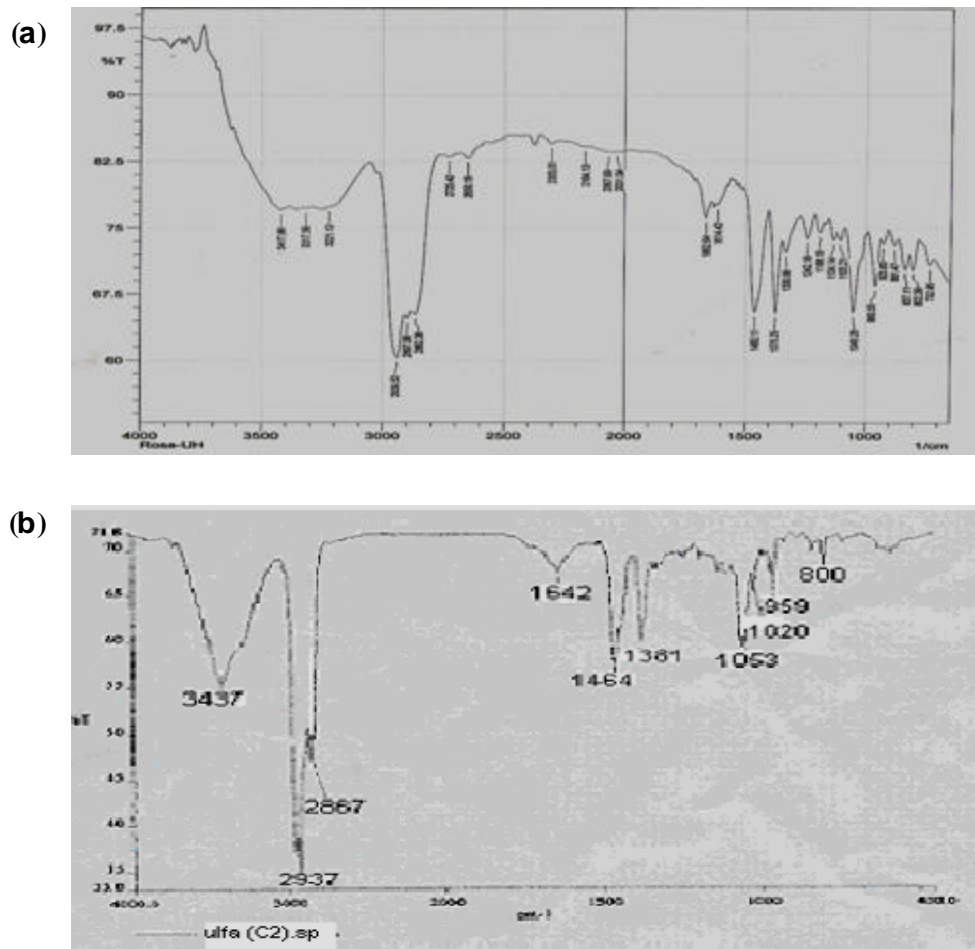




Gambar 13, Spektrum ¹H-NMR senyawa (1)

Senyawa (2) diperoleh sebagai kristal putih berbentuk jarum dengan titik leleh 132-133 °C. Hasil uji kualitatif senyawa (2) dengan reaksi Liebermann Burchard menghasilkan warna hijau biru yang menunjukkan bahan uji positif steroid. Data tersebut didukung oleh data spektrum Infra merah (IR) dimana terdapat serapan maksimum pada daerah 3417 cm⁻¹ untuk gugus hidroksil dan serapan pada 1053 cm⁻¹ untuk vibrasi uluran ikatan C-O. Serapan pada 2939, 2897, dan 2862 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus C-H alifatik, serta serapan tekukan dari gugus metilen dan metil masing-masing pada 1460 dan 1375 cm⁻¹. Data-data ini menguatkan perkiraan senyawa (2) termasuk steroid yang mengandung banyak ikatan C-H alifatik. Sementara serapan pada daerah 1662 cm⁻¹ memberi isyarat adanya ikatan rangkap C=C. Dari spektrum

perbandingan senyawa (2) dengan spektrum standar β -sitosterol diperoleh adanya kemiripan (Gambar 14).

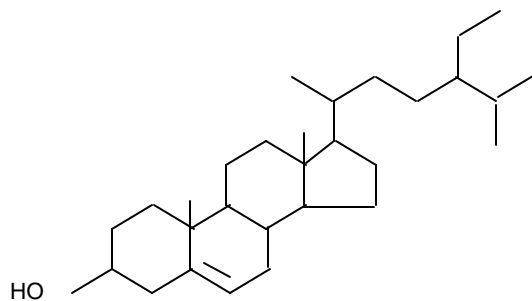


Gambar 14, (a) Spektrum IR senyawa (2),
(b) Spektrum IR pembanding β -sitosterol (Ulfa, 2006)

Table 15; Perbandingan data spektrum IR senyawa (2) dan β -sitosterol

| Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) Senyawa (2) | Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) β -sitosterol | Dugaan Gugus Fungsi |
|--|--|---|
| 3417 | 3437 | Regangan ulur gugus OH |
| 2939 | 2937 | Regangan ulur gugus C-H alifatik |
| 2897 | 2867 | Regangan ulur gugus C-H alifatik |
| 1662 | 1642 | Regangan ulur C=C |
| 1460 | 1464 | Tekukan gugus C-H alifatik dari CH ₂ |
| 1375 | 1381 | Tekukan gugus C-H alifatik dari CH ₃ |
| 1053 | 1053 | Regangan ulur gugus C-O |

Berdasarkan hasil analisis KLT senyawa (2) yang dibandingkan dengan standar β -sitosterol pada tiga sistem eluen (Lampiran 8), senyawa tersebut memberikan nilai R_f yang sama. Hal ini membuktikan bahwa isolat senyawa (2) identik dengan β -sitosterol. Adapun struktur β -sitosterol dapat dilihat pada Gambar 15.

