



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA
KIMIA PADA *PARMOTREMA TINCTORUM* (DESPR EX. NYL.)
HALE DAN *HYPOTRACHYNA OSSEOALBA* (VAIN.) Y.S. PARK
& HALE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
SENYAWA SITOTOKSIK DAN ANTIOKSIDAN**

DISERTASI

**IRMA KARTIKA KUSUMANINGRUM
0706220902**

**PROGRAM PASCA SARJANA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA**

**DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA
KIMIA PADA *PARMOTREMA TINCTORUM* (DESPR EX. NYL.)
HALE DAN *HYPOTRACHYNA OSSEOALBA* (VAIN.) Y.S. PARK
& HALE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
SENYAWA SITOTOKSIK DAN ANTIOKSIDAN**

DISERTASI

Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Doktor

**IRMA KARTIKA KUSUMANINGRUM
0706220902**

**PROGRAM PASCA SARJANA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Irma Kartika Kusumaningrum
NPM : 6700220902
Tanda tangan : 
Tanggal : 2011

ii

iii

JUDUL : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA KIMIA PADA PARMOTREMA TINCTORUM (DESPR. EX. NYL.) HALE DAN HYPOTRACHYNA OSSEOALBA (VAIN) Y.S. PARK & HALE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI SENYAWA SITOTOKSIK DAN ANTIOKSIDAN

NAMA : IRMA KARTIKA KUSUMANINGRUM

NPM : 0706210902

Menyetujui,


Prof. Dr. Wahyudi Priyono Sawarso, Dipl.Chem.
Promotor


Dr. Ir. A. Harry Cahyana
Kopromotor


Prof. Dr. Soleh Koeso
Penguji


Prof. Dr. Sumi Hadivono PWS
Penguji


Dr. Endang Saepudin
Penguji



Dr. Muhammad Hanafi
Penguji


Dr. Berna Elva, Ang, M.Si
Penguji

Ketua Program Studi Ilmu Kimia
Program Pascasarjana FMIPA UI


Dr. Endang Saepudin

Ketua Program Pascasarjana
Dehan FMIPA UI


Dr. Adi Basukriadi, M.Sc

Depok, 29 Desember 2011

iv

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Penulisan disertasi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor pada Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Indonesia

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan disertasi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terimakasih kepada :

1. Kementerian Pendidikan Nasional, yang telah memberikan beasiswa demi kelancaran studi kami
2. Pimpinan Universitas Negeri Malang yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk mengikuti program Pendidikan S3 di Universitas Indonesia
3. Universitas Indonesia beserta segenap jajarannya khususnya Departemen Kimia FMIPA UI, beserta segenap dosen yang mencurahkan ilmu dan memberi kesempatan kepada kami untuk menuntaskan studi dan penelitian
4. Prof. Dr. Wahyudi Priyono Suwarso dan Dr. A. Herry Cahyana, selaku promotor dan kopromotor yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan disertasi ini
5. Tim Penguji: Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc, Prof. Dr. Sumi Hudyono, Dr. M. Hanafi, Dr. Endang Saepudin, Dr. Berna Elya, Apt, M. Si
6. Puslit Kimia LIPI beserta segenap jajarannya yang telah membantu dalam pelaksanaan analisis
7. Papa dan Mama, Bapak dan Ibu, Adik-adikku, Dody, Ari, Azis, Alfi, Ica, dan One, suami dan anak-anakku tersayang, Tarin dan Dedra, atas dukungan, bantuan dan kesabaran kalian yang sangat menginspirasi
8. Sahabat-sahabat yang bersama mereka saya temukan semangat dan bantuan yang sangat berarti dalam melalui segala hal selama ini, Ibu Uli (narasumber untuk segala hal) Pak Nurdin, Pak Cholid, Pak Antoni, Pak Heny, Bu Helmy, Pak Hedy, Pak Hadi, Pak Sasmito, Pak Nuki, Pak Nirwan, Pak Oman, P Alfred, Bu Helmi, Bu Lena, Bu Ratna, Bu Anne, Bu Ani, Bu Tia, Mbak Sofa, Pak Ahmad, dan Arham, terimakasih atas diskusi, dorongan, bantuan dan kebersamaan yang tak terlupakan.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga disertasi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.Amin

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Irma Kartika Kusumaningrum
NPM : 0706220902
Program Studi : Doktor Ilmu Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Disertasi

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Isolasi Dan Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Pada *Parmotrema tinctorum* (Despr Ex. Nyl.) Hale dan *Hypotrachyna osseoalba* (Vain.) Y.S. Park & Hale Serta Uji Bioaktivitasnya Sebagai Senyawa Sitotoksik dan Antioksidan

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan disertasi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal :

Yang menyatakan

(Irma Kartika Kusumaningrum)

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa kimia dari ekstrak talus lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. Ex. Nyl. Hale) dan *Hypotrachyna osseoalba* (Vain) Y.S. Park & Hale serta menguji bioaktivitas senyawa hasil isolasi sebagai senyawa sitotoksik terhadap sel *murine leukemia P-388* dan senyawa antioksidan. Ekstraksi senyawa dari talus lichen dilakukan dengan pelarut n-heksana, diklorometana, etil asetat dan aseton. Untuk melihat potensi bioaktif ekstrak lichen dilakukan uji toksisitas ekstrak terhadap *Artemia salina* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Berdasarkan hasil uji *BSLT* keseluruhan ekstrak talus lichen toksik terhadap *A. salina*. Uji warna dilakukan terhadap ekstrak untuk melihat jenis senyawa yang terkandung pada ekstrak talus lichen. Terdapat kandungan senyawa fenolik pada seluruh ekstrak, sedangkan depsida, metabolit sekunder pada lichen yang umumnya bersifat bioaktif banyak terdapat pada ekstrak etil asetat dan aseton. Dari hasil pemisahan dan isolasi telah diperoleh tiga senyawa murni dari ekstrak talus lichen *P. tinctorum* yaitu asam orselinat, metil orselinat, dan senyawa yang diusulkan sebagai senyawa baru pada ranah penelitian lichen yang diberi nama 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester, serta dua senyawa murni dari ekstrak talus lichen *H. osseoalba* yaitu, asam difraktat, dan asam iso everninat. Senyawa asam iso everninat ($IC_{50}=21,5 \mu\text{g/ml}$) memiliki kemampuan dalam taraf sedang untuk menghambat pertumbuhan sel *murine leukemia P-388*, sedangkan senyawa asam orselinat, metil orselinat, 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester, dan asam difraktat tidak aktif sebagai penghambat pertumbuhan sel *murine leukemia P-388*. Dari hasil uji bioaktivitas sebagai antioksidan seluruh ekstrak bersifat aktif dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah, asam orselinat $IC_{50}=77,42 \mu\text{g/mL}$, metil orselinat $IC_{50}=87,77 \mu\text{g/mL}$, asam difraktat $IC_{50}=90,06 \mu\text{g/mL}$, senyawa 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester $IC_{50}=84,57 \mu\text{g/mL}$, senyawa asam iso everninat $IC_{50}=70,83 \mu\text{g/mL}$.

ABSTRACT

The aims of the research is to isolate and to identify chemical compounds of *Parmotrema tinctorum*'s (Despr Ex. Nyl. Hale) and *Hypotrachyna osseoalba*'s (Vain) YS Park & Hale thallus extract and test their bioactivity as cytotoxic compounds against *murine leukemia P-388* cell and antioxidant compounds. Extraction of the compounds from the lichen's thallus was done with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and acetone . To observe the bioactive potency of the lichen extract, toxicity test against *Artemia salina* with *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* test method was done. The lichen' thallus extracts are toxic to *A. salina*. Color test was done to observe the content of the extract . All of the extract have phenolic compound. The ethyl acetic and acetone extract, rich of depsida, the lichen secondary metabolites which commonly has bioactive potency. Five pure compounds have been obtained from extracts, three from *P. tinctorum* extract , there are orsellinic acid, methyl orselinate, and 2,4 dihydroxy 3,5-dimethyl benzoic acid methyl ester, the compounds that are proposed as new natural product compounds. Two pure compounds have been isolated from *H. osseoalba* extract, there are, diffractaic acid, and iso everminic acid . Iso everminic acid ($IC_{50} = 21.5 \mu\text{g/ mL}$) could inhibit *murine leukemia P-388* cell growth at medium stage, but orselinic acid, methyl orselinate, 2,4 dihydroxy 3,5-dimethyl benzoic acid methyl ester, and diffractaic acid couldn't inhibit *murine leukemia P-388* cell growth. All of the extract has antioxidant potency with IC_{50} values are, orsellinic acid $IC_{50}= 77.42 \mu\text{g/mL}$, methyl orsellinic $IC_{50}= 87.77 \mu\text{g/mL}$, diffractaic acid $IC_{50}=90,06 \mu\text{g/mL}$, 2,4 dihydroxy 3,5-dimethyl benzoic acid methyl ester $IC_{50}=84,57 \mu\text{g/mL}$, iso everminic acid $IC_{50}=70,83 \mu\text{g/mL}$.

