

LAPORAN PENELITIAN

**SENYAWA ANTIFEEDANT DARI BIJI KOKOSAN
(*LANSIUM DOMESTICUM* CORR VAR. KOKOSAN),
HUBUNGAN STRUKTUR KIMIA
DENGAN AKTIVITAS ANTIFEEDANT**

Oleh

**Tri Mayanti, MSi (Ketua)
Dr. Ir. W. Daradjat Natawigena, MS (Anggota)
Prof. Dr. Ir. Roekmi'ati Tjokronegoro (Anggota)
Dr. Unang Supratman, MS (Anggota)
Desi Harneti, MSi (Anggota)**

**DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI,
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PELAKSANAAN PEKERJAAN PENELITIAN
NOMOR: 027/SPPP/PP/DP3M/IV/2005
TANGGAL 11 APRIL 2005
TAHUN ANGGARAN 2005**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PADJADJARAN
NOVEMBER, 2005**

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penggunaan pestisida sintesis menimbulkan banyak konsekuensi terhadap kesehatan dan lingkungan oleh karena hama-hama menjadi resisten dan resurjen, membinasakan parasit dan predator serta hewan berguna. Selain itu pencemaran udara, air, dan tanah menyebabkan banyak terjadinya kasus keracunan bahkan kematian. Melalui Inpres No.3/1986 pemerintah telah melarang dan membatasi peredaran sekitar 57 merk pestisida sintesis untuk tanaman tertentu, bahkan kebijakan tersebut diikuti dengan pengurangan subsidi pestisida secara bertahap. Supaya petani tidak dirugikan dan pertumbuhan produksi tidak terganggu tindakan ini diikuti oleh kebijakan lain yaitu mendorong penerapan pengendalian hama dan penyakit secara terpadu yang salah satu komponen pentingnya adalah pestisida nabati (Oka, 1993)

Pestisida nabati diketahui memiliki keunggulan-keunggulan yang dapat dikembangkan secara menguntungkan ditinjau dari segi efikasi, agro industri dan lingkungan hidup. Selain itu sifat insektisida yang nonselektif, munculnya resistensi pada serangga hama dan terjadinya ledakan populasi hama dengan biotip baru merupakan faktor utama bagi para ilmuwan untuk tetap berlomba-lomba mencari senyawa insektisidal baru (Meinwald, 1978).

Pada saat ini pengembangan pestisida nabati diarahkan pada penemuan senyawa-senyawa yang tidak hanya efektif dalam mengendalikan serangga tetapi juga mempunyai aktivitas yang selektif terhadap satu atau jumlah terbatas serangga fitofagoes. Latar belakang pemikiran ini adalah sasaran untuk mengurangi dampak ekologis lingkungan yang merugikan seandainya tiga kriteria yaitu: efektif, spesifik dan aman dapat serasi dengan prinsip pengelolaan serangga hama yang modern maka produk alami ini dapat memenuhi kriteria *agent* pengendali biorasional.

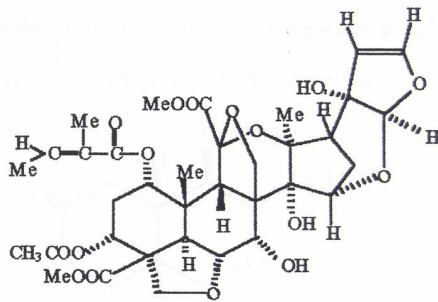
Agent pengendali biorasional dari produk alami dapat dibagi ke dalam dua kelompok. Kelompok pertama adalah yang mengubah pertumbuhan, perkembangan dan reproduksi serangga, disebut pengendali pertumbuhan serangga atau *insect growth regulator*. Kelompok kedua adalah yang mengubah perilaku serangga, termasuk ke dalam kelompok ini feromon, penolak (*repellent*), penarik (*attractant*), antimakan (*antifeedant*) dan stimulant serta penolak peletakan telur (*oviposisi*).

Terdapat anggapan bahwa yang memiliki prospek komersial yang baik adalah feromon dan *antifeedant* (Ruslan dkk, 1989) .

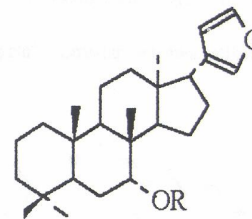
Keberadaan dan potensi senyawa *antifeedant* telah lama dikenal, terutama di Amerika Serikat terutama mulai 1930. Senyawa *antifeedant* didefinisikan sebagai suatu zat yang apabila diujikan terhadap serangga akan menghentikan aktivitas makan secara sementara atau permanen tergantung potensi zat tersebut (Miles, dkk., 1985). Senyawa *antifeedant* telah menjadi perhatian yang menarik sebagai salah satu alternatif dalam perlindungan tanaman pangan oleh karena senyawa ini tidak membunuh, mengusir atau menjerat serangga hama tetapi hanya menghambat makan (Tjokronegoro, 1987). Senyawa *antifeedant* juga banyak digunakan dalam bioteknologi tanaman guna menciptakan tanaman yang tahan terhadap serangan serangga hama (Russel, 1991).

1.2. Dasar Pemikiran

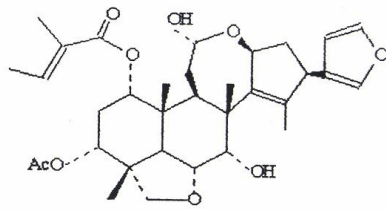
Senyawa antifeedant banyak ditemukan dari berbagai jenis tumbuhan, diantaranya adalah famili Meliaceae. Dari famili ini telah banyak diisolasi senyawa antifeedant diantaranya adalah azadirachtin dari *Melia azedarach* (Schwinger, 1983), hidroksitoonasilid dari *Toona ciliata*, volkensin dari *Melia volkensi* (Rajab, dkk, 1988), xymolin dari *Xylocarpus molluscensis* (Kubo dan Nakanishi, 1979)



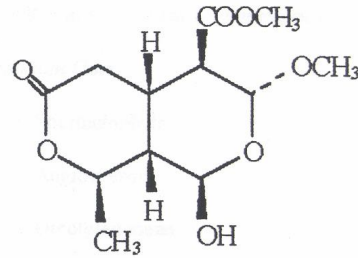
Gambar 2.1 Struktur Azadirachtin



Gambar 2.2 Rangka dasar struktur β -seco-tetraterpenoid



Gambar 2.4 Struktur Volkensin



Gambar 2.3 Struktur Xylomolin

Azadirachtin merupakan senyawa antifeedant yang cukup efektif dalam pengendalian hama. Senyawa ini memiliki daya kerja serta spektrum yang luas. Dengan hanya 50 gram biji nimba dapat dilindungi tanaman seluas satu hektar. Senyawa yang termasuk golongan terpenoid ini ditemukan dalam daun dan buah *Azadirachta indica* (nimba) dan *Melia azedarach* (mindir). Dari kedua tumbuhan tersebut telah berhasil diisolasi pula beberapa turunan vilasinin yang memperlihatkan aktivitas antifeedant terhadap kumbang Meksiko (*Epilachna varivestis*).

Kokossan (*L. domesticum* Corr var. kokossan) merupakan jenis tumbuhan dari famili yang sama dengan *Azadirachta indica* dan *Melia azedarach*, yaitu Meliaceae. Terdapat hubungan kemotaksonomi antara jenis-jenis tumbuhan dalam suatu famili dengan konstituen kimia yang dikandungnya. Oleh karena cukup banyak senyawa antifeedant yang telah ditemukan dari famili Meliaceae dan telah dilakukannya uji pendahuluan terhadap aktivitas antifeedant beberapa fraksi ekstrak biji kokossan maka dapat dirumuskan suatu hipotesis:

dalam ekstrak biji kokossan terkandung satu atau lebih senyawa antifeedant.

Aktivitas antifeedant dapat dijadikan suatu evaluasi awal untuk penemuan senyawa baru yang bersifat aktif antifeedant dari tumbuhan tersebut. Penemuan senyawa-senyawa baru yang dapat berfungsi sebagai pengendali hama dapat dilakukan dengan cara pemisahan menggunakan berbagai teknik ekstraksi dan kromatografi yang dipantau dengan uji hayati pada setiap tahap pengerjaannya. Senyawa aktif baru yang diperoleh diharapkan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai suatu senyawa yang potensial dan memiliki keunggulan untuk dapat diaplikasikan dalam bidang pertanian.