**Gambar 15,** Struktur molekul β -sitosterol

?-sitosterol merupakan satu golongan senyawa steroid. Senyawa ini terbentuk dari asam asetat melalui jalur asam mevalonat kemudian mengalami beberapa reaksi kondensasi, siklisasi, dan sebagainya hingga terbentuk senyawa antara atau *intermediate*. Penggunaan senyawa-senyawa aktif farmakologik yang berasal dari alam seperti turunan steroid, ?-sitosterol sangat penting artinya ditinjau dari segi kesehatan karena efek sampingnya relatif kecil dibanding dengan senyawa sintetik. Senyawa ?-sitosterol memiliki efek farmakologis yaitu mampu menghambat kerja enzim yang mengkonversi testosteron menjadi dehidrotestosteron (DHT) yang merupakan penyebab terjadinya kanker prostat (Renai Sante dalam Sapar, 2004). Selain itu menurut Yuk (2007), ?-sitosterol merupakan senyawa yang efektif digunakan dalam penyembuhan penyakit asma, sehingga memungkinkan senyawa ini untuk dikembangkan sebagai obat terapi penyakit alergi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Hasil interpretasi data fisik dan spektrum (UV, IR, dan NMR) menghasilkan 2 jenis senyawa, yaitu senyawa (1) golongan fenolik dan senyawa (2) diduga β -sitosterol. Kedua senyawa tersebut berasal dari ekstrak n-heksan, fraksi non aktif terhadap benur udang *A. salina*.

B. Saran

Beberapa hal dalam penelitian ini yang dianggap perlu disarankan, yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap fraksi etil asetat.
2. Agar dapat melakukan proses isolasi sampai dengan proses identifikasi struktur, sebaiknya sampel yang digunakan lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Amir, I. 1991. Fauna Spons (Porifera) dari Terumbu Karang Genteng Besar, Pulau-Pulau Seribu. *Oseanologi di Indonesia*. **24**. 41-54.
- Amir, I., dan Budiyanto. 1996. Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum. *Oseana*. **2**. 15-31.
- Anderson, J. E., Goetz, C. M., and Mclaughlin, J. L. 1990. A Blind Comparison of Simple Banch-top Bioassay and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumour Prescreen. *Phytochemical Analysis*. **6**. 107-111.
- Anonim. 2006. *Mencari Obat Mujarab Laut*, (Online), ([http://www. Forek. or. id](http://www.Forek.or.id), diakses 18 Februari 2007).
- Anonim a. 2007. *Phylum Porifera*, (Online), (<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Porifera.html>, diakses 18 Februari 2007).
- Anonim b. 2007. *Sponge*, (Online), (http://en.wikipedia.org/wiki/Sea_sponge, diakses 18 Februari 2007).
- Chang, L. C., Whittaker, N. F. Bewley, C. A. 2003. Crambescidin 826 and Dehydrocrambine A: New Polycyclic Guanidine Alkaloids from The Marine Sponge *Monanchora* sp. that hhibit HIV-1 Fusion. *Journal Natural Product* **66**. 1490–1494.
- Davis R. A., Mangalindan G. C., Bojo, Z P. 2004. Microcionamides A and B, Bioactive Peptides from The Philippine Sponge *Clathria* (*Thalysias*) *abietina*. *Journal Organic Chemistry*. **69**. 4170-6
- Fahmi, R. 2002. *Uji Fitokimia Kandungan Metabolit Sekunder (Untuk Survey di Lapangan)*. Makalah disajikan dalam Workshop Peningkatan Sumberdaya Manusia Kajian Kimia Organik Bahan Alam Hayati dan Pelestarian Hutan, Padang 21-27 Juli 2002.
- Hadi, S., and Bremner, J. B. 2001. Initial Studies on Alkaloids from Lombok Medicinal Plants. *J. Molecules*. **6**. 117-129.
- Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **2**. 127 – 133.