DAFTAR ISI

	Hal.
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
UCAPAN TERIMAKASIH	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Lichen	6
2.2. Morfologi dan taksonomi lichen.....	7
2.3. Manfaat lichen	11
2.4. Senyawa yang terdapat dalam lichen	12
2.4.1. Metabolit primer	12
2.4.2. Senyawa asetogenin	13
2.4.3. Turunan fenilalanin	17
2.4.4. Vitamin	17
2.5. Lichen <i>P. tinctorum</i> (Despr. Nyl. Hale) dan <i>H. osseoalba</i> (Vain.) Y.S.Park & Hale	17
2.6. Senyawa antikanker	22
2.7. Senyawa antioksidan dan radikal bebas	23
2.7.1. Senyawa antioksidan	23
2.7.2. Radikal bebas	24
2.8. Reaksi warna	26
2.8.1. Uji C	26
2.8.2. Uji K	26
2.8.3. Uji PD	27
2.8.4. Uji KC	27
2.8.5. Uji Dimroth.....	27
2.9. Uji bioaktivitas (bioassay)	28
2.9.1. Uji toksisitas metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> dengan <i>Artemia salina</i>	29
2.9.2. Uji sitotoksitas dengan metode <i>MTT Assay</i>	29
2.9.3. Uji aktivitas senyawa sebagai antioksidan.....	30
BAB III. METODE PENELITIAN	31

3.1. Metode Penelitian	31
3.2. Bahan Tanaman	31
3.3. Alat dan Bahan Kimia	32
3.4. Prosedur Penelitian	32
3.4.1. Ekstraksi serbuk talus lichen	32
3.4.2. Reaksi warna khusus untuk identifikasi umum senyawa kimia pada talus lichen	35
3.4.3. Identifikasi struktur senyawa	35
3.4.4. Uji toksisitas ekstrak terhadap larva <i>Artemia salina</i> Leach	36
3.4.5. Uji sitotoksitas senyawa hasil isolasi terhadap sel <i>Murine leukemia P-388</i>	37
3.4.6. Uji aktivitas senyawa hasil isolasi sebagai antioksidan	39
BAB IV. DATA HASIL PENELITIAN	41
4.1. Gambaran Umum	41
4.2. Hasil Uji Warna	41
4.3. Toksisitas Ekstrak Talus Lichen Terhadap <i>A. salina</i> Leach	45
4.4. Penentuan Struktur Senyawa	47
4.4.1. Penentuan struktur senyawa (1)	47
4.4.2. Penentuan struktur senyawa (2)	50
4.4.3. Penentuan struktur senyawa (3)	53
4.4.4. Penentuan struktur senyawa (4)	56
4.4.5. Penentuan struktur senyawa (5)	60
4.5. Usulan biosintesis senyawa 2,4-dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester	62
4.6. Sitotoksitas senyawa hasil isolasi terhadap sel <i>Murine leukemia P-388</i>	63
4.7. Aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi	64
BAB V. KESIMPULAN	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	72

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 2.1. Senyawa aktif yang terdapat dalam lichen	12
Tabel 2.2. Struktur dasar depsida yang terdapat pada lichen	15
Tabel 2.3. Pengamatan hasil uji warna K, C, KC dan PD	28
Tabel 2.4. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH	30
Tabel 4.1. Hasil uji warna untuk ekstrak dan serbuk talus lichen <i>P. tinctorum</i>	42
Tabel 4.2. Hasil uji warna untuk ekstrak dan serbuk talus lichen <i>H. osseoalba</i>	42
Tabel 4.3. Hasil uji toksisitas ekstrak talus lichen <i>P. tinctorum</i>	45
Tabel 4.4. Hasil uji toksisitas ekstrak talus lichen <i>H. osseoalba</i>	45
Tabel 4.5. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (1) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS.....	47
Tabel 4.6. Data hasil analisis spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa (1)	48
Tabel 4.7. Perbandingan data pergeseran kimia $^1\text{H NMR}$ dan $^{13}\text{C NMR}$ senyawa (1) dengan pergeseran kimia $^1\text{H NMR}$ dan $^{13}\text{C NMR}$ Asam orselinat	50
Tabel 4.8. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (2) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS	50
Tabel 4.9. Data hasil analisis spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa (2)	51
Tabel 4.10. Perbandingan data pergeseran kimia $^1\text{HNMR}$ dan $^{13}\text{CNMR}$ senyawa (2) dengan pergeseran kimia $^1\text{HNMR}$ dan $^{13}\text{CNMR}$ metil orselinat	53
Tabel 4.11. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (3) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS.....	53
Tabel 4.12. Data hasil analisis spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ dan HMBC senyawa (3)	54
Tabel 4.13. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (4) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS.....	56
Tabel 4.14. Perbandingan data pergeseran kimia $^1\text{HNMR}$ dan $^{13}\text{CNMR}$ senyawa (4) dengan pergeseran kimia $^1\text{HNMR}$ dan $^{13}\text{CNMR}$ asam difraktat	59
Tabel 4.15. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (5) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS	60
Tabel 4.16. Data hasil analisis spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa (5)	60
Tabel 4.17. Hasil pengujian sitotoksitas terhadap sel <i>Murine leukemia</i> P-388 pada senyawa hasil isolasi	63

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 2.1. Asam 9,10,12,13, Tetrahidroksiheneikosanoat	13
Gambar 2.2. Asam usnat	14
Gambar 2.3. Asam barbatolat	16
Gambar 2.4. Asam alekteriorat	16
Gambar 2.5. Zeorin	16
Gambar 2.6. Asam poliporat	17
Gambar 2.7. Asam teleforat	17
Gambar 2.8. Lichen <i>P. Tinctorum</i>	19
Gambar 2.9. Lichen <i>H. osseoalba</i>	20
Gambar 2.10. Struktur senyawa asam lividat	20
Gambar 2.11. Struktur senyawa lichenxanton 1-hidroksi 3,6, dimetoksi 8- metilxanton	21
Gambar 2.12. Struktur senyawa atranorin	21
Gambar 2.13. Struktur senyawa asam lekanorat	21
Gambar 2.14. Struktur senyawa kloroatranorin	21
Gambar 2.15. Struktur senyawa asam norstiktat	22
Gambar 3.1. Bagan kerja pembuatan ekstrak lichen <i>P. tinctorum/ H. osseoalba</i>	33
Gambar 3.2. Bagan kerja isolasi senyawa pada ekstrak aseton <i>P. tinctorum</i>	34
Gambar 3.3. Bagan kerja pembuatan ekstrak diklorometana lichen <i>P. tinctorum</i>	34
Gambar 3.4. Bagan kerja isolasi senyawa pada ekstrak diklorometana <i>H. osseoalba</i>	35
Gambar 4.1. Struktur molekul senyawa (1)	49
Gambar 4.2. Struktur molekul senyawa (2)	52
Gambar 4.3. Struktur molekul senyawa (3)	55
Gambar 4.4. Struktur molekul senyawa (4)	58
Gambar 4.5. Struktur molekul senyawa (5)	62
Gambar 4.6. Biosintesis senyawa 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester	62
Gambar 4.7. Aktivitas antioksidan senyawa asam orselinat	65
Gambar 4.8. Aktivitas antioksidan senyawa metil orselinat	65
Gambar 4.9. Aktivitas antioksidan senyawa 2,4-dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester	65
Gambar 4.10. Aktivitas antioksidan senyawa asam difraktat	66
Gambar 4.11. Aktivitas antioksidan senyawa asam iso everminat	66

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Kromatogram LC-MS senyawa (1)	72
Lampiran 2. Spektrum FTIR senyawa (1)	73
Lampiran 3. Spektrum UVVis senyawa (1)	74
Lampiran 4. Spektrum ¹ HNMR senyawa (1)	75
Lampiran 5. Spektrum ¹³ CNMR senyawa (1)	76
Lampiran 6. Kromatogram LC-MS senyawa (2)	77
Lampiran 7. Spektrum FTIR senyawa (2)	78
Lampiran 8. Spektrum UV-Vis senyawa (2)	79
Lampiran 9. Spektrum ¹ HNMR senyawa (2)	80
Lampiran 10. Spektrum ¹³ CNMR senyawa (2)	81
Lampiran 11. Kromatogram LC-MS senyawa (3)	82
Lampiran 12. Spektrum FTIR senyawa (3)	83
Lampiran 13. Spektrum UV-Vis senyawa (3)	84
Lampiran 14. Spektrum ¹ HNMR senyawa (3)	85
Lampiran 15. Spektrum ¹³ CNMR senyawa (3)	86
Lampiran 16. Spektrum HMQC senyawa (3)	87
Lampiran 17. Spektrum HMBC senyawa (3)	88
Lampiran 18. Kromatogram LC-MS senyawa (4)	89
Lampiran 19. Spektrum FTIR senyawa (4)	90
Lampiran 20. Spektrum UVVis senyawa (4)	91
Lampiran 21. Spektrum ¹ HNMR senyawa (4)	92
Lampiran 22. Spektrum ¹³ CNMR senyawa (4)	93
Lampiran 23. Spektrum HMQC senyawa (4)	94
Lampiran 24. Spektrum HMBC senyawa (4)	95
Lampiran 25. Kromatogram LC-MS senyawa (5)	96
Lampiran 26. Spektrum FTIR senyawa (5)	97
Lampiran 27. Spektrum UVVis senyawa (5)	98
Lampiran 28. Spektrum ¹ HNMR senyawa (5)	99
Lampiran 29. Spektrum ¹³ CNMR senyawa (5)	100
Lampiran 30. Spektrum HMQC senyawa (5)	101
Lampiran 31. Spektrum HMBC senyawa (5)	102
Lampiran 32. Data Uji BSLT Ekstrak Talus Lichen <i>P. Tinctorum</i>	103
Lampiran 33. Data Uji BSLT Ekstrak Talus Lichen <i>H. osseoalba</i>	104
Lampiran 34. Hasil Uji Aktivitas Anti Oksidan Senyawa Hasil Isolasi	105

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Dewasa ini, penggunaan senyawa bahan alam cenderung meningkat, tingginya minat dan frekuensi penggunaan produk obat yang berasal dari bahan alam ditunjukkan oleh fakta hasil penelitian yang menyatakan bahwa, 40% dari 35 jenis obat yang paling banyak diresepkan, merupakan obat yang diperoleh dari senyawa bahan alam dan turunannya. Bahkan, sepertiga dari obat anti kanker yang diresepkan di Amerika memiliki bahan aktif berupa, taksan, paklitaksel dosotaksel, turunan kamftotesin, irinotekan dan topotekan, yang merupakan senyawa yang diperoleh dari bahan alam. Dalam kurun waktu, 1981 hingga 2002, 52% dari senyawa kimia baru yang dilempar ke pasar, merupakan senyawa hasil isolasi dari bahan alam, turunannya, atau hasil sintesis laboratorium yang merupakan replikasi senyawa bahan alam (Chin, 2006). Hingga saat ini, senyawa bahan alam telah digunakan untuk mengobati 87% dari penyakit manusia, diantaranya senyawa anti kanker dari bahan alam, yang telah digunakan untuk menangani hampir sepertiga kasus kanker (Rao, 2008).