II. TINJAUAN PUSTAKA

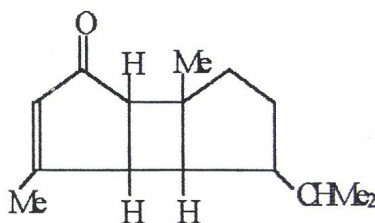
2.1. Tumbuhan Kokossan

Kokossan (*L. domesticum* Corr var. kokosan) merupakan tumbuhan tinggi yang termasuk dalam famili Meliaceae dan marga *Lansium*. Jenis ini memiliki tiga varietas yaitu duku, pisitan dan kokosan. Taksonomi *L. domesticum* Corr adalah sebagai berikut:

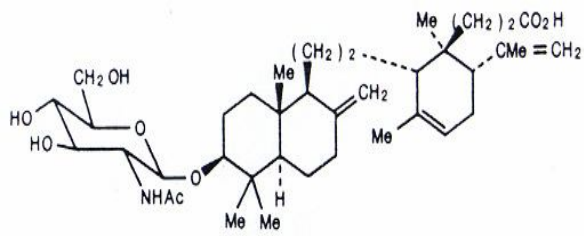
Divisi:	Spermatophyta
Subdivisi:	Angiospermae
Kelas:	Dicotyledonae
Subkelas:	Dialypetalae
Bangsa:	Rutales
Suku:	Meliaceae
Marga:	<i>Lansium</i>
Jenis:	<i>Lansium domesticum</i>

2.2. Kandungan Kimia dan Bioaktivitas *L. domesticum* Corr.

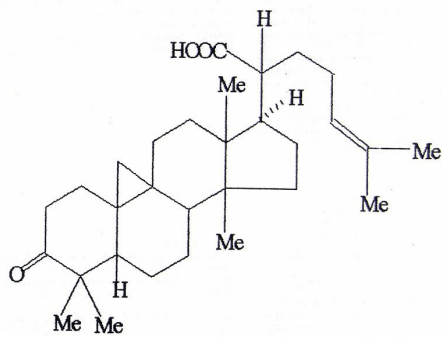
Suatu senyawa yang bersifat toksik yaitu cis-cisoid-cis isomer dari 3-okso- α -bourbonene telah diisolasi oleh Vyebara, dkk (1988) dari *L. domesticum*. Sedangkan Nishizawa, dkk., (1989) berhasil mengisolasi senyawa asam 3-okso-24-sikloarten-21-oat yang beberapa turunannya menunjukkan hambatan yang cukup berarti dalam mencegah pertumbuhan tumor kulit pada aktivasi virus Epstein Barr. Kulit buahnya mengandung asam lansat. Selain itu ditemukan pula tiga senyawa triterpen glikosida yaitu lansiosida A, B dan C (Nishizawa, 1982). Enam buah tetranortriterpenoid baru telah diisolasi dari bagian biji oleh Nishizawa, dkk (1985, 1989) yaitu dukunolida A, B, C, D, E dan F.



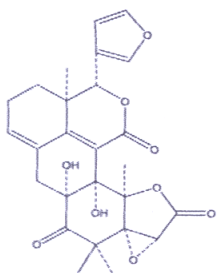
Gambar 2.5 Struktur 3-okso- α -bourbonene



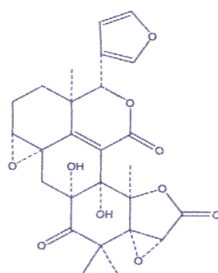
Lansiosida A



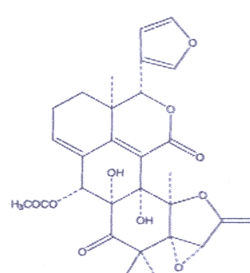
Gambar 2.6 Struktur asam 3-okso-24-sikloarten -21-oat



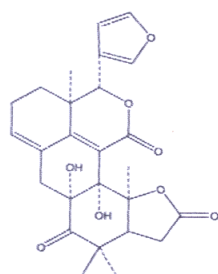
Dukunolida A



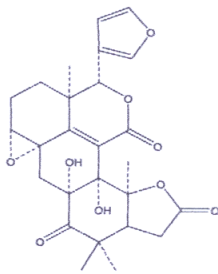
Dukunolida B



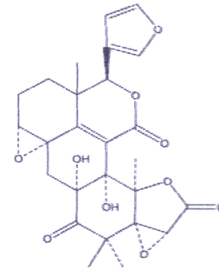
Dukunolida C



Dukunolida D



Dukunolida E



Dukunolida F

Berbagai ekstrak bagian tumbuhan *L. domesticum* menunjukkan keragaman bioaktivitas yang sangat menarik untuk diteliti. Ekstrak kulit buah dan biji memiliki efek racun terhadap ulat grayak (*Spodoptera litura*) dengan uji topikal dan residual serta mengurangi jumlah larva yang menjadi pupa. Sifat repellent ekstrak terlihat pada konsentrasi 50% dan 100%, sedangkan aktivitas *antifeedant* ekstrak biji lebih tinggi dibandingkan ekstrak kulit buahnya (Pudjiastuti, dkk., 1995). Ekstrak kulit buah juga dimanfaatkan sebagai antiketombe dan penguat rambut (Nakagawa, 1996). Selain itu ekstrak kulit buah dan daun dilaporkan sebagai sumber yang potensial untuk menemukan senyawa aktif yang dapat memutuskan daur hidup parasit *Plasmodium falciparum* yang menyebabkan penyakit malaria (Yapp, 2002).

Fraksi diklorometan, etanol dan etil asetat dari ekstrak biji duku menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Echericia coli* bahkan 1 mg fraksi diklorometan menunjukkan nilai kesetaraan dengan antibiotika tetrasiklin anhidrat 45,8 mg (Loekitowati, 2000). Ekstrak biji juga memberikan efek hipoglikemik terhadap tikus Wistar jantan (Sasmito, 1998).

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Memperoleh data aktivitas antifeedant fraksi-fraksi ekstrak biji kokosan.
2. Memperoleh senyawa aktif antifeedant beserta struktur kimianya dari biji kokosan.
3. Mengungkapkan hubungan antara struktur kimia dan aktivitas antifeedant sehingga diperoleh informasi mengenai gugus fungsi yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antifeedant tersebut.
4. Peningkatan *broad spectrum* bioaktivitas dan studi *mode of action* senyawa hasil isolasi.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat bermanfaat untuk:

- a. Mengungkapkan pemanfaatan biji kokosan dalam bidang pertanian sebagai bahan insektisidal alami
- b. Mempelajari kemungkinan untuk memperoleh tanaman varietas baru yang memiliki sifat antifeedant melalui rekayasa genetika.
- c. Mempelajari kemungkinan penggunaan senyawa antifeedant sebagai prototype sintesis senyawa pengendali hama.
- d. Membuka kemungkinan usaha budidaya tanaman kokosan.

Keberhasilan usaha isolasi senyawa aktif dan sintesis parsial dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi pada pengembangan ilmu kimia bahan alam hayati terutama dalam hal metode isolasi dan transformasi senyawa aktif dari bahan alam. Disamping itu senyawa aktif yang diisolasi diharapkan dapat menjadi *leading compound* yang dapat dikembangkan menjadi senyawa yang memiliki keunggulan.

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kokossan (*L. domesticum* Corr var. kokossan) yang diperoleh dari daerah Cicalengka dan Cililin. Pengambilan buah kokosan dilakukan pada bulan Maret 2005. Determinasi dilakukan di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran.

Serangga uji adalah larva *Epilachna sparsa* instar ke-3 awal dibudidayakan sendiri. Media uji hayati menggunakan daun leunca (*Solanum nigrum*) dengan metode uji pilihan (*Choice Test*).

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi dan isolasi meliputi berbagai pelarut organik teknis redestilasi dan pelarut organik p.a untuk rekristalisasi. Disamping itu digunakan juga bahan kimia pendukung lainnya meliputi silika gel G-60 ukuran 70-230 mesh dan untuk kromatograf kolom serta GF₂₅₄ untuk kromatografi lapis tipis.