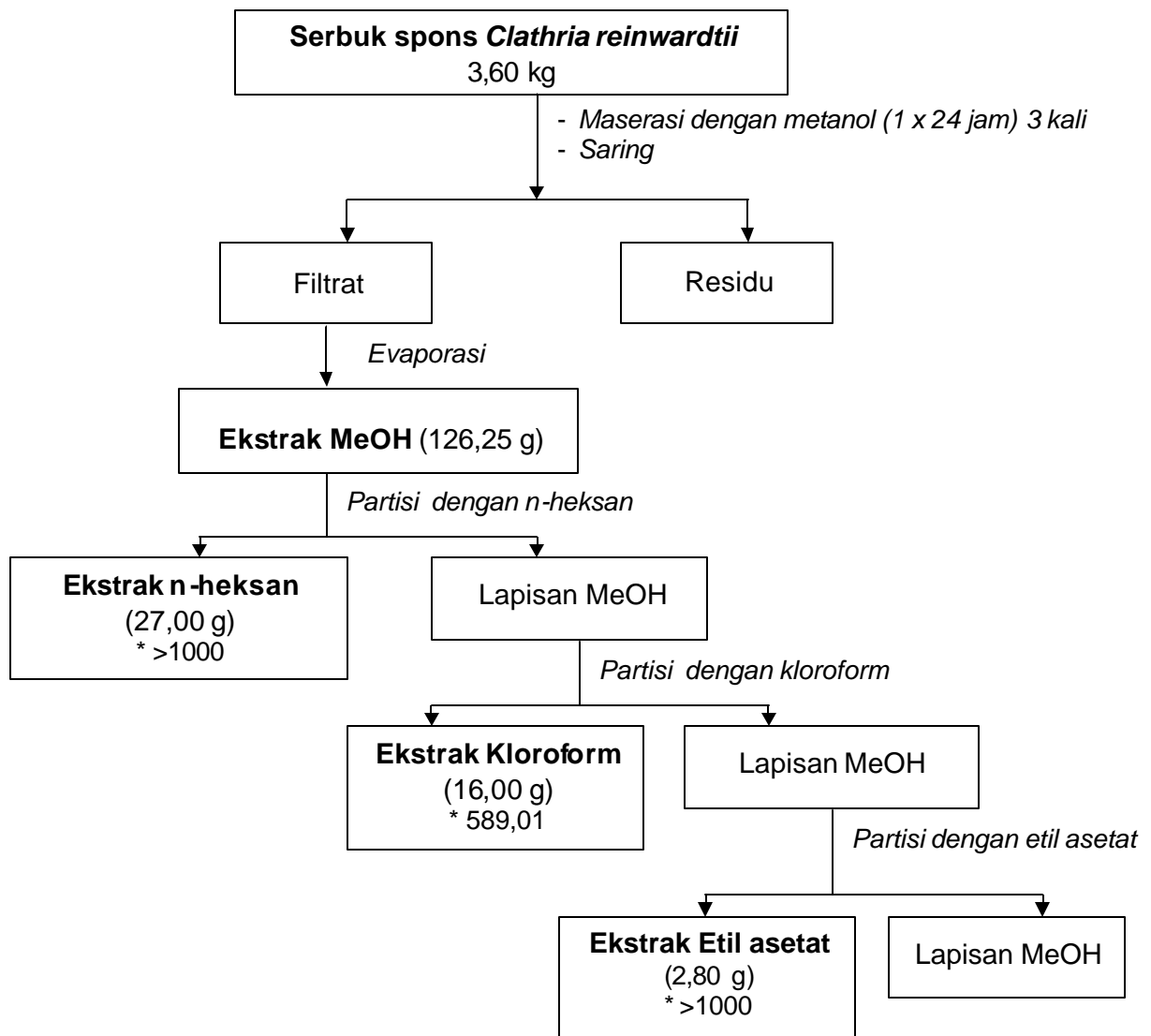
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia; Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. ITB. Bandung.
- Haris, A. 2001. *Hubungan Karakteristik Lingkungan dengan Ciri Khas Kimiawi Senyawa Terpen Karang Lunak *Sinularia Flexibilis*, Quoy and Gaimard (*Octocorallia: Anacea*) di Perairan Pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan*, (Online), (http://www.hayati-ipb.com/users/rudvct/indiv2001/a_haris.htm, diakses 25 Februari 2007).
- Higa, T., Junichi, T., Ikuko, I., Ohtani, Musri, M., Michael, C. Roy, and Ikuma K. 2001. Bioactive Compound of Coral Reef Invertebrates. *Pure Appl. Chem.* **73**. 3: 589–593.
- Hooper, J. N. A. 1997. *Guide to Sponge Collection and Identification*. Version March. Queensland Museum-South Brisbane.
- Hooper, J. N. A. and Van Soest, R. W. M. 2002. *Systema Porifera, A Guide to The Classifications of The Sponges*, (Online), (<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&jd=190616>, diakses 12 Mei 2007).
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., dan Morston, A. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif; Penggunaan pada Isolasi Senyawa Bahan Alam*. ITB. Bandung.
- Ireland, C. M., Molinski, T. F., Roll, D. M., Zabriskie, T. M., McKee, T. C., Swersey, J. C. and Foster, M. P. 1989. Natural Product Peptides From Marine Organisms. In: Schuer P.J. (ed). *Bioorganic Marine Chemistry*. **62**. 1-27.
- Kobayashi, M. dan Rachmaniar, R. 1999. Overview of Marine Natural Product Chemistry. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Lembaga Ilmu Pengetahuan, Jakarta 14-15 Oktober 1998. 151-158.
- Konig, G. M., and Wright, A. D. 1999. *Cymbastella Hoopert and Amphimedon Terpenensis: Where Do They Really Belong?* *Memoir of The Queensland Museum*. **44**. 281-288.
- Kozloff, E. N. 1990. Invertebrates. *Saunders College Publishing*. 73-92.
- Ledroit, V., Debitus, C., Lavaud, C., Massiot, G. 2003. Jaspines A and B: Two New Cytotoxic Sphingosine Derivatives from The Marine Sponge *Jaspis* sp.. *Tetrahedron Lett.* **44**. 225-8