Senyawa bahan alam yang digunakan dengan tepat akan menghasilkan efektivitas pengobatan yang tinggi dan efek samping yang rendah. Senyawa bahan alam umumnya merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh proses metabolisme tanaman. Keunggulan dari senyawa bahan alam yang umumnya diperoleh dari tumbuhan adalah strukturnya yang mudah diterima oleh tubuh, diduga hal ini disebabkan oleh adanya beberapa kesesuaian antara reaksi-reaksi yang terjadi pada rangkaian siklus metabolisme manusia dan tumbuhan (Gordaliza, 2008).

Sebagai negara tropis kekayaan hayati Indonesia sangat berlimpah. Menurut survei yang dilakukan PT Eisai, di Indonesia terdapat sekitar 7000 spesies tanaman obat, yang berarti sekitar 90% dari seluruh jenis tanaman obat yang ditemukan di Asia, dari jumlah tersebut baru sedikit sekali yang benar-benar dimanfaatkan dalam pengobatan. Menurut catatan sebanyak 14 spesies dari 45 spesies tanaman yang diimpor oleh Amerika Serikat sebagai bahan baku

obat penting berasal dari Indonesia, termasuk diantaranya adalah tapak dara yang merupakan bahan baku obat kanker (Katno, 2007).

Kanker adalah tumor yang membahayakan yaitu suatu penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan yang tidak terkendali pada jaringan yang telah mengalami perubahan menjadi tidak normal, dan terjadi penyebaran sel kanker dari titik asalnya ke bagian tubuh lain. Tumor terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel. Paparan radikal bebas yang berlebihan dapat berpotensi merusak DNA tubuh sehingga terjadi mutasi sel yang merupakan awal timbulnya kanker. Radikal bebas dapat diperoleh dari pengaruh lingkungan, paparan sinar UV, asap kendaraan dan sebagainya, maupun dari berbagai proses metabolisme normal (Siswandono, 1995). Sampai saat ini tingkat keberhasilan pengobatan kanker masih belum memuaskan, terutama karena terjadinya resistensi sel kanker terhadap pengobatan dengan senyawa anti kanker yang telah digunakan saat ini (Ami, 2007). Pengobatan kanker juga menghadapi masalah terkait dengan tingginya biaya pengobatan konvensional dan efek pengobatan yang besar. Pengaruh paparan radikal bebas yang berlebihan sebagai salah satu penyebab kanker dapat dikurangi dengan penggunaan antioksidan. Antioksidan adalah substansi yang dapat menetralkan radikal bebas (Gitawati, 1995).

Sintesis obat dan isolasi bahan obat baru dari bahan alami, merupakan salah satu pilihan untuk mengatasi masalah pengobatan kanker. Secara empirik, banyak tanaman obat yang digunakan dalam pengobatan kanker secara tradisional, namun sayangnya, hanya sedikit yang telah diteliti dengan baik aktivitas senyawa yang terkandung didalamnya. Informasi tentang cara ekstraksi yang tepat, kandungan senyawa dan aktivitasnya sangat bermakna untuk menentukan metode dan efektivitas terapi pengobatan (Katno, 2007).

Alga, lichen, jamur, dan tanaman tingkat tinggi, merupakan sumber alami untuk menemukan senyawa aktif baru, baik dari senyawa-senyawa metabolit sekundernya langsung maupun modifikasi kimia terhadap senyawa yang diisolasi dari bahan alam. Lichen adalah tumbuhan tingkat rendah yang merupakan simbiosis antara jamur (mikobion) dan alga (fikobion). Lichen memiliki sejumlah metabolit sekunder unik yang tidak dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi dan banyak diantaranya merupakan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas sebagai

anti kanker, anti oksidan, antibiotik dan anti HIV. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh lichen diantaranya adalah, senyawa fenolik, dibenzofuran, asam usnat, depsida, depsidon, depson, kuinon dan turunan asam pulvinat. (Balaji, 2007). Depsida merupakan metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada lichen, dan jarang ditemukan pada tumbuhan lain. Berdasarkan penelitian sebelumnya depsida yang ditemukan pada lichen memiliki berbagai aktivitas diantaranya adalah sebagai antitumor, antibiotik, dan inhibitor enzim. Lichen juga kaya akan senyawa fenolik, yang berpotensi bioaktif sebagai antioksidan (Kosanic, 2011). Di Cina dan India, lichen telah digunakan dalam berbagai ramuan pengobatan tradisional untuk penyakit ginjal, faringitis, rabies, infeksi cacing dan artritis. Berbagai penelitian tentang manfaat lichen dalam pengobatan menunjukkan bahwa lichen merupakan salah satu bahan yang memiliki khasiat, uji pada hewan menunjukkan terdapatnya aktivitas sebagai anti tumor, antimikroba dan immunomodulator (Malhotra, 2008).

Lichen famili *parmeliaceae*, merupakan salah satu famili lichen yang banyak digunakan dalam pengobatan tradisional, misalnya, *Parmelia physodes* yang banyak mengandung asam usnat, yang digunakan sebagai antibiotika dengan spektrum yang luas, *P. karatschadalis* di India digunakan sebagai diuretik, sedative dan obat luka luar, *P. saxatilis* digunakan dalam berbagai ramuan obat di Cina, dan seduhan *P. saxicola* yang digunakan di California untuk mengobati kolik (Sharnoff, 2008). Pohon dan lingkungan tempat tumbuh lichen berpengaruh terhadap metabolit sekunder yang dihasilkannya. Berdasarkan penelitian sebelumnya pada famili *parmeliaceae* diantaranya terdapat asam fisudat, asam fisudalat, asam hidroksifisudat, asam lekanorat dan atranorin yang merupakan senyawa bioaktif. Asam fisudat dan fisudalat dapat menghalangi terjadinya mutagenitas pada *Salmonella typhymurium* terhadap paparan benzopirena dan amina heterosiklik sedangkan atranorin diketahui memiliki kemampuan sebagai anti kanker (Shibamoto, 2006).

P. tinctorum (Despr Ex.Nyl.) Hale dan *Hypotrachyna osseoalba* (Vain.) Y.S. Park & Hale atau disebut dengan nama lain *P. formosana* (Zahlbr.) adalah lichen yang termasuk dalam famili *Parmeliaceae* yang banyak terdapat di Indonesia. Di India, *P. tinctorum* merupakan bagian dari formula ramuan tonikum tradisional. Dari lichen *P. tinctorum* telah diisolasi metabolit sekunder berupa asam

lekanorat, isolekanorat, atranorin, kloroatranorin dan asam norstiktat, yang merupakan senyawa bioaktif (Ding, 1990) Sedangkan dari lichen *H. osseoalba*, peneliti sebelumnya berhasil mengisolasi asam lividat yang merupakan senyawa anti kanker dan lichenxanthon (Culberson, 1979). Tumbuhan dengan famili yang sama cenderung mempunyai kemiripan senyawa yang dikandungnya atau secara umum mengandung konstituen karakteristik lain yang secara struktur terkait. Tumbuhan yang memiliki kekerabatan secara taksonomi, memiliki kecenderungan untuk mengandung senyawa yang berkaitan satu sama lain (Markham, 1988). Pada lichen famili *Parmeliaceae* telah banyak didapatkan senyawa bioaktif, sementara itu secara empirik lichen famili *Parmeliaceae* telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional. Kedua hal ini menjadi dasar pemilihan obyek penelitian yang mengambil sampel dari lichen famili *parmeliaceae*. Diharapkan akan diperoleh isolat senyawa bioaktif pada *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*.

Lichen yang tumbuh pada tanaman perkebunan dianggap sebagai hama yang menghambat pertumbuhan tanaman induk dan harus dibuang. Pencarian senyawa bioaktif yang terdapat pada lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* perlu dilakukan untuk mendapatkan lebih banyak senyawa-senyawa bioaktif yang dapat memberikan kontribusi terhadap masalah pengobatan penyakit yang dewasa ini masih menghadapi berbagai tantangan. Berdasarkan latar belakang diatas dalam penelitian ini akan dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi depsida, suatu kelompok senyawa metabolit sekunder dari lichen, yang banyak diantaranya merupakan senyawa bioaktif khas lichen, dari lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*.