4.2. Metode Penelitian

a. Ekstraksi dan Partisi

Buah kokossan ditekan hingga bijinya dapat dikeluarkan. Biji-biji tersebut dicuci berulang kali untuk membersihkan daging buahnya yang masih menempel. Biji yang telah bersih ditiriskan lalu dihaluskan. Biji kokossan halus selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Pelarut diganti setiap hari hingga diperoleh maserat yang tidak berwarna. Maserat dikumpulkan dan diuapkan hingga diperoleh maserat pekat. Terhadap maserat pekat dilakukan uji hayati dan uji fitokimia. Uji alkaloid dilakukan dengan pereaksi Mayer's, Dragendorff dan Wagner; uji steroid dan triterpenoid dengan pereaksi Liebermann-Burchard, uji saponin dengan cara uji busa dan uji flavonoid dengan pereaksi besi (III) klorida.

Maserat pekat selanjutnya dilarutkan dalam campuran metanol:air (8:2) lalu dipartisi berturut-turut dengan *n*-heksana dan etilasetat.

b. Pemisahan dan Pemurnian

Terhadap kedua fraksi tersebut dilakukan uji hayati. Fraksi aktif dipisahkan dengan cara kromatografi kolom cair vakum (KKCV) menggunakan

fasa diam silika gel G-60 dan fasa gerak berupa campuran *n*-heksana, etilasetat dan metanol dengan peningkatan kepolaran secara bertahap. Fraksi-fraksi hasil KKCVCV diuji hayati. Fraksi aktif dipisahkan kembali dengan metode kromatografi kolom terbuka menggunakan fasa diam silika gel ukuran 70-230 mesh dengan pelarut yang tepat hingga diperoleh noda tunggal sebagai isolat. Isolat dimurnikan dengan cara rekristalisasi.

c. Uji Kemurnian dan Karakterisasi

Kemurnian isolat diuji dengan kromatografi lapis tipis menggunakan berbagai variasi campuran pelarut. Isolat murni diukur titik lelehnya dan dikarakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet, inframerah, resonansi magnet inti dan massa. Aktivitas isolat ditentukan dengan uji hayati.

d. Uji Aktivitas Antifeedant dengan Metode Uji Pilihan (Schwinger, 1984)

Ekstrak uji dioleskan dibagian kiri daun leunca (*Solanum nigrum*) sedangkan di bagian kanan dioles dengan metanol sebagai kontrol. Selanjutnya daun diletakkan dalam cawan petri dan dimasukkan dua ekor larva *Epilachna sparsa* instar ke-3 awal yang telah dipuasakan selama dua jam. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dan keaktifan dihitung dengan cara mengukur luas daun yang dikonsumsi larva menggunakan lingkaran yang dibagi dalam 32 sektor. Persentase keaktifan diukur dengan rumus:

$$\% \text{ keaktifan} = \frac{\text{Luas daun yang dikonsumsi (kontrol - perlakuan)}}{\text{Luas daun yang dikonsumsi (kontrol + perlakuan)}}$$

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Ekstraksi dan Partisi

Dari \pm 250 kg buah kokossan diperoleh 8,9 kg biji kokossan yang dimaserasi dengan metanol setelah dihaluskan terlebih dahulu. Proses penghalusan bertujuan untuk merusak dinding sel hingga proses ekstraksi berlangsung lebih baik dan cepat. Cara maserasi dipilih oleh karena senyawa aktif yang akan diisolasi belum diketahui karakternya sehingga cara ekstraksi dengan pemanasan dihindari untuk mencegah terdekomposisinya senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (Harwood, 1993). Pelarut diganti tiap hari hingga diperoleh maserat yang tidak berwarna dengan asumsi bahwa seluruh kandungan bahan telah terekstraksi. Maserat yang terkumpul diuapkan hingga diperoleh 336,5 g maserat metanol pekat. Hasil uji hayati terhadap maserat metanol pekat menunjukkan aktivitas 85% terhadap larva *Epilachna sparsa* pada konsentrasi larutan uji 5% (Lampiran 1).

Uji fitokimia terhadap maserat metanol pekat ditujukan untuk mengetahui golongan metabolit sekunder apa saja yang terkandung di dalamnya, hasil uji fitokimia terdapat dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol dari Biji Kokosan

No	Golongan Senyawa	Hasil Uji
1.	Alkaloid	Negatif
2.	Steroid	Negatif
3.	Triterpenoid	Positif
4.	Saponin	Negatif
5.	Flavonoid	Negatif

Maserat metanol pekat selanjutnya dilarutkan dalam campuran metanol:air (2:8), komposisi ini dipilih agar maserat pekat dapat larut dengan kepolaran yang cukup hingga dapat dipisahkan dengan cara partisi dengan pelarut *n*-heksana dan etilasetat. Fraksi yang diperoleh masing-masing diuapkan pelarutnya dan diuji hayati. Hasil uji terdapat pada Tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.2. Berat Fraksi Hasil Partisi dan Hasil Uji Antifeedant pada Konsentrasi Larutan Uji 5%

No	Fraksi	Berat (gram)	Aktivitas (%)
1.	<i>n</i> - Heksana	12,3	94
2.	etilasetat	57,8	100
3.	metanol-air	234,7	2

Fraksi *n*-heksana dan etilasetat terlihat memiliki keaktifan yang cukup tinggi sehingga berpeluang ditemukannya senyawa antifeedant dari kedua fraksi tersebut. Fraksi etilasetat dipilih untuk dipisahkan terlebih dahulu karena jumlahnya lebih banyak. Komponen yang terkandung dalam biji sebagian besar tertinggal pada fraksi metanol-air, baik yang terlarut maupun tidak. Hal ini mungkin disebabkan biji banyak mengandung polisakarida sehingga tidak larut dalam pelarut organik.

5.2. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Fraksi etilasetat dipisahkan dengan KKCVC menggunakan fasa diam silika gel G-60 dengan campuran fasa gerak seperti pada Tabel 5.3 berikut:

Tabel 5.3. Komposisi Fasa Gerak pada Kromatografi Kolom Cair Vakum

No	<i>n</i> - Heksana (%)	Etilasetat (%)	Metanol (%)
1.	100	0	0
2.	80	20	0
3.	60	40	0
4.	40	60	0
5.	20	80	0
6.	0	100	0
7.	0	90	10
8.	0	80	20
9.	0	50	50
10	0	0	100

Fraksi-fraksi hasil KKCVC dianalisis dengan kromatografi lapis tipis, fraksi dengan pola noda yang sama digabung sehingga diperoleh tujuh fraksi dengan aktivitas (konsentrasi larutan uji 1%) seperti yang tercantum pada Tabel 5.4 berikut:

Tabel 5.4. Berat dan Aktivitas Fraksi-fraksi Hasil KKCVC

Fraksi	Berat (gram)	Aktivitas (%)
A	0,6	28
B	0,5	62
C	6,8	91
D	11,3	90
E	4,1	97
F	2,5	0
G	4,0	54

Fraksi D menghasilkan kristal yang selanjutnya dipisahkan dan dicuci dengan etilasetat. Kristal lalu direkristalisasi dengan diklorometana hingga diperoleh kristal berwarna putih yang selanjutnya disebut sebagai isolat L-1 sebanyak 6,1 g. Jumlah yang sangat besar ini menunjukkan bahwa isolat L-1 merupakan komponen utama dalam biji kokosan. Kemurnian isolat diuji dengan kromatografi lapis tipis menggunakan berbagai variasi fasa gerak (Tabel 5.5). Aktivitas antifeedant isolat diuji terhadap larva *E. sparsa* dan diperoleh hasil sebesar 78% dengan konsentrasi larutan uji 1% (Lampiran 4)

Tabel 5.5 Harga R_f Kromatogram Lapis Tipis Isolat L-1

No	Fasa Gerak	R_f
A	butanol : kloroform (0,5:9,5)	0,67
B	aseton:n-heksana (4:6)	0,39
C	etilasetat:n-heksana (1:1)	0,37
D	etanol:kloroform(0,5:9,5)	0,80
E	butanol:n-heksana (1:9)	0,45
F	kloroform:etilasetat:methanol (8:1:1)	0,82
G	kloroform:n-heksana:etanol (7:2:1)	0,74