- Mayer, N., Ferriginii, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, D. E., Nichols, D., E., McLaughin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Med.* **45**. 31.
- McCarthy, P. J., Pitts, T. P., Gunawardana, G. P., Kelly-Borges, M., Pomponi, S.A. 1992. Antifungal Activity of Meridine A Natural Product from The Marine Sponge Corticium sp. *Journal Natural Product.* **55**. 1664–68.
- McLaughlin, J. L., Chang, C. J., and Smith, D. L. 1991. Benchtop: Bioassay for the Discovery of bioactive Natural Products an Update. *in studies in Natural Products Chemistry.* 1-10.
- Muliani, Suryati, E., Tompo, A., Parenrengi, A., Rosmiati. 1998. Isolasi Bioaktif Bunga Karang Sebagai Fungisida dan Benih Udang Windu Penaeus monodon. *Jurnal Perikanan Indonesia.* **2**. 2.
- Muniarsih, T. dan Rachmaniar, R. 1999. *Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Spons Aaptos aaptos dari Kepulauan Spermonde dengan Spektroskopi Massa*. Puslitbang Oseonologi LIPI. Jakarta
- Munro, M. H. G., Luibrand, R. T., and Blunt, J. W. 1989. The Search for Antiviral and Anticancer Compounds from Marine Organisms. *in Scheuer PJ (ed). Bioorganic Marine Chemistry.* **1**. 194-176.
- Noor, A. 2007. *Riset Kelautan Berorientasi Terapan: Keperluan Mendesak Bagi Kawasan Timur Indonesia*. Kongres Ilmu Pengetahuan Wilayah untuk Kawasan Timur Indonesia. Pusat Kegiatan Penelitian Unhas. Makassar.
- Pettit, G. R., Xu J. P., Chapuis J. C. 2004. Antineoplastic Agents. 520. Isolation and Structure of Irciniastatin A and B from The Indo-Pacific Marine Sponge Ircinia ramosa. *Journal Medical Chemistry.* **47**. 1149-52.
- Phuwapraisirisan, P., Matsunaga, S., Fusetani, N., Chaitanawisuti, N., Kritsanapuntu, S., Menasveta, P., 2003. Mycaperoxide H, A New Cytotoxic Norseterterpene Peroxide from A Thai Marine Sponge Mycale sp. *Journal Natural Product* **66**. 1039-40.
- Proksch, P. 1999. Pharmacological Active Natural Product from Marine Invertebrate and Associated Microorganism. Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan I '98. Lembaga Ilmu Pengetahuan, Jakarta 14-15 Oktober 1998. 33-40.

- Reseck, J. Jr. 1988. *Marine Biology*. Second Edition. A reston Book. Prentice hall. Englewood Cliff: New Jersey.
- Riseley, R. A. 1971. *Tropical Marine Aquaria*. The Natural System. Ruskin Hause Museum Street. London.
- Romimohtarto, K. dan Sri, J. 2001. *Biologi Laut Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut*. Djambangan. Jakarta.
- Rudi, A., Yoseif, T., Loya, S., Hizi, A., Schleyer, M., Kashman, Y. 2001. Clathsterol, A Novel Anti-HIV-1 RTase Sulphated Sterol from The Sponge *Clathria* species. *Journal Natural Product*. **64**. 1451–1453.
- Sapar, A. 2003. *Uji Aktivitas, Isolasi, dan Penentuan Struktur Senyawa Metabolik Sekunder dari Spons *Biemma Triraphis* dan *Callyspongia* sp. Asal Pulau Kapodasang*. Tesis tidak diterbitkan. Program Pascasarjana Unhas. Makassar.
- Sapar, A., A. S. Kumanireng, N. de Voogd, Alfian N, 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif Dari Spons *Biemma Triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*. **6**. 1.
- Sardjoko. 1996. *Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas, Rancangan Rasional dalam Pengembangan Senyawa Bioaktif*. Makalah disajikan pada Seminar Perspektif Baru dalam Drug Discovery, Ujung Pandang.
- Sata, N. U., Matsunaga, S., Fusetani, N. 1999. Aurantosides D E and F: New Antifungal Tetramic Acid Glycosides from The Marine Sponge *Siliquariaspongia japonica*. *Journal Natural Product*. **62**. 969–71.
- Satari, R., 2003. *Produk Alam Laut sebagai Lead Compaund untuk Farmasi dan Pertanian*. Makalah disajikan pada Seminar Nasional Perspektif Baru dalam Drug Discovery, Makassar 26 Oktober 2003.
- Soediro, I. S. 1999. Produk Alam Hayati Bahari dan Prospek Pemanfaatannya Di Bidang Kesehatan dan Kosmetikan. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Lembaga Ilmu Pengetahuan, Jakarta 14-15 Oktober 1998. 41-52.
- Soest, R. W. M. van., and Braekman, J. C. 1999. Chemosystematics of Porifera: A Review. *Memoir of the Queensland Museum*. **44**. 569-589.