1.2. Tujuan Penelitian

1. Melakukan isolasi dan menentukan struktur dan sifat fisiko kimia senyawa golongan depsida yang terdapat dalam talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*
2. Menguji bioaktivitas senyawa hasil isolasi talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* sebagai senyawa sitotoksik dan senyawa antioksidan

1.3. Manfaat Penelitian

1. Kajian tentang metode isolasi, kandungan senyawa dan aktivitas senyawa hasil isolasi dari lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* , sangat bermanfaat untuk memperkaya literatur di bidang kimia bahan alam, farmasi, kedokteran dan bidang ilmu lain yang terkait
2. Senyawa baru hasil isolasi akan menambah keragaman jenis senyawa dan dapat menjadi matriks baru, yang memiliki prospek untuk diteliti dan direkayasa sebagai bahan obat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Lichen

Lichen adalah tumbuhan gabungan antara jamur dan alga sedemikian rupa sehingga dari segi morfologi dan fisiologi merupakan satu kesatuan. Lichen hidup sebagai epifit pada pohon, diatas cadas dan batu, tidak memerlukan syarat hidup yang rumit dan tahan terhadap kekurangan air. Alga yang menyusun batang tubuh lichen disebut gonidium, bersel tunggal atau berkoloni, kebanyakan adalah alga hijau biru (cyanophyta) atau alga hijau (chlorophyta). Jamur yang menyusun lichen adalah golongan ascomycetes, pyrenomycetales dan basidiomycetes. Sifat hubungan alga dan jamur adalah simbiosis mutualisme atau helotisme. Lichen menghasilkan senyawa yang unik untuk dapat beradaptasi pada habitat yang ekstrim, diantaranya berbagai jenis pigmen dan antibiotik yang juga membuat lichen ini sangat berguna bagi manusia. Lichen berkembang biak secara vegetatif dan sebagian kecil saja yang berkembang biak dengan perantaraan soredium. (Tjitrosoepomo, 1989)

Pada lichen, jamur menangkap hasil fotosintesis yang dilakukan oleh alga, alga menyediakan senyawa organik dan vitamin untuk jamur serta membentuk organisme simbiotik, seperti pada tanaman berklorofil. Karena jumlah klorofil yang sangat sedikit maka lichen sangat menyukai cahaya untuk memaksimalkan kemampuan fotosintesisnya. Bahan makanan organik dan vitamin yang dihasilkan oleh alga selama fotosintesis diberikan kepada jamur untuk dimetabolisme lebih lanjut dan sebagian dimanfaatkan oleh alga sendiri. Alga menyerap gula, nitrogen dan fosfat. Sintesis protein dan karbohidrat berjalan lambat. Cadangan nutrisi yang disimpan dalam talus dapat digunakan lagi oleh alga dan jamur, karena itu lichen tahan hidup pada kondisi yang ekstrim.

Talus lichen pada umumnya mempunyai struktur sel yang sel lebih rumit, daripada struktur sel organisme penyusunnya, serta mempunyai kemampuan untuk berfotosintesis, yaitu mengubah senyawa organik sederhana menjadi

senyawa organik yang lebih kompleks. Kemudian hasil biosintesis yang dilakukan oleh alga akan diberikan kepada jamur untuk dimetabolisis lebih lanjut menjadi senyawa yang diperlukan untuk pembentukan talusnya dan metabolit sekunder yang diperlukan oleh jamur. Jenis jamur yang bersimbiosis dengan alga akan menentukan jenis atau kelompok metabolit sekunder yang dihasilkan. Pembentukan metabolit primer yang dilakukan oleh alga akan menghasilkan karbohidrat dari jenis monosakarida. Kemudian metabolit primer tersebut oleh jamur akan diubah lebih lanjut menjadi metabolit sekunder melalui tiga jalur biosintesis, yaitu, jalur asam sikhimat, jalur asam mevalonat dan jalur poliketida. Melalui jalur asam sikhimat akan dihasilkan senyawa-senyawa jenis diketopiperazin, terfenilkuinon, dan turunan asam pulvinat. Dari jalur asam mevalonat akan dihasilkan senyawa jenis diterpen, sesterpen, triterpen, karoten, dan sterol. Dari jalur poliketida akan dihasilkan senyawa jenis asam dan ester alifatik, asam usnat, depsida dan depsidon, depson, dibenzofuran, benzil ester, kromon, xanton, naftokuinon, dan antrakuinon.

2.2. Morfologi dan taksonomi lichen

Tubuh lichen dinamakan talus yang secara vegetatif mempunyai kemiripan dengan alga dan jamur. Talus terdapat dalam berbagai warna, abu-abu atau abu-abu kehijauan, kuning, oranye, coklat atau merah. Secara lengkap morfologi talus terdiri atas empat bagian tubuh yang dapat diamati secara jelas yaitu:

1. Korteks atas, berupa jalinan yang padat disebut pseudoparenkim dari hifa jamurnya. Sel ini saling mengisi dengan material yang berupa gelatin.
2. Daerah alga, lapisan biru atau biru hijau yang terletak di bawah korteks atas. Terdiri dari jalinan hifa yang longgar. Diantara hifa-hifa itu terdapat sel-sel hijau, yaitu gleokapsa, nostok, rivularia dan klorela. Lapisan talus tempat fotosintesa disebut lapisan gonidial dan berfungsi sebagai organ reproduksi.
3. Medulla, terdiri dari jalinan lapisan hifa yang longgar. Hifa jamur pada bagian ini tersebar ke segala arah dengan dinding yang tebal. Hifa pada bagian yang lebih dalam tersebar di sepanjang sumbu yang tebal pada bagian atas dan tipis pada bagian ujung, lapisan tadi membentuk suatu untaian hubungan antara

dua pembuluh.

4. Korteks bawah, terdiri dari struktur hifa yang sangat padat dan membentang secara vertikal terhadap permukaan talus atau sejajar dengan kulit bagian luar. Korteks bawah ini sering berupa sebuah akar (*rhizines*). Ada beberapa jenis lichen tidak mempunyai korteks bawah dan digantikan oleh lembaran tipis yang terdiri dari hipotalus yang berfungsi sebagai proteksi.

Lichen memiliki struktur vegetatif yang unik. Setiap bagian dari struktur tersebut mempunyai arti penting secara fisiologis dan merupakan panduan utama dalam studi taksonomi lichen. Struktur vegetatif lichen adalah sebagai berikut :

A. Pori aerasi, cyphellae atau pseudocyphellae yang berupa lubang kecil pada permukaan atas dan bawah talus yang berperan dalam proses sirkulasi udara pada talus .

1. Cyphellae, berbentuk rongga bulat yang agak besar serta terdapat pada korteks bawah dan hanya dijumpai pada genus *Sticta*.

2. Pseudocyphellae, mempunyai ukuran yang lebih kecil dari cyphellae dan terdapat pada korteks bawah

B. Diaspora vegetatif berupa :

1. Soredia, terdapat pada bagian medulla yang keluar melalui celah kulit. Soredia dapat dengan mudah diterbangkan angin dan akan tumbuh pada kondisi yang sesuai menjadi tumbuhan lichen yang baru. Jadi pembiakan berlangsung dengan perantaraan soredia. Soredia itu sendiri merupakan kelompok kecil sel-sel alga yang sedang membelah dan diselubungi benang-benang miselium menjadi satu badan yang dapat terlepas dari induknya.

2. Isidia, berbentuk silinder, bercabang seperti jari tangan dan terdapat pada kulit luar. Dengan kemampuannya bergabung dengan talus, isidia dapat menambah luas permukaan luarnya. Sebanyak 25 – 30 % dari spesies foliose dan fruticose mempunyai isidia.

3. Hormosistangia, berupa filamen alga yang diliputi oleh lembaran gelatin yang tebal, perilaku perkembangbiakannya mirip dengan jamur induknya

4. Cephalodia, suatu struktur yang terjadi pada lichen yang terbentuk dari gabungan satu jenis alga dengan dua jenis jamur,. Jika dua jenis jamur bergabung

dengan satu jenis alga, sebaran dua jenis jamur ini tidak terjadi secara homogen, namun berkelompok-kelompok, sehingga penggabungan dengan tipe ini menyebabkan perbedaan struktur talus terjadi pada daerah dimana terdapat perbedaan jenis jamur yang bergabung dengan alga.

Berdasarkan bentuknya, lichen dibedakan atas empat bentuk :

a. Krustosa

Lichen yang memiliki talus yang berukuran kecil, datar, tipis dan selalu melekat ke permukaan batu, kulit pohon atau di tanah. Jenis ini susah untuk mencabutnya tanpa merusak substratnya. Lichen krustosa yang tumbuh terbenam di dalam batu hanya bagian tubuh buahnya yang berada di permukaan disebut endolitik, dan yang tumbuh terbenam pada jaringan tumbuhan disebut endoploidik atau endoploidial. Lichen yang longgar dan bertepung yang tidak memiliki struktur berlapis, disebut leprosa.

b. Foliosa

Lichen foliosa memiliki struktur seperti daun yang tersusun oleh lobus-lobus. Lichen ini relatif lebih longgar melekat pada substratnya. Talusnya datar, lebar, banyak lekukan seperti daun yang mengerut berputar. Bagian permukaan atas dan bawah berbeda. Lichen ini melekat pada batu, ranting dengan *rhizines*. Rhizines ini juga berfungsi sebagai alat untuk mengabsorpsi makanan.

c. Frutikosa

Talusnya berupa semak dan memiliki banyak cabang dengan bentuk seperti pita. Talus tumbuh tegak atau menggantung pada batu, daun-daunan atau cabang pohon. Tidak terdapat perbedaan antara permukaan atas dan bawah.

d. Squamulosa

Lichen ini memiliki lobus-lobus seperti sisik, lobus ini disebut squamulus yang biasanya berukuran kecil dan saling bertindih dan sering memiliki struktur tubuh buah yang disebut podetia.