Fraksi D sisa dipisahkan kembali dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fasa diam silika gel 70-230 mesh dan fasa gerak diklorometana:aseton berturut-turut 9,5:0,5 ; 9:1 ; 8:2 hingga diperoleh 6 fraksi. Fraksi D3 selanjutnya dipisahkan kembali dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fasa diam silika gel 70-230 mesh dan fasa gerak *n*-heksana: etilasetat (3:2) hingga diperoleh 5 fraksi. Fraksi D3.3 diperoleh dalam bentuk kristal yang selanjutnya dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut aseton dan etilasetat hingga diperoleh isolat berupa kristal putih seberat 11,2 mg yang selanjutnya disebut sebagai isolat L-2. Kemurnian isolat L-2 diuji dengan kromatografi lapis tipis menggunakan berbagai variasi fasa gerak (Tabel 5.6). Uji aktivitas antifeedant isolat L-2 terhadap larva *E. sparsa* menunjukkan bahwa isolat L-2 tidak aktif (0%) pada konsentrasi larutan uji 1% (Lampiran 4).

Tabel 5.6 Harga R_f Kromatogram Lapis Tipis Isolat L-2

No	Fasa Gerak	R _f
A	diklorometana:metanol (9,5:0,5)	0,72
B	diklorometana:aseton (9:1)	0,57

Fraksi E hasil KKCVC diperoleh dalam bentuk supernatan kuning dengan endapan putih dipisahkan dengan cara dekantasi. Supernatan diuapkan hingga diperoleh endapan yang selanjutnya direkristalisasi dengan metanol-etilasetat panas beberapa kali hingga diperoleh bubuk putih seberat 22,5 mg yang selanjutnya disebut sebagai isolat L-3. Analisis isolat L-3 dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fasa diam silika gel terdapat dalam Tabel 5.7. Uji aktivitas antifeedant terhadap isolat menunjukkan keaktifan sebesar 0%.

Fraksi *n*-heksana yang juga memiliki keaktifan cukup tinggi dipisahkan dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fasa diam silika gel 70-230 mesh dan fasa gerak yang kepolarannya ditingkatkan secara bertahap (Tabel 5.8).

Tabel 5.7 Harga R_f Kromatogram Lapis Tipis Isolat L-3

No	Fasa Gerak	R _f
A	kloroform:metanol (8:2)	0,63
B	kloroform: <i>n</i> -heksana:metanol (7,5:1:1,5)	0,38

Tabel 5.8 Fasa Gerak pada Digunakan pada Kromatografi Kolom Terbuka Fraksi *n*-heksana

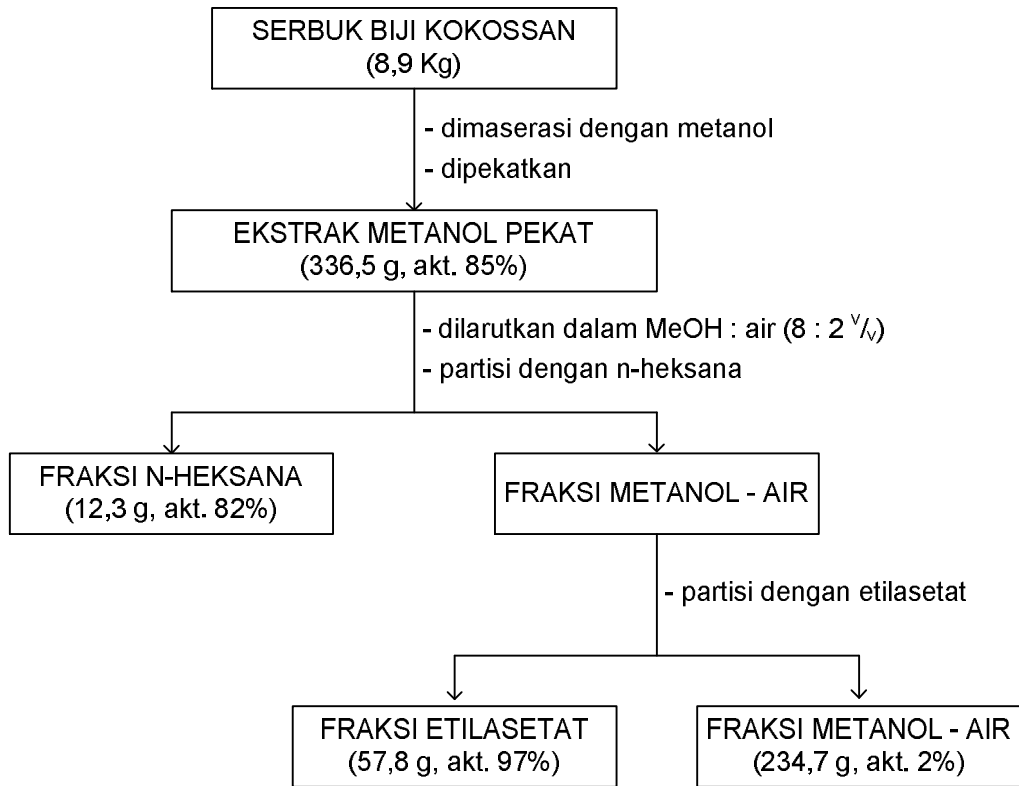
No	Fasa Gerak
1.	diklorometana: <i>n</i> -heksana (1:1)
2.	diklorometana: <i>n</i> -heksana:etilasetat (0,85:0,10:0,05)
3.	diklorometana: <i>n</i> -heksana:etilasetat (0,90:0,05:0,05)
4.	diklorometana:etilasetat (0,95:0,05)
5.	diklorometana:methanol (0,95:0,05)
6.	diklorometana:methanol (0,85:0,15)
7.	metanol

Dari kromatografi kolom terbuka fraksi *n*-heksana diperoleh 13 fraksi (H_1, H_2, \dots, H_{13}). Fraksi H_{13} menunjukkan satu noda dan tidak mengandung komponen utama L-1 sehingga fraksi ini dipilih untuk dimurnikan lebih lanjut dengan cara rekristalisasi dengan diklorometana hingga diperoleh isolat L-4 berupa bubuk putih seberat 23,7 mg. Analisis isolat L-4 dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan satu noda dengan berbagai variasi fasa gerak (Tabel 5.9). Uji aktivitas antifeedant terhadap isolate L-4 menunjukkan aktivitas sebesar 70% pada konsentrasi larutan uji 1%.