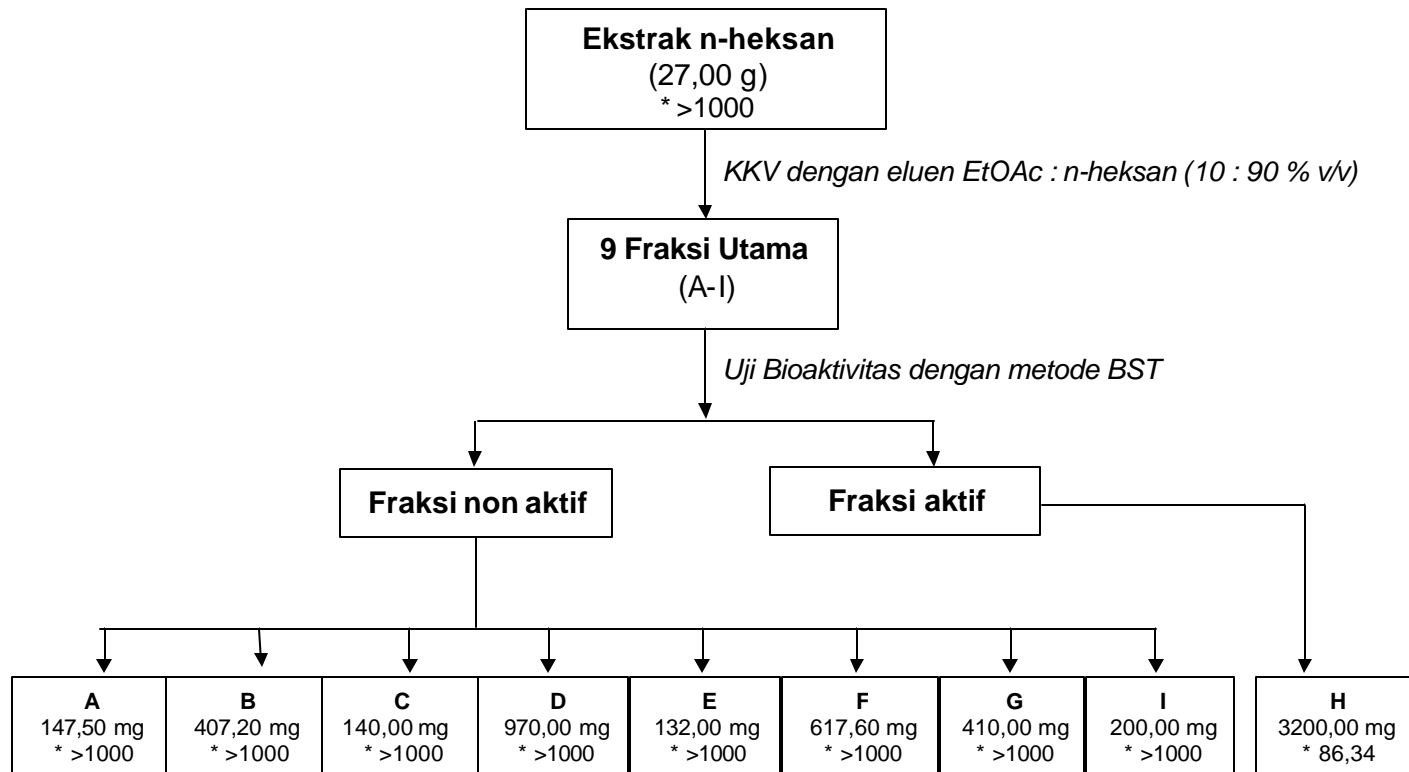
- Suparno. 2005. *Kajian Bioaktif Spons Laut (Forifera: Demospongia) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Bidang Farmasi* Makalah Pribadi Falsafah Sains. Pascasarjana IPB, Bogor.
- Supriyono, A. 2000. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Hymenidin dan Oroidin dari Spons *Axinella carteri* yang Berpotensi sebagai Antikanker. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. **2**, 2: 43-47.
- Suryati, E., Rosmiati, Parenrengi, A. 2005. *Sponge Bioactive For Bactericide, Fungicide and Antibiofouling in Coastal Aquaculture*. Riset Institute for Coastal Aquaculture, Maros.
- Tanaka, J., Masayuki, K., Chiaki, T., Hamad, H. Issa, Walter, B., Masahito O., Wahome, P. Githige, and T. Higa. 2005. Diverse metabolites of coral reef organisms. *Pure Appl. Chem.* **77**. 1: 83–89.
- Ulfa, M. 2006. *Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Paliasa (Kleinhovia hospita L.)*. Tesis tidak diterbitkan. Program Pascasarjana Unhas. Makassar.
- Voogd, N. de, Cleary, D. F., Hoeksema, B. W., Noor, A., Soest, R. W. 2006. Sponge Beta Diversity in The Spermonde Archipelago, SW Sulawesi, Indonesia. *Marine Ecology Progress Series*. **309**. 131-142.
- Wahyuono, S. 2003. *Mencari Obat Antikanker dari Spons Perairan Indonesia*, (Online), <http://www.pikiranrakyat.com/cetak/0503/22/cakrawala/lainnya02.htm>, diakses 18 Februari 2007).
- Warren, L. 1982. Encyclopedia of Marine Invertebrates. *In: Walls JG (ed)*. 15-28.
- Yuk J K., Woo, J S., Yun, C Y., Lee, J S., Kim, J H., Song, G Y., Yang, E. J., Hur, I. K., Kim, I. S. 2007. Effects of Lactose- β -sitosterol and β sitosterol on Ovalbumin-Induced Lung Inflammation in Actively Sensitized Mice. *International Immunopharmacology*. **7**. 1517-1527.
- Zenta, F., dan Kumanireng, A. S. 2002. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Jurusan Kimia. Universitas Hasanuddin. Makassar.