Lichen sangat sulit untuk diklasifikasikan karena merupakan gabungan dari alga dan jamur serta sejarah perkembangan yang berbeda. Lichen memiliki klasifikasi yang bervariasi, namun kebanyakan diklasifikasikan berdasarkan komponen jamur yang menyusunnya. Yang termasuk *ascolichen* umumnya

berbentuk semak kecil, sedangkan yang termasuk *basidiolichen* berbentuk lembaran. Alga dan jamur yang menyatu akan membentuk batang tubuh lichen yang disebut talus, dan memiliki sifat yang berbeda dengan jamur atau alga asalnya.

Berdasarkan komponen jamur yang menyusunnya, lichen terbagi menjadi :

A. *Ascolichen*

- Jamur penyusunnya tergolong *Pyrenomycetales*, maka tubuh buah yang dihasilkan berupa peritesium..
- Jamur penyusunnya tergolong *Discomycetes*. Lichen membentuk tubuh buah berupa apothecium yang berumur panjang.

B. *Basidiolichen*, berasal dari jamur *Basidiomycetes* dan alga *Mycophyceae*.

C. *Lichen Imperfect*, jamurnya adalah *deutromycetes*, steril

Secara umum Taksonomi lichen adalah sebagai berikut:

Kelas : *Ascolichen*

Bangsa : *Lecanorales*

Suku : *Lichinaceae, Collemataceae, Heppiaceae, Pannariaceae, Coccocarpiaceae, Perligeraceae, Stictaceae, Graphidaceae, Thelotremataceae, Asterothyriaceae, Gyalectaceae, Lecidaeceae, Stereocaulaceae, Cladoniaceae, Umbilicariaceae, Lecanoraceae, Parmeliaceae, Usneaceae, Physciaceae, Theloshistaceae.*

Bangsa : *Sphariales*

Suku: *Pyrenulaceae, Strigulaceae, Verrucariaceae*

Bangsa: *Caliciales*

Suku: *Caliciaceae, Cypheliaceae, Sphaeophoraceae*

Bangsa: *Myrangiiales*

Suku: *Arthoniaceae, Myrangiaceae*

Bangsa: *Pleosporales*

Suku: *Arthopyreniaceae*

Bangsa: *Hysteriales*

Suku: *Lecanactidaceae, Opegraphaceae, Rocellaceae*

Kelas : *Basidiolichen*

Bangsa : *Herpothallaceae, Coraceae, Dictyonamataceae, Thelolomataceae.*

Kelas : *Lichen Imperfect*

Marga: *Cystocoleus, Lepraria, Lichenothrix, Racodium* (Hale, 1973).

2.3. Manfaat lichen

Talus lichen memiliki bermacam-macam manfaat, namun lichen belum digunakan sebagai sumber makanan secara luas, karena lichen memiliki suatu asam yang rasanya pahit dan dapat menimbulkan gatal-gatal, khususnya asam fumarprotosetrarat. Namun pada saat makanan sulit didapat, orang-orang menggunakan lichen sebagai sumber karbohidrat dengan mencampurnya dengan tepung. Di Jepang disebut *iwatake*, dimana *Umbilicaria* dari jenis foliose lichen digoreng atau dimakan mentah. Virus tembakau dapat dibendung dan dicegah oleh ekstrak lichen yaitu : asam lekanorat, asam psoromat dan asam usnat. Dari hasil ekstraksi *Evernia sp., Parmelia sp., dan Ramalina sp.* diperoleh bibit minyak wangi. Ekstrak lichen dapat juga dibuat sebagai bahan pewarna untuk mencelup bahan tekstil. *P. sulcata* digunakan untuk pewarna wol di Amerika Utara. *Evernia prunastri* yang tumbuh di ranting pohon oak di Utara California. diproduksi secara komersial di Eropa dan dikirim ke Prancis untuk industri parfum.

Pada abad pertengahan lichen banyak digunakan oleh ahli pengobatan. Sebagai contoh *Lobaria pulmonaria* digunakan untuk menyembuhkan penyakit paru-paru karena Lobaria dapat membentuk lapisan tipis pada paru-paru. *Usnea dasypoga Rohl.* sebagai obat tradisional untuk TBC, disentri dan diuretik, *Cetraria eslandica* sebagai obat batuk, *Hypogymnia physodes* sebagai penghambat enzim tirosinase dan sebagainya. Selain itu lichen juga digunakan sebagai ekspektoran dan obat liver. Lichen juga ditemukan telah digunakan dalam pengobatan Cina, kepulauan Pasifik, Selandia Baru dan benua lain kecuali Australia. Diperkirakan sekitar 50% dari semua spesies lichen memiliki sifat antibiotik. Penelitian bahan obat-obatan dari lichen terus berkembang terutama di Jepang. Dari hasil penelitian beberapa bahan aktif yang memiliki manfaat pengobatan dalam lichen dan manfaatnya adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1. Senyawa aktif yang terdapat dalam lichen [Huneck, 1996]

Aktivitas	Senyawa aktif yang terdapat dalam lichen
Antibiotik mikroorganisma gram positif	Depsida, asam usnat, atranorin
Antitumor dan antimutagen	(-) asam usnat, asam protolichesterinat, atranorin, asam nefrosteranat, asam poliporat dan turunannya, asam fisudalat, turunan lichenin
HIV (in vitro)	Asetilasi dari β -glukan <i>Umbilicaria esculenta</i>
Penghambat aktivitas enzim	Asam lekanorat (histidin dekarboksilase), (-) asam usnat (urease), asam 4-O-metilriptoklorofaeat (prostaglandin sintetase), ekstrak dari <i>Hypogymnia physodes</i> dan <i>Letharia vulpina</i> (L) Hue (tyrosinase)

2.4. Senyawa yang terdapat dalam lichen

Senyawa kimia yang terdapat dalam lichen sangat beragam, meliputi metabolit primer maupun metabolit sekunder. Secara garis besar peta senyawa kimia yang terdapat dalam lichen adalah sebagai berikut :

2.4.1. Metabolit primer

2.4.1.1. Asam amino, peptida dan protein

Asam amino terdapat dalam lichen sebagaimana halnya terdapat pada tanaman tingkat tinggi. Kandungan protein dalam lichen umumnya bervariasi

antara 1,6 – 11,4% tetapi dapat pula mencapai 20% dari berat keringnya. Metil dan trimetilamin yang merupakan hasil degradasi asam amino dapat terdeteksi pada ekstrak lichen.

2.4.1.2. Polioliol dan Polisakarida

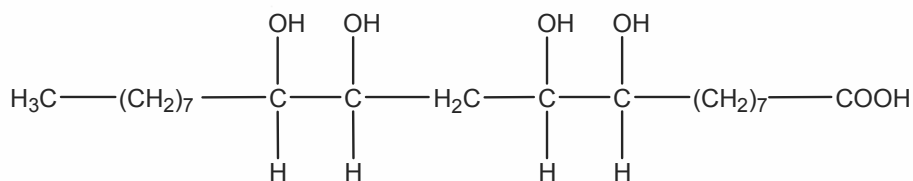
Polioliol dan polisakarida dihasilkan dari proses fotosintesis fikobion yang kemudian dikonversi menjadi senyawa lain oleh mikobion. Polioliol yang terdapat dalam lichen meliputi gliserin, ribitol, D-arabitol, meso-eritrol, D-manitol, mio-inositol, D-volemitol, dan D-sifulitol, senyawa-senyawa di atas larut dalam air. Pada lichen juga terdapat mono dan disakarida seperti, D-glukosa, D-xylosa, D-tagatosa, arabinosa, sakarosa, trehalosa, -O-β-D-glukopiranosil-D-manitol, peltigerosida dan umbisilin. Lichenin berupa poli β-D-glukopiranosida dengan ikatan glikosida β-(1-3) dan β-(1-4), isolichenin berupa poliglikosida dengan ikatan glikosida pada β-(1-3) dan β-(1-4). Asetilasi dari Poli-β-(1-6)-glukan yang diisolasi dari *Umbilicaria esculenta* memiliki efek antikanker terhadap sarkoma-180 pada tikus.

2.4.1.3. Senyawa yang mengandung sulfur

Senyawa mengandung sulfur yang telah teridentifikasi dalam lichen adalah dimetilsulfon.

2.4.2. Senyawa asetogenin

2.4.2.1. Turunan asetat, terdiri atas kelompok asam alifatik mono, di, dan tribasa, kelompok turunan asam lakton, dan kelompok senyawa-senyawa sikloalifatik. Asam alifatik yang terdapat pada hampir setiap lichen adalah asam 9,10,12,13-tetrahidrosiheneikosanoat, asam 9,10,12,13-tetrahidrosidokosanoat.