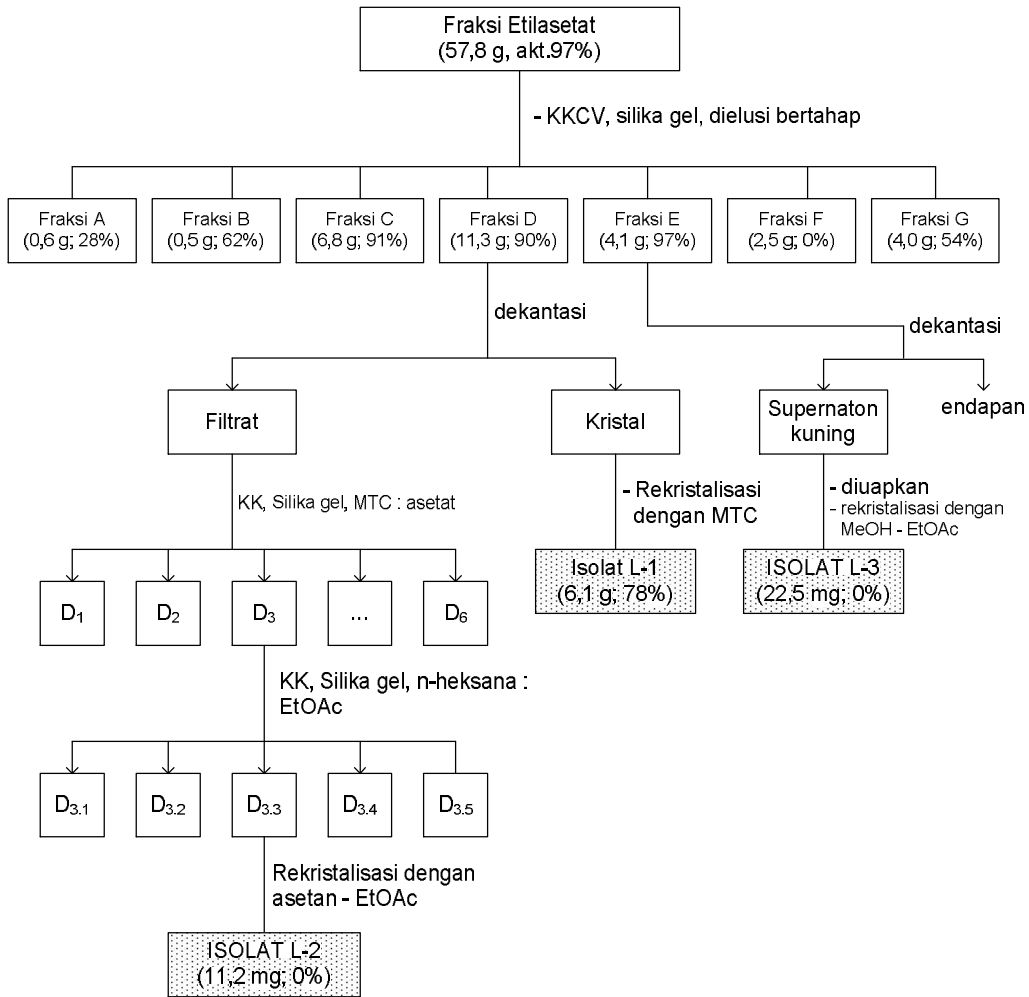
Tabel 5.9 Harga R_f Kromatogram Lapis Tipis Isolat L-4

No	Fasa Gerak	R_f
A	diklorometana: <i>n</i> -heksana:metanol (1,8:0,1:0,1)	0,17
B	kloroform:etilasetat:metanol (1,8:0,1:0,1)	0,10
C	diklorometana:etilasetat:metanol (1,75:0,05:0,2)	0,45
D	etilasetat:etanol: <i>n</i> -heksana (2:2:6)	0,61

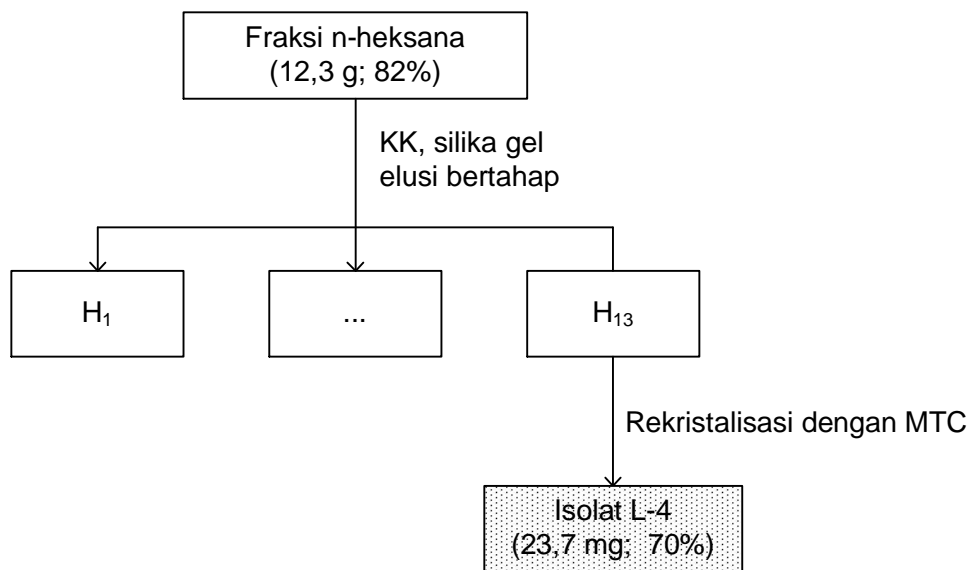
Bagan kerja isolasi terdapat dalam gambar 5.1, 5.2 dan 5.3.



Gambar 5.1 Bagan Alir Ekstraksi dan Partisi Biji Kokossan



Gambar 5.2 Bagan Alir Pemisahan dan Pemurnian Isolat L-1, L-2, dan L-3



Gambar 5.3 Bagan Pemisahan dan Pemurnian Isolat L-4

5.3. Karakterisasi dan Spektroskopi

Hasil pengukuran titik leleh terhadap isolat terdapat pada Tabel 5.10

Tabel 5.10. Titik Leleh Isolat

No	Isolat	Titik Leleh
1.	L-1	178-180° C
2.	L-2	200° C (dekomposisi)
3.	L-3	263,5-265° C
4.	L-4	274° C (dekomposisi)

Apabila dibandingkan dengan harga titik leleh yang dimiliki oleh senyawa-senyawa yang telah diisolasi dari *L. domesticum* var. duku maka titik leleh isolat L-1 mendekati senyawa asam lansat (182-184° C), isolat L-3 mendekati dukunolida F (268-269° C) dan isolat L-4 mendekati dukunolida E (270-272° C)

Spektrum ultraviolet isolat L-1 terdapat dalam Gambar 5.4:

Gambar 5.4. Spektrum Ultraviolet Isolat L-1

Serapan kuat pada λ_{max} 203 diduga berasal dari pelarut metanol. Tidak munculnya serapan lain yang cukup berarti menunjukkan bahwa kemungkinan isolat L-1 tidak memiliki ikatan rangkap terkonyugasi.

Spektrum inframerah isolat L-1 terdapat pada Gambar 5.5:

Gambar 5.5. Spektrum Inframerah Isolat L-1

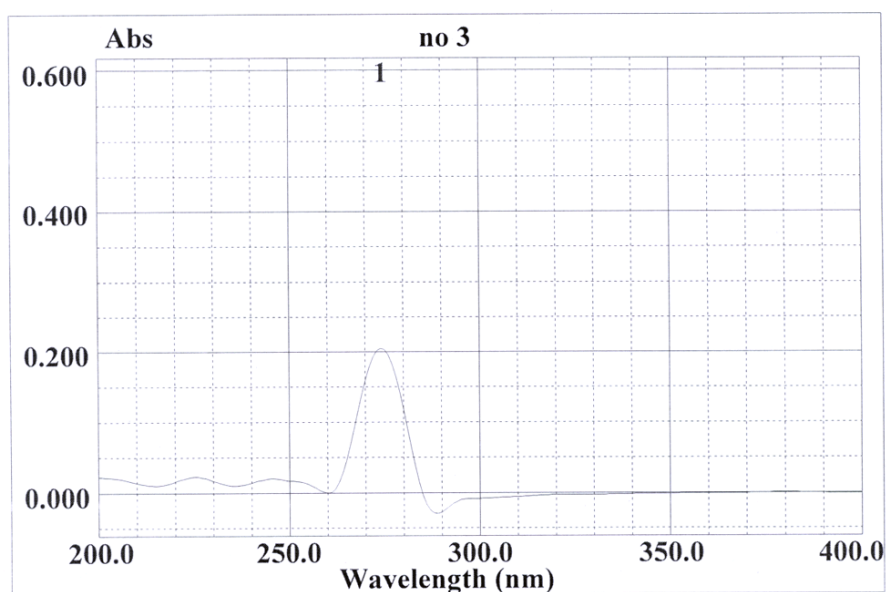
Tafsiran spektrum inframerah isolat terdapat pada Tabel 5.11:

Tabel 5.11 Tafsiran Spektrum Inframerah isolat L-1:

No	Bil. Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Bentuk Pita	Dugaan
1.	3427	Kuat	Tajam	Regang O-H
2.	2978	Sedang	Tajam	Regang C-H asimetri
3.	2940	Sedang	Tajam	Regang C-H simetri
4.	1722	Kuat	Tajam	Regang C=O
5.	1631	Sedang	Tajam	Regang C=C
6.	1501	Lemah	Tajam	Lentur C-H
7.	1449	Lemah	Lebar	Lentur C-H
8.	1389	Lemah	Tajam	Lentur O-H
9.	1234	Kuat	Tajam	Regang C-O
10.	1162	Sedang	Tajam	Regang dan lentur C-CO-C

Tafsiran spektrum inframerah isolat L-1 menunjukkan bahwa isolat merupakan komponen yang memiliki gugus O-H, karbonil (C=O), dan alkena (C=C) .