Lampiran 1. Bagan ekstraksi



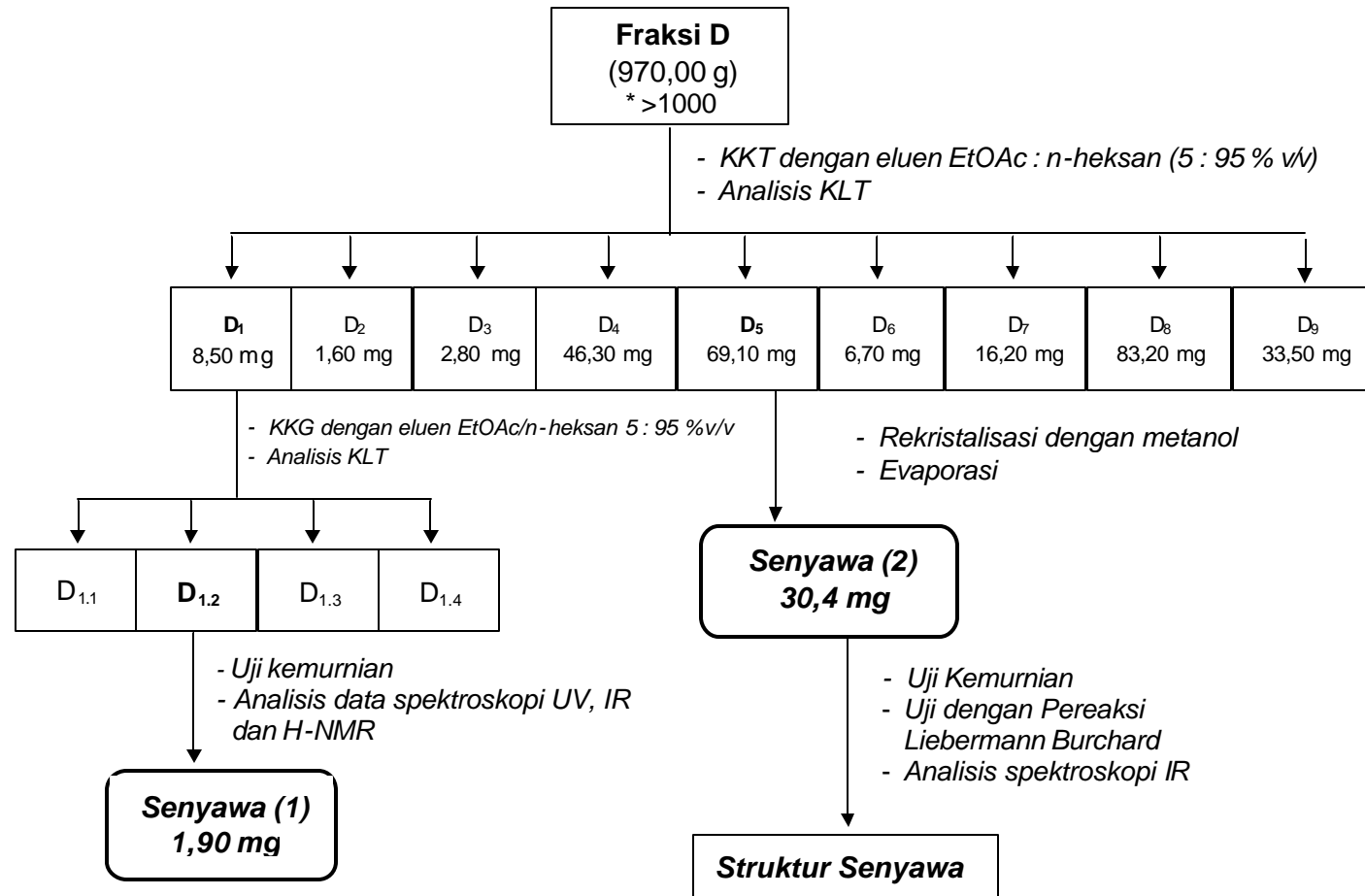
Ket : * nilai LC₅₀ dalam µg/mL

Lampiran 2. Bagan fraksinasi ekstrak n-heksan

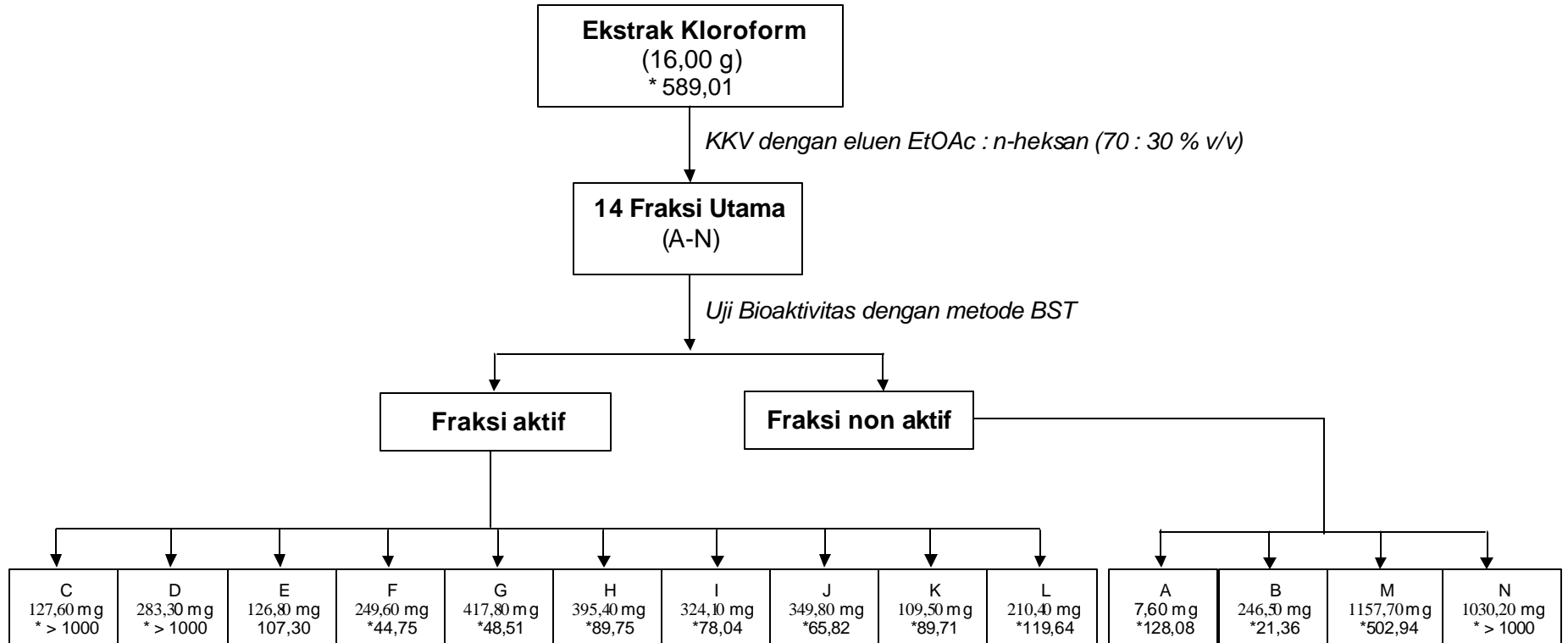


Ket : * nilai LC₅₀ dalam µg/mL

Lampiran 3. Bagan isolasi fraksi D



Lampiran 4. Bagan fraksinasi ekstrak kloroform



Ket : * nilai LC₅₀ dalam µg/mL

Lampiran 5. Kromatogram hasil maserasi

Eluen EtOAc : n-heksan (30 : 70% v/v)