Gambar 2.1. Asam 9,10,12,13-tetrahidrosiheneikosanoat [Hale, 1973]

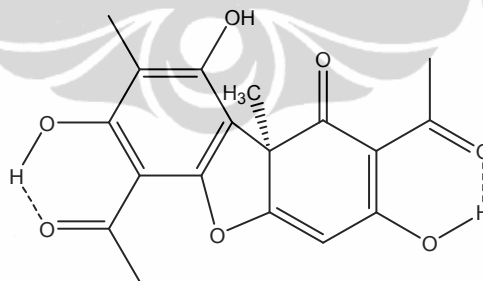
Turunan asam lakton yang telah didapatkan dari isolasi diantaranya adalah asam

akaranoat, asam lichesterinat, asam nefromopsat, asam nefrosteranat, asam protolichesterinat, asam rosellat, asam aloprotolichesterinat yang merupakan asam lakton rantai panjang

Senyawa sikloalifatik yang didapatkan sejauh ini hanyalah portentol orselinat, asetilportentol yang diisolasi dari spesies *Rosella*

2.4.2.2. Senyawa aromatik, terdiri dari kelompok turunan orsinol, turunan naftokuinon, antrakuinon, antron khromon, xanton, dibenzofuran, asam usnat, isousnat, plakodiolat, depsida, depsidon, depson

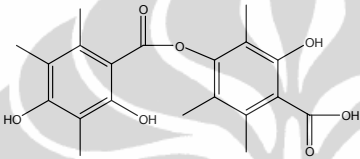
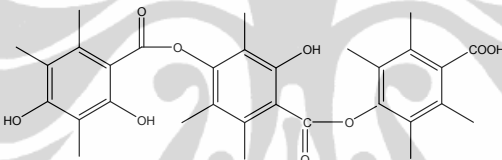
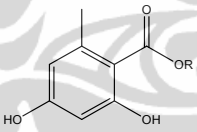
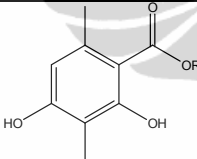
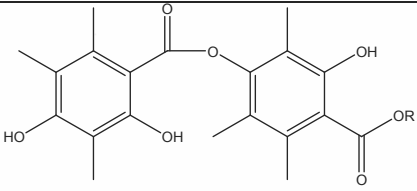
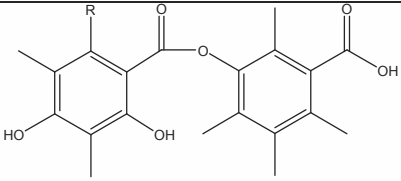
Turunan orsinol yang teridentifikasi saat ini adalah orsinol, etilorselinat, metil β -orsinolkarboksilat dan montagnetol. Pigmen oranye dan merah yang terdapat pada marga *Xantoria* dan *Caloplaca* merupakan salah satu hidroksiantrakuinon yang teridentifikasi. Zat warna merah dan oranye pada lichen umumnya didapatkan dari turunan antrakuinon. Antrakuinon pada lichen dapat dicirikan oleh sifatnya yang menyerap sinar UV pada beberapa panjang gelombang. Warna kuning pucat pada lichen diberikan oleh kromon. Semua xanton yang terdapat dalam lichen diturunkan oleh norlichenxanton. Terdapat lima dibenzofuran yang dikenal pada lichen, asam didimat, asam panarat, asam profilat, asam schizopeltic dan strepsilin. Asam usnat terdapat dalam hampir setiap jenis lichen, bersifat optis aktif.



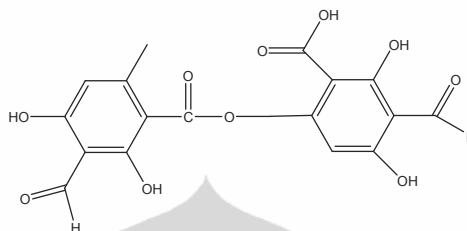
Gambar 2.2. Asam usnat [Chicita, 1969]

Asam isousnat sejauh ini baru ditemukan pada beberapa spesies *Cladonia*, *Lecanora* dan *Sphaeophorus*. Depsida yang terdapat dalam lichen dapat dikelompokkan sebagaimana terdapat dalam Gambar 2.3. sebagai berikut :

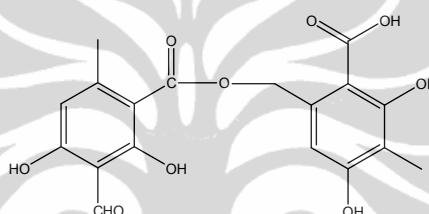
Tabel 2.2. Struktur dasar depsida yang terdapat pada lichen

Jenis	Rumus Umum Struktur
Depsida	
Tridepsida	
Orsinol	
β- orsinol	
<i>p</i> -depsida	
<i>m</i> - depsida	

Atranorin adalah p-depsida yang memiliki bioaktivitas sebagai antibiotik. Turunan benzil ester yang banyak terdapat pada lichen adalah asam barbatolat dan alektoriat.



Gambar 2.3. Asam barbatolat

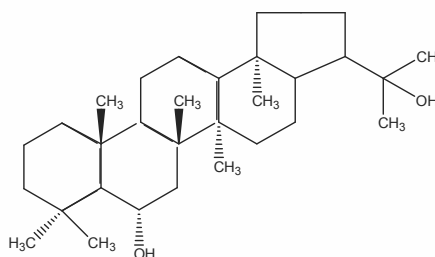


Gambar 2.4. Asam alektoriat

Kelompok depsidon diturunkan secara biogenetis dari depsida melalui oksidasi fenol, sehingga pada lichen umumnya terdapat pasangan depsida-depsidon.

2.4.2.3. Turunan mevalonat meliputi, terpenoid, steroid, karotenoid

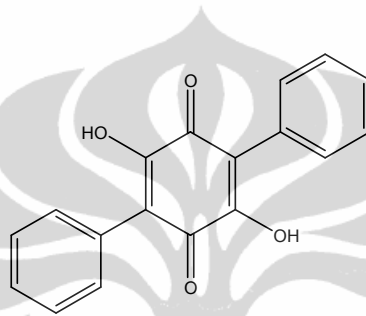
Senyawa turunan mevalonat diturunkan secara biogenetis dari asam mevalonat, pada lichen meliputi terpenoid, steroid dan karotenoid. Triterpen yang diisolasi dari lichen sangat mudah terkrystalisasi, tidak berwarna dan memiliki titik leleh tinggi, mudah terpisah pada pelat silika diatas alumunium. Zeorin adalah triterpen yang umum terdapat dalam lichen



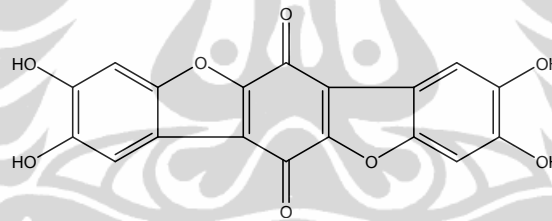
Gambar 2.5. Zeorin

Ergosterol, jamursterol dan sitosterol merupakan steroid yang terdapat dengan konsentrasi rendah dalam lichen. β -karoten terdapat dalam beberapa spesies *Rosella*

2.4.3. Turunan fenilalanin, meliputi asam poliporat, asam teleforat, turunan asam pulvinat



Gambar 2.6. Asam poliporat



Gambar 2.7. Asam teleforat

Senyawa turunan fenilalanin didapatkan dari biosintesis melalui jalur asam sikimat dan fenilalanin. Asam poliporat merupakan pigmen merah ungu yang terdapat pada korteks beberapa spesies *Sticta* dan *Pseudocyphellaria*. Asam teleforat didapatkan dari spesies *Lobaria*. Turunan asam pulvinat diantaranya adalah epanorin, kalisin, asam leptarinat, asam leprarinat metilester, asam pinastrat, amida asam pulvinat, lakton asam pulvinat.

2.4.4. Vitamin

Vitamin yang terdapat dalam lichen adalah asam askorbat, biotin, asam folat, asam folinat, asam nikotinat, asam pantotenat, ribovlavin dan vitamin B (Hale, 1973).

2. 5. Lichen *Parmotrema. tinctorum* (Despr Ex.Nyl.) Hale dan *Hypotrachyna osseoalba* (Vain.) Y.S. Park & Hale

Parmelia merupakan famili lichen yang sangat beragam, terdapat lebih dari 450 spesies. Jumlah spesies pada famili *Parmelia* sangat banyak dengan morfologi tanaman yang bervariasi. Senyawa kimia yang terdapat pada setiap spesies sangat bervariasi dengan spesies yang lain. Metabolit sekunder yang banyak terdapat pada famili *parmelia* diantaranya adalah atranorin, asam lekanorat, lichenxanthon, asam fisudat, asam barbatat, asam salazinat dan asam lobarat. Warna keabu-abuan pada tanaman mengindikasikan terdapatnya atranorin (Culberson, 1979). Salah satu spesies dari famili *parmeliaceae* yang sangat banyak diteliti adalah *P.physodes*. Dari hasil penelitian ekstrak aqueos dari *P. physodes* tidak menunjukkan aktivitas antimikroba pada uji terhadap *Bacillus mycoides* dan *Candida albicans*, sedangkan ekstrak metanolnya menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak asetonnya (Ramkovic, 2007). Ekstrak aseton *P. physodes* juga menghambat total pertumbuhan jamur pathogen. *P. ultimum*, *U. maydis* dan *P. infestant* (Halama, 2004) Asam fisudat yang didapat dari *parmeliaceae* menghambat mutagenitas yang disebabkan oleh benzo(a) pirene dan amina heterosiklik pada *Salmonella typhimurium* TA 98 dan TA 100, asam fisudat juga terbukti dapat menghambat pembentukan metabolit reaktif seperti N-hidroksi-Trp-P-2, sedangkan asam fisudatnya juga dapat menghambat mutagenitas terhadap amina heterosiklik (Shibamoto, 2006).

Pada lingkungan tumbuh yang berbeda produksi senyawa kimia berubah jumlah dan jenisnya, menurut penelitian kadar asam fisudat dan atranorin mengalami penurunan jika terdapat akumulasi logam berat yang lebih tinggi pada lichen, serta meningkatnya rasio antara senyawa polar terhadap senyawa non polar yang terekstraksi. Penurunan produksi asam fisudat digunakan sebagai biomarker tingkat polusi pada suatu daerah (Bialonska, 2005).

Lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* merupakan lichen jenis foliosa, menempel pada batang pohon hidup yang tumbuh di dataran tinggi yang lembab atau batang pohon mati. Talus berbentuk datar seperti lembaran daun yang rata,

berwarna hijau-keabu-abuan. Nama lain dari spesies *Parmotrema tinctorum* adalah *Parmelia tinctorum* sedangkan *Hypotrachyna osseoalba* juga disebut dengan *Parmelia osseoalba* atau *Hypotrachyna formosana*, dan *Parmelia formosana* (Australian Gov., 2007).

Taksonomi *P. tinctorum*. adalah sebagai berikut :

Daerah : *Eukariota*
Kerajaan : Jamur
Keluarga besar : *Ascomycota*
Kelas : *Ascomycetes*
Bangsa : *Lecanorales*
Suku : *Parmeliaceae*
Marga : *Parmotrema*
Spesies : *Parmotrema tinctorum* (Despr. Ex.Nyl.) Hale (Zipcodezoo, 2008)

Taksonomi *H. osseoalba* adalah sebagai berikut :

Daerah : *Eukariota*
Kerajaan : Jamur
Keluarga besar : *Ascomycota*
Kelas : *Ascomycetes*
Bangsa : *Lecanorales*
Suku : *Parmeliaceae*
Marga : *Hypotrachyna*
Spesies : *Hypotrachyna osseoalba* (Vain)Y.S.Park & Hale (Zipcodezoo, 2008)

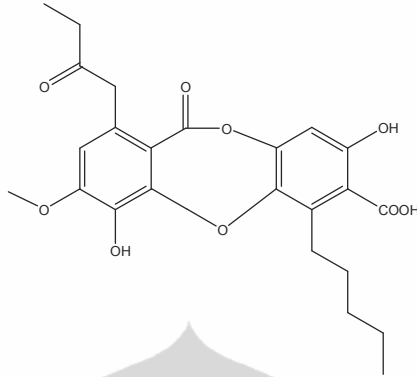


Gambar 2.8. Lichen *P. tinctorum* (Despr. Ex. Nyl) Hale.

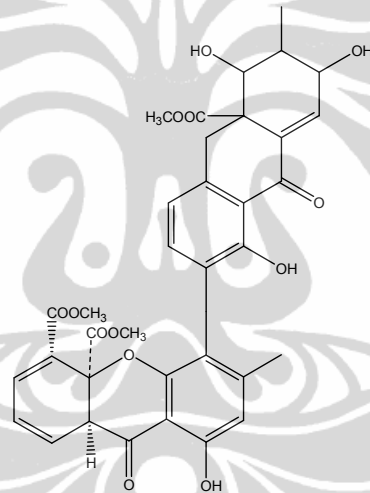


Gambar 2.9. Lichen *Hypotrachyna osseoalba* (Vain.) Y.S. Park & Hale.

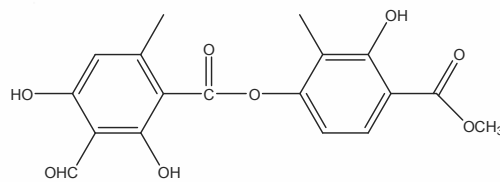
Dari penelitian sebelumnya metabolit sekunder yang telah didapatkan pada lichen *P. tinctorum* yaitu, asam lekanorat, atranorin dan kloroatranorin serta asam norstiktat (Zhihui, 1990). Sedangkan pada *H. osseoalba* yang dilaporkan sebagai *P. formosana* telah didapatkan asam lividat dan lichenxanton (1-hidroksi 3,6-dimetoksi-8-metilksanton) (Elix, 2002). *H. osseoalba* juga memiliki aktivitas antifungal terhadap *Colltrichum acutatum* (Wei, 2008)



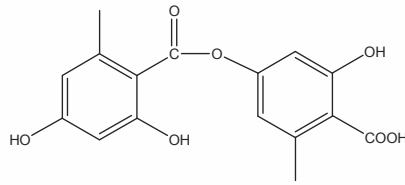
Gambar 2.10. Struktur senyawa asam lividat



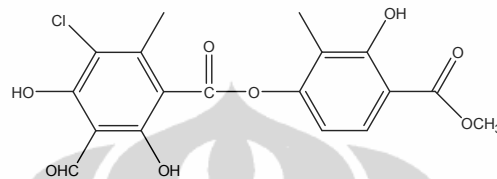
Gambar 2.11. Struktur senyawa lichenxanton (1-hidroksi-3,6 dimetoksi-8-metilksanton)



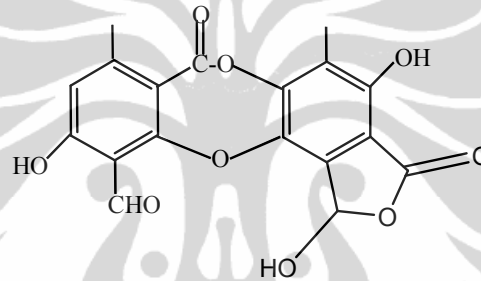
Gambar 2.12. Struktur senyawa atranorin



Gambar 2.13. Struktur senyawa asam lekanorat



Gambar 2.14. Struktur senyawa kloro atranorin



Gambar 2.15. Struktur senyawa asam norstiktat

2.6. Senyawa antikanker

Kanker adalah tumor yang membahayakan yaitu suatu penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan yang tidak terkendali pada jaringan yang telah mengalami perubahan menjadi tidak normal, dan terjadi penyebaran sel kanker dari titik asalnya ke bagian tubuh lain. Tumor terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel yaitu kesalahan urutan DNA. Fase pertumbuhan kanker adalah sebagai berikut:

1. Fase mitotik, pada fase ini tidak terjadi pembelahan sel aktif dari suatu mitosis. Pada fase ini ada dua 2 jalur alternatif yaitu menuju fase pasca mitotik untuk mulai memproses proliferasi, atau masuk ke fase istirahat, pada fase ini kemampuan untuk proliferasi terhenti dan sel meninggalkan siklus

2. Fase pasca mitotik pada fase ini tidak terjadi sintesis DNA tetapi terjadi sintesis RNA dan protein yang pada akhir fase terjadi sintesis RNA yang optimum,
3. Fase sintetik, pada fase ini terjadi replikasi sel DNA,
4. Fase pasca sintetik, fase ini dimulai jika sel telah menjadi tetraploid dan mengandung 2 DNA kemudian sintesis DNA dan protein dilanjutkan, setelah itu kembali lagi ke fase mitotik dan seterusnya

Antikanker adalah senyawa kemoterapi yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan, karena pertumbuhan sel yang kanker yang cepat dan tidak normal, maka terapi kanker secara kimia ditujukan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Mekanisme kerja antikanker dapat dibedakan menjadi :

1. Antikanker yang bekerja dengan cara mempengaruhi DNA atau biosintesis protein
2. Antikanker sebagai penghambat polimerisasi dan depolimerisasi pada mikrotubula
3. Antikanker sebagai penghambat enzim
4. Antikanker sebagai pengikat khas dan pengubah reseptor.
5. Antikanker produk alami, mekanisme kerjanya yaitu dengan mengikat tubuli dan menghambat pembentukan mikrotubuli pada siklus mitosis, sehingga proses metafase terhenti (Siswandono, 1995).

Bioaktivitas sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker telah ditemukan pada senyawa kelompok depsida. Panarin, asam efforelat menginduksi nekrosis pada sel kanker prostat DU-145 (Russo, 2006). Asam fisudat yang didapat dari *Parmeliaceae* menghambat mutagenitas yang disebabkan oleh benzo(a)pirene dan amina heterosiklik pada *Salmonella typhimurium* TA 98 dan TA 100, asam fisudat juga terbukti dapat menghambat pembentukan metabolit reaktif seperti N-hidroksi-Trp-P-2, sedangkan asam fisudatnya juga dapat menghambat mutagenitas terhadap amina heterosiklik (Shibamoto, 2006).

2.7. Senyawa antioksidan dan radikal bebas

2.7.1. Senyawa antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektrolit yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Bertambahnya radikal bebas dari luar yang masuk ke dalam tubuh akan mempersulit tubuh untuk mengatasi serangan radikal bebas. Antioksidan yang terbentuk dari luar sel tubuh salah satunya dari makanan.

2.7.1.1. Antioksidan sintetik

Beberapa dari antioksidan yang banyak digunakan adalah senyawa fenolik seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), tersier *butylhydroquinone* (TBHQ), dan ester dari asam galat.

2.7.1.2. Antioksidan alami

Antioksidan alami ditemukan pada sebagian besar tanaman, mikroorganisme, jamur dan jaringan binatang. Sebagian besar antioksidan alami adalah senyawa fenolik dan kelompok yang paling penting dari antioksidan alami adalah tokoferol, flavonoid, dan asam fenolat. Menurut penelitian Kosanic, ekstrak lichen memiliki potensi antioksidan yang tinggi, kandungan fenolik pada senyawa yang terdapat dalam ekstrak lichen berkorelasi dengan aktivitas antioksidan yang dimiliki (Kosanic, 2011).

Antioksidan dapat menghambat atau menurunkan oksidasi dengan dua cara, yaitu dengan menangkap radikal bebas, disebut antioksidan primer dan tidak melibatkan penangkapan radikal bebas secara langsung, disebut antioksidan sekunder. Antioksidan sekunder mempunyai mekanisme yang bervariasi seperti pengikatan ion logam, menangkap oksigen, mengubah hidrogenperoksida menjadi spesies non radikal, mengabsorpsi radiasi UV atau deaktivasi oksigen singlet. Biasanya antioksidan sekunder hanya menunjukkan aktivitas antioksidan ketika komponen minor muncul (Pokorny *et al.*, 2001).