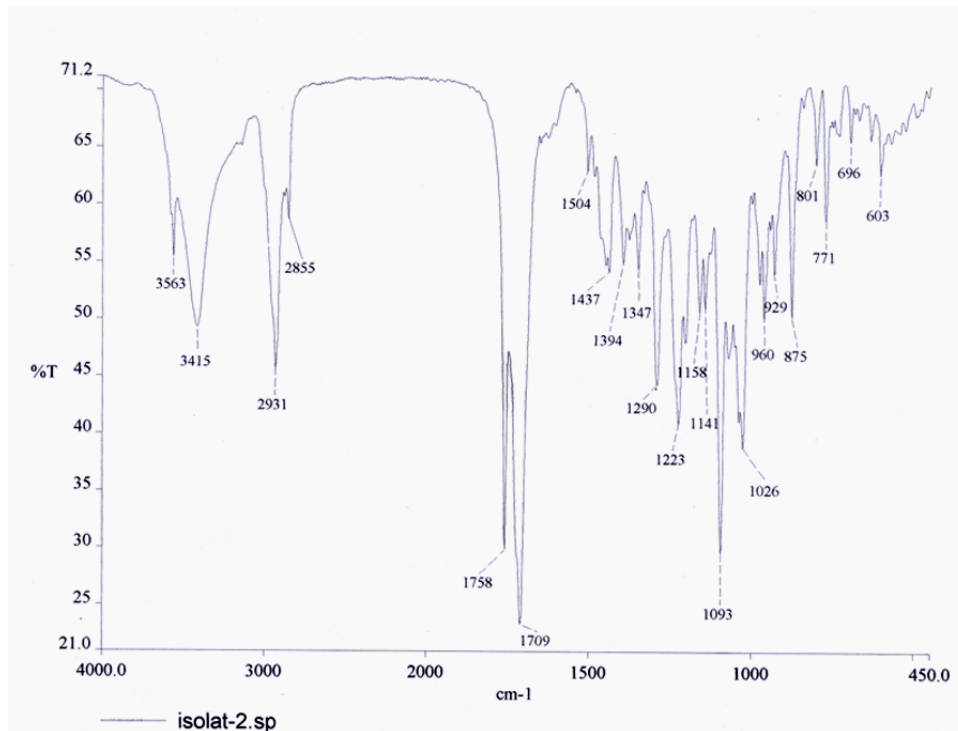
Spektrum ultraviolet isolat L-2 terdapat dalam Gambar 5.6:



Gambar 5.6. Spektrum Ultraviolet Isolat L-2

Serapan kuat pada λ_{\max} 203 diduga berasal dari pelarut metanol. Tidak munculnya serapan lain yang cukup berarti menunjukkan bahwa kemungkinan isolat L-2 tidak memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.

Spektrum inframerah isolat L-2 terdapat pada Gambar 5.7:



Gambar 5.7. Spektrum Inframerah Isolat L-2

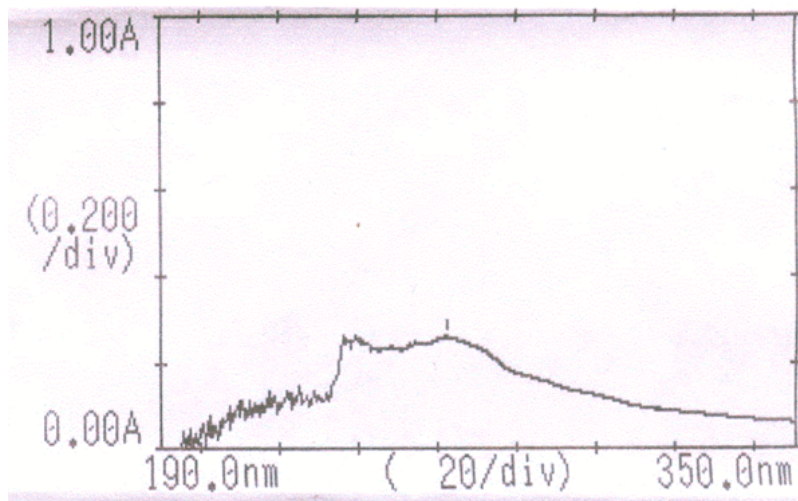
Tafsiran spektrum inframerah isolat L-2 terdapat pada Tabel 5.12:

Spektrum ultraviolet dan inframerah mengindikasikan bahwa isolat L-2 merupakan komponen yang tidak mengandung gugus kromofor, mengandung gugus fungsi O-H, C=O dan C-CO-C.

Tabel 5.12 Tafsiran Spektrum Inframerah isolat L-2

No	Bil. Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Bentuk Pita	Dugaan
1.	3563	Lemah	Tajam	Regang O-H
2.	3415	Sedang	Tajam	Regang O-H
3.	2931	Sedang	Tajam	Regang C-H simetri
4.	2855	Lemah	Tajam	Regang C-H
5.	1758	Kuat	Tajam	Regang C=O
6.	1709	Kuat	Tajam	Regang C=O
7.	1437	Lemah	Tajam	Lentur C-H
8.	1394	Lemah	Tajam	Lentur O-H
9.	1347	Lemah	Tajam	Lentur C-H
10.	1290	Sedang	Tajam	Regang C-O
11.	1223	Sedang	Tajam	Regang C-O
12.	1158	Sedang	Tajam	Regang dan lentur C-CO-C
13.	1141	Sedang	Tajam	Regang C-O
14.	1093	Kuat	Tajam	
15.	1026	Sedang	Tajam	

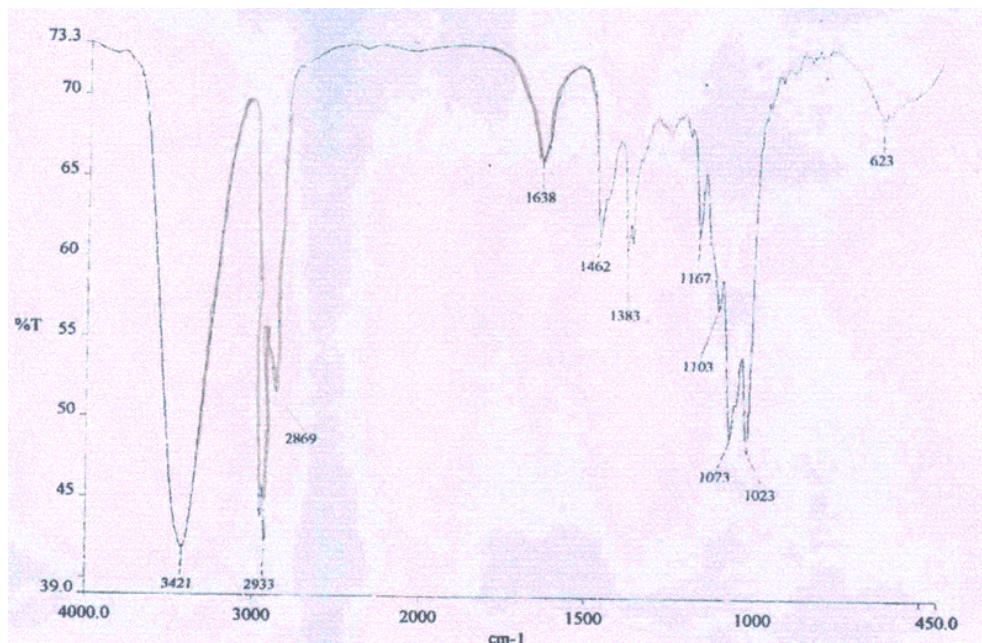
Spektrum ultraviolet isolat L-3 terdapat dalam Gambar 5.8:



Gambar 5.8. Spektrum Ultraviolet Isolat L-3

Tidak munculnya serapan yang cukup berarti menunjukkan bahwa kemungkinan isolate L-3 tidak memiliki ikatan rangkap terkonyugasi.