Lampiran 6. Kromatogram eluen yang sesuai untuk ekstrak n-heksan



Eluen EtOAc : n-heksan (10 : 90 % v/v)

Lampiran 7a. Kromatogram eluen yang sesuai untuk fraksi D



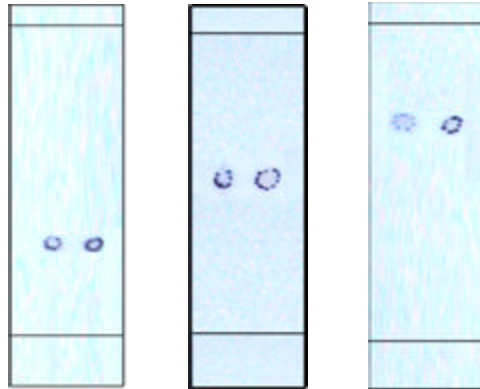
Eluen EtOAc : n-heksan (5 : 95 % v/v)

Lampiran 7b. Kromatogram eluen yang sesuai untuk fraksi D₁



Eluen EtOAc : n-heksan (5 : 95 % v/v)

Lampiran 8. Kromatogram senyawa (2) dan standar β -sitosterol dengan tiga macam sistem eluen



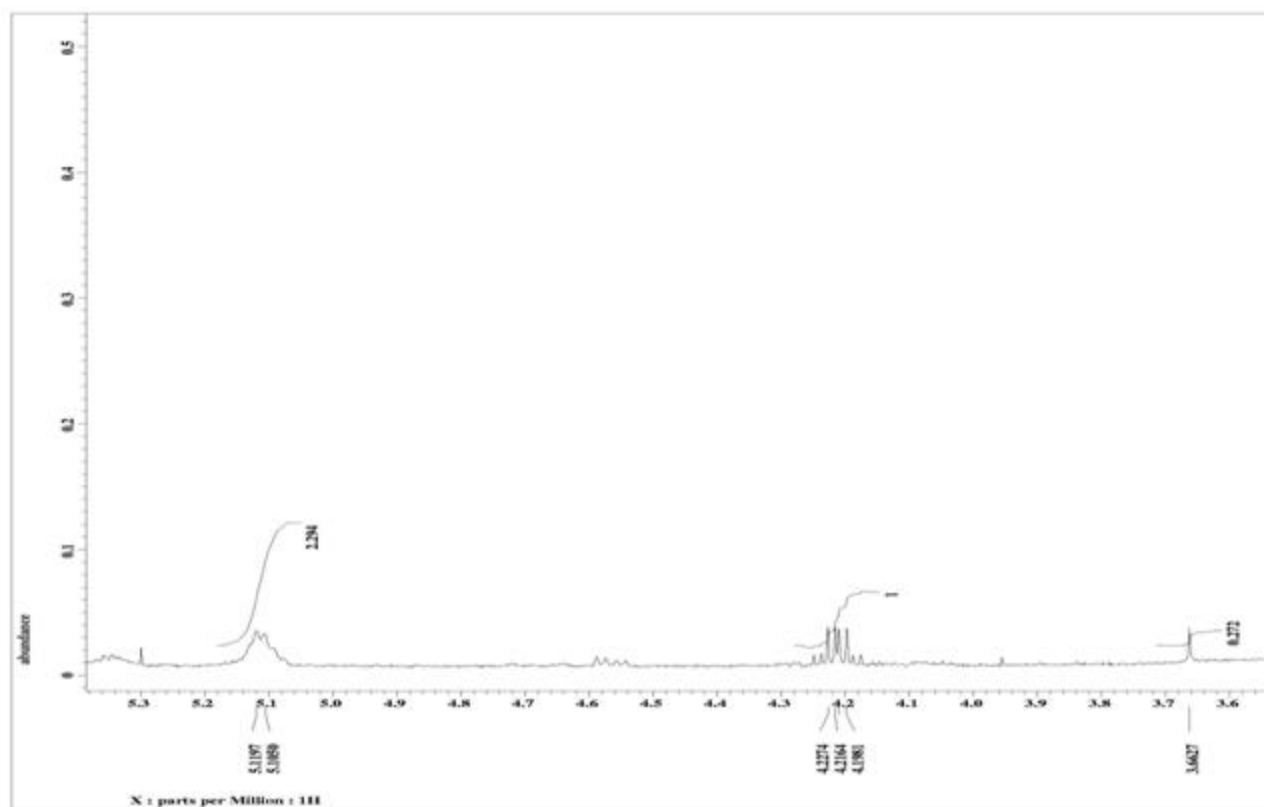
Tiga Macam Sistem Eluen

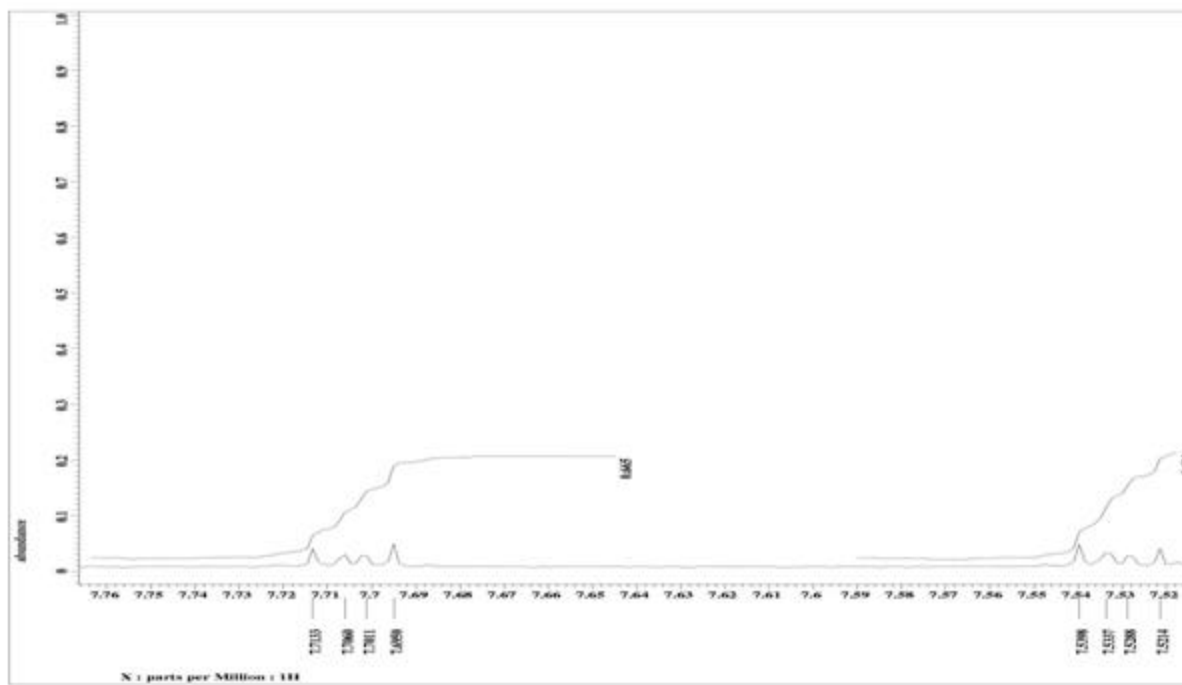
- | | |
|--------------------|--------------------------------|
| - Rf 0,30 : EtOAc | - n-heksan (12,5 : 87,5 % v/v) |
| - Rf 0,52 : Aseton | - n-heksan (17,5 : 82,5 % v/v) |
| - Rf 0,70 : EtOAc | - Kloroform (15 : 85 % v/v) |

Lampiran 9. Kromatogram eluen yang sesuai untuk ekstrak CHCl_3



Eluen EtOAc : n-heksan (65 : 35 % v/v)

Lampiran 10a. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa (1)

Lampiran 10b. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa (1)

Lampiran 11. Prosedur uji BST

A. Penyiapan Larutan Sampel (1000ppm)

1. Sampel (senyawa murni) ditimbang 1 mg, dilarutkan dalam 100 μL DMSO sambil diaduk.
2. Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan 150 μL akuades sehingga volume total menjadi 250 μL . Selanjutnya, ambil 200 μL larutan ini kemudian diencerkan dengan 600 μL akuades, volume total menjadi 800 μL dan konsentrasi menjadi :

$$\frac{200 \mu\text{L} / 250 \mu\text{L} \cdot 1\text{mg}}{800 \mu\text{L}} = \frac{0,8\text{mg}}{800 \mu\text{L}} = 1000 \text{ ppm}$$

B. Penyiapan Larutan Kontrol

Larutan kontrol dibuat sama dengan prosedur di atas tanpa menggunakan sampel.

C. Penyemaian Benur Udang

Bibit udang (\pm 1000 bibit) disemaikan dalam 100 μL larutan garam NaCl (3,8 %) dalam akuabides menggunakan bak semai selama 48 jam. Setelah itu, benur udang siap digunakan untuk uji toksisitas.

D. Prosedur

1. Dua plat mikro standar disiapkan, masing-masing untuk plat uji dan plat kontrol.
2. Ke dalam baris I dan II masing-masing tiga kolom dimasukkan 100 μ L larutan sampel pada plat uji dan 100 μ L larutan kontrol pada plat kontrol.
3. Larutan pada baris II diencerkan dengan 100 μ L aquades dan diaduk, kemudian dipipet kembali 100 μ L dimasukkan ke dalam baris III diencerkan kembali dengan 100 μ L aquabides sambil diaduk dan seterusnya dengan cara yang sama sampai baris terakhir.
4. Selanjutnya, ke dalam larutan sampel pada plat uji dan larutan kontrol pada plat kontrol ditambahkan 100 μ L larutan garam yang mengandung 7-15 benur udang, kemudian dibiarkan selama 24 jam. Sehingga konsentrasi larutan untuk masing-masing baris sebagai berikut, baris I = 500 ppm, II = 50% dari baris I, Baris III = 50% dari Baris II dan seterusnya.
5. Setelah itu, dihitung jumlah rata-rata benur udang yang mati dan yang hidup untuk setiap baris dari plat uji.
6. Harga LC_{50} senyawa ditentukan dengan menggunakan program *Bills Methode*.

Lampiran 12. Bagan kerja uji senyawa terpenoid, steroid, dan fenolik