Spektrum inframerah isolat L-3 terdapat pada gambar 5.9.



Gambar 5.9. Spektrum Inframerah Isolat L-3

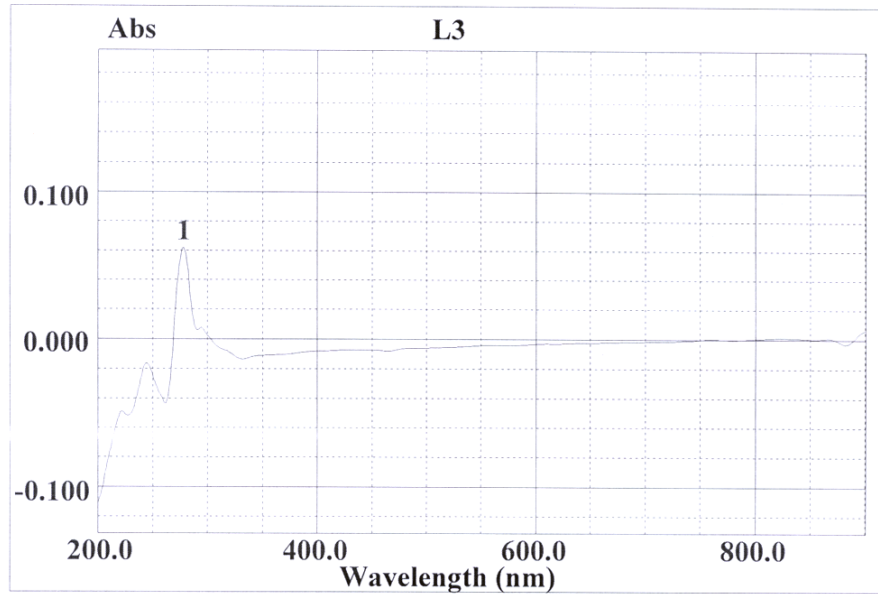
Tafsiran spectrum inframerah isolate L-3 terdapat pada Tabel 5.13:

Tabel 5.13 Tafsiran spectrum inframerah isolate L-3:

No	Bil. Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Bentuk Pita	Dugaan
1.	3421	Kuat	Tajam	Regang O-H
2.	2933	Sedang	Tajam	Regang C-H asimetri
3.	2869	Sedang	Tajam	Regang C-H simetri
4.	1638	Lemah	Lebar	Regang C=C
5.	1462	Lemah	Tajam	Lentur C-H
6.	1383	Lemah	Tajam	Tekuk C-H
7.	1167	Lemah	Tajam	Regang dan lentur C-CO-C
8.	1103	Sedang	Tajam	Regang C-O-C asimetri
9.	1073	Sedang	Tajam	

10.	1023	Sedang	Tajam	
11.	623	Lemah	Lebar	Tekuk C=C

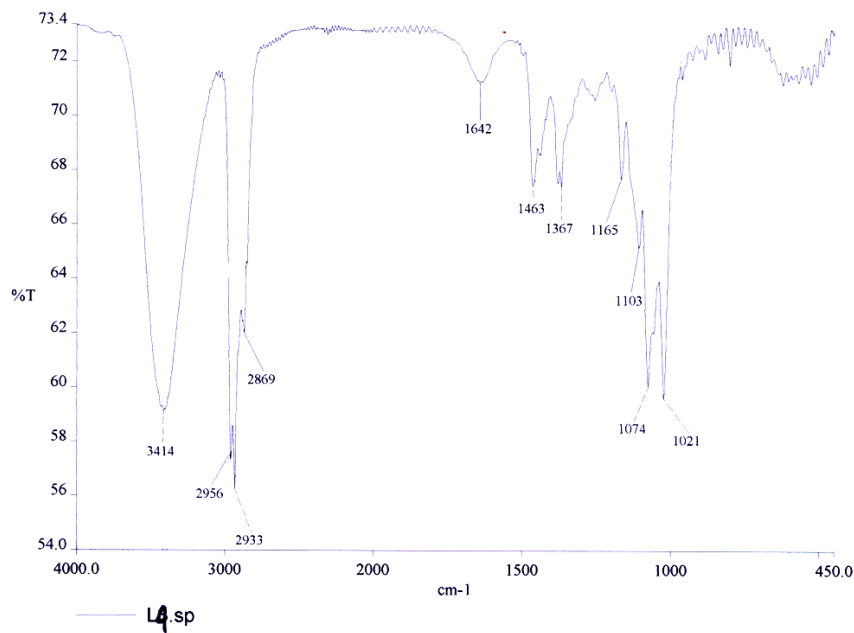
Spektrum ultraviolet isolat L-4 terdapat dalam gambar 5.10:



Gambar 5.10. Spektrum Ultraviolet Isolat L-4

Tidak munculnya serapan yang cukup berarti menunjukkan bahwa kemungkinan isolat L-4 tidak memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.

Spektrum inframerah isolat L-4 terdapat pada gambar 5.11:



Gambar 5.11. Spektrum Inframerah Isolat L-4

Tafsiran spektrum inframerah isolat L-4 terdapat pada Tabel 5.14:

Tabel 5.14 Tafsiran Spektrum Inframerah Isolat L-4:

No	Bil. Gelombang (cm^{-1})	Intensitas	Bentuk Pita	Dugaan
1.	3414	Kuat	Tajam	Regang O-H
2.	2956	Kuat	Tajam	Regang C-H
3.	2933	Kuat	Tajam	Regang C-H asimetri
4.	2869	Lemah	Lebar	Regang C-H simetri
5.	1642	Lemah	Tajam	Regang C=C
6.	1463	Lemah	Tajam	Lentur C-H
7.	1367	Lemah	Tajam	Tekuk C-H
8.	1165	Sedang	Tajam	Regang dan lentur C-CO-C
9.	1103	Sedang	Tajam	Regang C-O-C asimetri
10.	1074	Sedang	Tajam	Regang C-O
11.	1021	Lemah	Lebar	Regang C-O

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari maserasi terhadap \pm 8,9 kg biji kokossan dengan pelarut metanol dan diperoleh 336,5 g maserat. Partisi terhadap maserat metanol menghasilkan 12,3 g fraksi *n*-heksana (aktivitas 94%) dan 57,8 g fraksi etilasetat (100%). Dari fraksi etilasetat diperoleh satu isolat aktif (L-1) dan dua isolat tidak aktif (L-2 dan L-3) sedangkan dari fraksi *n*-heksana diperoleh satu isolat (L-4).

Isolat L-1 yang merupakan komponen mayor diperoleh sebanyak 6,1 g berbentuk kristal putih (aktivitas 78%) dengan karakter sebagai berikut: titik leleh 178-180° C, IR (KBr, cm⁻¹) 3470, 2978, 1722, 1631, 1162. Isolat L-1 diduga merupakan komponen yang tidak memiliki gugus kromofor, mengandung gugus fungsi O-H, C=O dan C=C. Isolat L-2 berbentuk kristal putih diperoleh sebanyak 11,2 mg (aktivitas 0%) dengan karakter: titik leleh 200° C (dekomposisi), UV (λ_{maks} 274,6 nm, abs 0,573), IR (KBr, cm⁻¹) 3563,2931, 1758, 1437, 1290, 1158. Isolat L-2 diduga merupakan komponen yang mengandung gugus dengan transisi elektronik $n-\pi^*$, gugus O-H, dan C=O. Isolat L-3 diperoleh berbentuk bubuk putih sebanyak 22,5 mg (aktivitas 0 %) dengan karakter: titik leleh: 263,5-265° C, IR (KBr, cm⁻¹) 3421, 2933,1638, 1167, 1073. Isolat L-3 diduga merupakan komponen yang tidak memiliki gugus kromofor, mengandung gugus O-H, C=C dan C-O-C. Isolat L-4 diperoleh berbentuk bubuk putih sebanyak 23,7 mg (aktivitas 70%) dengan karakter: titik leleh 274° C (dekomposisi), IR (KBr, cm⁻¹) 3414, 2933, 1642, 1463, 1165, 1074. Isolat diduga merupakan komponen yang tidak memiliki gugus kromofor, mengandung gugus O-H, C=C, C-O-C dan C-CO-C.

6.2. Saran

Untuk dapat menentukan struktur keempat isolat masih diperlukan data spektroskopi NMR dan massa yang akan dilaksanakan pada penelitian tahap II. Struktur kimia isolat sangat diperlukan untuk mempelajari hubungan antara struktur dan keaktifannya. Uji hayati menggunakan serangga lain akan dapat meningkatkan

spektrum penggunaan isolat aktif. Untuk tuntasnya penelitian perlu ditelaah pula mekanisme kerja senyawa antifeedant terhadap larva *Epilachna sparsa*.

VII. RENCANA PENELITIAN TAHAP II

Pada penelitian tahap I telah diperoleh empat dua isolat aktif antifeedant L-1 dan L-4 serta dua isolat tidak aktif L-2 dan L-3. Keempat isolat tersebut telah dikarakterisasi dengan pengukuran titik leleh, pengukuran spektrum ultraviolet dan spektrum inframerah serta diuji aktivitas antifeedant terhadap larva *Epilachna sparsa*. Untuk dapat mempelajari hubungan antara struktur dan aktivitas maka keempat isolat tersebut harus ditentukan struktur kimianya terlebih dahulu dengan metode spektroskopi NMR satu dan dua dimensi serta MS.

Tujuan khusus penelitian tahap II ini adalah:

1. Mendapatkan struktur kimia senyawa hasil isolasi dengan metode spektroskopi.
2. Mengungkapkan hubungan antara struktur kimia dan aktivitas antifeedant sehingga diperoleh informasi mengenai gugus fungsi yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antifeedant tersebut.
3. Peningkatan *broad spectrum* bioaktivitas dan studi *mode of action* senyawa hasil isolasi.

Metode penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Isolat yang diperoleh diukur spektrum NMR dan MS lalu ditentukan strukturnya. Untuk mempelajari hubungan struktur dan keaktifan dibandingkan antara struktur senyawa aktif dan tidak aktif. Bila memungkinkan, terhadap senyawa aktif yang diperoleh dilakukan sintesis parsial (transformasi gugus fungsi) kemudian dilakukan uji hayati terhadap derivatnya sehingga aktivitas senyawa asal dengan senyawa derivat dapat dibandingkan.
- b. Peningkatan *broad spectrum* senyawa hasil isolasi yang telah ditentukan strukturnya dilakukan dengan uji aktivitas terhadap beberapa serangga hama lain (*Plutella xylostella* dan *Spodoptera litura*). Untuk melihat derajat keaktifan dilakukan uji aktivitas antifeedant senyawa hasil isolasi dibandingkan dengan senyawa antifeedant yang telah digunakan secara luas.

- c. Mekanisme kerja senyawa antifeedant dipelajari dengan mengamati perubahan fisiologi larva *Epilachna sparsa* instar ke-3 yang telah diperlakukan dengan senyawa aktif.

Jadual Kegiatan Penelitian

Jenis Kegiatan	Peb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Ags	Sep	Okt	Nop
Spekt. NMR, MS										
Penentuan Strukt.										
Uji Hayati										
Derivatisasi										
Uji Hayati										
Pengamatan fisiol.										
Analisis data										
Laporan										

7. ANGGARAN PENELITIAN

Jenis Kegiatan	Jumlah Pengeluaran
Pelaksanaan (Gaji dan Upah)	Rp 10.000.000,-
Peralatan	Rp 2.500.000,-
Bahan Aus (Material Penelitian)	Rp 12.490.000,-
Perjalanan	Rp 800.000,-
Seminar	Rp 7.700.000,-
Laporan/Publikasi	Rp 1.500.000,-

Total Rp 34.990.000,-

DAFTAR PUSTAKA

Harwood, L.M., 1993, *Experimental Organic Chemistry*, Brook Welsc., New York

- Heyne, K., 1988, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jakarta: Badan Litbang Kehutanan Jakarta.
- Kubo, I., and K. Nakanishi, 1979, Some Terpenoid Insect Antifeedants from Tropical Plants, dalam H. Geissbuhler, G.T. Brooks and P.C. Kearney (Eds), *Advances in Pesticide Science*, 2, 284-294, Oxford: Pergamon Press.
- Loekitowati, H.P. dan Hermansjah, 2000, Studi Pemanfaatan Biji Duku (*Lansium domesticum*) untuk Obat Diare Secara In Vitro, *Jurnal Penelitian Sains*, 7, 41-48.
- Meinwald, J.G.D., Prestwich, K. Nakanishi, I. Kubo, 1978, Chemical Ecology: Studies from East Africa, *Science* 199, 4325, 1167-73.
- Miles, D. H., B.L Hankinson and S.A Randle, 1985, Insect Antifeedant from The Peruvian Plant *Alchornea triplinerva*, dalam Paul Hedin (Editor): *Bioregulator for Pest Control*, Washington DC: American Chemical Society.
- Nakagawa, N. and Tatsu Myamoto 1996, Hair Growth-stimulating Cosmetics Containing Bisabolol Hydrogenation Product, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08 48, 616.
- Nishizawa, M., H. Nishide, Y. Hayashi and S. Kosela, 1982, The Structure of Lansiode A, a Novel Triterpene glycoside with Amino Sugar from *Lansium domesticum*, *Tetrahedron Lett.*, 1982, 23(13), 1349-50.
- Nishizawa, M., Y. Nademoto, S. Sastrapradja, 1985, Structures of Dukunolide A: A Tetranortriterpenoid With a New Carbon Skeleton from *Lansium domesticum*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 7, 395-6.
- Nishizawa, M., M. Emura, H. Yamada, M. Shiro, Chairul, Y. Hayashi, and H. Tokuda, Isolation of New Cycloartanoid Triterpene from Leaves of *Lansium domesticum* Novel Skin-Tumor Promotion Inhibitor, *Tetrahedron Lett.*, 30:41, 5615-18.
- Oka, I.N, 1993, Penggunaan , Permasalahan serta Prospek Pestisida Nabati dalam Pengendalian Hama Terpadu, Prosiding Seminar Hasil Penelitian Dalam Rangka Pemanfaatan Pestisida Nabati, Bogor 1-2 Desember 1993.
- Pujiastuti, Y., E. Martono, dan S. Mangoendiharjo, 1995, Kajian Bioaktivitas Tanaman Duku *Lansium domesticum* terhadap Ulat Grayak (*Spodoptera litura*), Berkala Penelitian Pascasarjana UGM, 71-82, Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Rajab, M.S., and M.D Bentley, 1988, A New Limonoid Insect Antifeedant from The Fruit of *Melia volkensii*, *Journal of Natural Products*, 51(1), 167-171.
- Ruslan, K., S. Soetarno dan S. Sastrodihardjo, 1989, *Insektisida dari Produk Alami*, PAU Bidang Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung.

- Russel, G.B., 1991, Phytochemicals Resources for Crop Protection, *Proc. Assomps IV*, Bandung.
- Sasmito, E., 1998, Efek Hipoglikemik Biji Duku (*Lansium domesticum* Corr) pada Tikus Winstar Jantan, *Majalah Obat Tradisional*, 3(6), 174-183.
- Schwinger, M., B. Ehhammer and W. Kraus, 1984, Methodology of the *Epilachna varivestis* Bioassay of Antifeedants Demonstrated with Some Compounds from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*, *Proc. 2nd Int. Neem Conference*, Universitas Hohenheim.
- Vyehara, Tadao, Suzuki, Ichiro, Yamamoto, Yoshinori, 1988, Stereospecific Synthesis of 3-oxo- α -bourbone and the Cisoid Isomer for Structural Determination of The Toxic Component of *Lansium domesticum*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*
- Tjokronegoro, R.K., 1987, *Penelusuran Senyawa Kandungan Tumbuhan Indonesia Bioaktif terhadap Serangga*, Desertasi, Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Yapp, D.T.T. and S.Y. Yap, 2002, *Lansium domesticum*: Skin and Leaf Extracts of this Fruit Interrupt the Lifecycle of *Plasmodium falciparum*, and are Active towards a Chloroquine-resistant Strain of the Parasite (T9) In Vitro, *Journal of Pharmacology*, 85, 145-150.