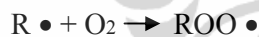
2.7.2. Radikal bebas

Radikal bebas merupakan atom atau gugus atom apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif (Fessenden, 1982). Radikal bebas secara terus menerus terbentuk didalam tubuh. Radikal bebas jika jumlahnya dalam tubuh sangat banyak dapat berpotensi menonaktifkan berbagai enzim, mengakibatkan oksidasi lemak dan mengganggu DNA tubuh sehingga terjadi mutasi sel yang merupakan awal timbulnya kanker . Radikal bebas dapat diperoleh dari pengaruh lingkungan, paparan sinar UV, asap kendaraan dan sebagainya, maupun dari dalam tubuh sendiri. Berbagai proses metabolisme normal dalam tubuh dapat menghasilkan radikal bebas dalam jumlah kecil sebagai produk antara.

Skema mekanisme reaksi pembentukan radikal bebas adalah deret reaksi bertahap yaitu tahap inisiasi, propagasi dan terminasi. Pada tahap inisiasi, radikal lipid terbentuk dari molekul lipid dan terjadi pengurangan atom hidrogen oleh radikal reaktif misalnya radikal hidrogen.



Selanjutnya tahap propagasi, radikal lipid diubah menjadi radikal lipid yang berbeda dan mengakibatkan pengurangan atom hidrogen dari molekul lipid atau penambahan atom oksigen pada radikal alkil.



Pada tahap terminasi, radikal bebas bergabung untuk membentuk molekul dengan membentuk pasangan antar radikal.



Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, gugus tiol, non protein, lipid, karbohidrat, nukleotida. Terhadap protein, radikal bebas dapat menyebabkan fragmentasi dan *cross-linking*, sehingga mempercepat terjadinya proteolisis, pada enzim radikal bebas akan berikatan pada gugus tiol enzim sehingga menyebabkan perubahan aktivitas enzim tersebut. Terhadap lipid, radikal

bebas akan menyebabkan reaksi peroksidasi yang akan mencetuskan proses otokatalitik yang akan menjalar sampai jauh dari tempat asal reaksi semula. Terhadap nukleotida, radikal bebas akan menyebabkan perubahan struktur (DNA atau RNA) yang menyebabkan terjadinya mutasi atau sitotoksisitas.

Dalam keadaan normal tubuh kita mempunyai mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas. Kerusakan sel terhadap radikal bebas baru dapat terjadi apabila kemampuan mekanisme pertahanan tubuh menurun. Karena secara kimia, molekulnya tidak berpasangan, radikal bebas cenderung untuk bereaksi dengan molekul sel tubuh. Kemudian menimbulkan senyawa tidak normal (radikal bebas baru yang lebih reaktif) dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting. Beberapa komponen tubuh yang rentan terhadap serangan radikal bebas antara lain; kerusakan DNA, membran sel, protein, lipid peroksida, proses penuaan dan autoimun manusia. Dalam bidang medis, diketahui bahwa radikal bebas merupakan penyebab berbagai keadaan patologis seperti penyakit liver, jantung koroner, kanker, diabetes, katarak, penyakit hati, dan penuaan dini (Gitawati, 1995).

2.8. Reaksi warna

Reaksi warna adalah suatu uji yang dapat memberikan indikasi adanya kelompok senyawa tertentu pada lichen. Terdapat empat macam uji warna pada lichen yang rutin dilakukan. Uji C,K dan KC yang dikemukakan oleh Nylander dan uji PD (P) yang diperkenalkan oleh Asahina (Hale, 1973) Tes warna dilakukan terhadap ekstrak aseton dari serbuk lichen yang diletakkan di atas kertas saring, kemudian terhadapnya diteteskan aseton kemudian diuapkan, penetesan dan penguapan aseton dilakukan berulang-ulang, sampai diperkirakan ekstrak aseton dari lichen telah meresap pada kertas saring. Serbuk yang telah diekstraksi kemudian diambil, dan uji warna dapat dilakukan terhadap noda ekstrak pada kertas saring.

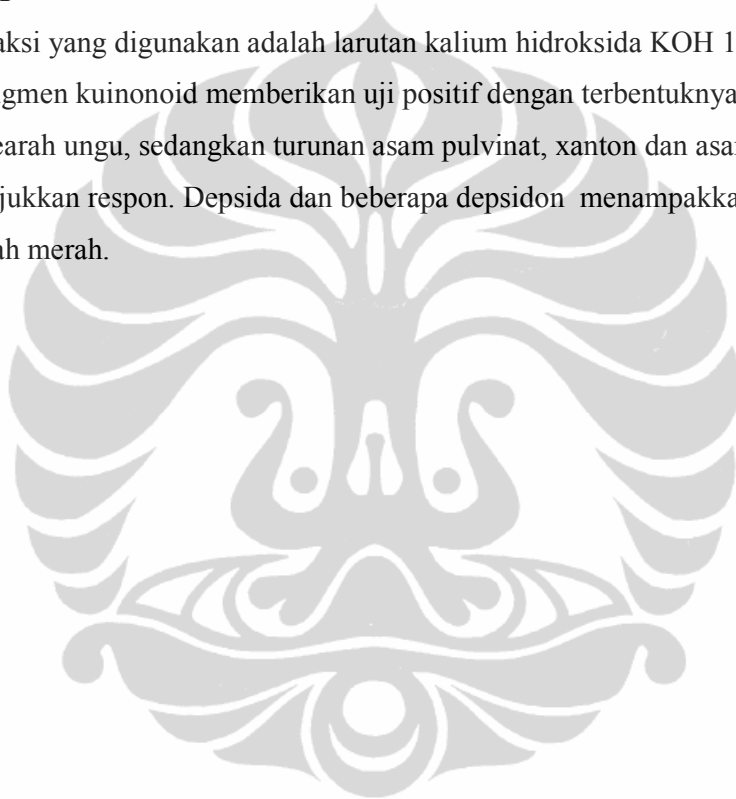
2.8.1. Uji C

Pereaksi yang digunakan adalah larutan Kalsium hipoklorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) atau Natrium hipoklorit (NaOCl) dalam air. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah muda ke arah merah, yang terjadi jika terdapat

senyawa aromatik yang tersubstitusi dua gugus hidroksil bebas pada posisi meta. Jika posisi gugus hidroksil yang tersubstitusi digantikan oleh rantai samping uji ini akan gagal. Uji positif yang lemah dengan terbentuknya warna hijau yang terjadi jika terdapat satu substitusi gugus hidroksil bebas sulit diamati. Adanya asam hipotamnolat memberikan uji positif dengan terbentuknya warna merah yang menghilang dalam beberapa detik

2.8.2. Uji K

Pereaksi yang digunakan adalah larutan kalium hidroksida KOH 10-25% dalam air. Pigmen kuinonoid memberikan uji positif dengan terbentuknya warna merah tua kearah ungu, sedangkan turunan asam pulvinat, xanton dan asam usnat tidak menunjukkan respon. Depsida dan beberapa depsidon menampakkan warna kuning kearah merah.



2.8.3. Uji PD

Pereaksi yang digunakan adalah larutan p-fenilendiamin 1-5 % dalam etanol, uji PD dilakukan sebelum uji C. Aldehid aromatik memberikan warna kuning ke arah merah. Orsinol depsidon dan orsinol depsida juga memberikan uji positif.

2.8.4. Uji KC

Adalah uji warna dengan menggunakan pereaksi K dan segera dilanjutkan dengan pereaksi C.

2.8.5. Uji Dimroth

Pereaksi Dimroth dibuat dengan cara mencampurkan 10 gram asam borat ke dalam 100 ml asam asetat panas (100°C), kemudian didinginkan. Kromon dan xanton memberikan uji yang positif.

Dengan menggunakan pereaksi tersebut diatas dapat dilakukan uji warna untuk memperkirakan kelompok senyawa yang terdapat dalam lichen. Prediksi uji warna untuk kelompok senyawa adalah sebagai berikut:

Tabel. 2.3. Pengamatan hasil uji warna C, K, KC dan PD [Hale, 1973]

Pengamatan	Kelompok senyawa yang terdapat
K+ merah keunguan	Antrakuinon, bis antrakuinon, terfenil kuinon, naftokuinon dan piksiferin
K+,Dimroth+,KC-	Xanton, sordidon
PD+,K+	Depsida: asam alektoriat, asam bakomisesat, asam barbatolat, asam dekarboksitamnat, asam haematamnat, asam tamnat, nefroarktin, atranorin, kloroatranorin Depsidon : asam konstiktat, asam fumarprotosetrarat, asam norstiktat, asam fisudalat, asam salasanat, sam stiktat, asam virensat
PD+,K-	Panarin, asam psoromat, asam fumarprotosetrarat, asam virensat
PD-,K+,C+	Asam kriptoklorofaeat, asam hiasat, asam hipotamnat,(K+ ungu), asam meroklorofaeat, asam paludosat, asam ramalinolat
PD-,K-,C+merah	Asam aziaat, asam 4-O-dimetilbarbatat, eritrin, etl orselinat, asam giroforat, asam lekanorat, metil- β -orselinat, asam olivetorat, montagnetol, sifulin
PD-,K-,C+ kehijauan	Asam didimat, asam panarat, asam porfirilat, strepsilin
PD-,K-,C+ kebiruan	Asam diplosistesat
PD-,K-,C-,KC+	Asam alektonat, asam glomeliferat, asam loberat, asam 4-0-metilfisudat, asam mikrofilinat, norlobaridon, asam fisudat, asam pikrolinat

2.8.6. Uji Pengenalan Senyawa Fenolik

Untuk mengenali terdapatnya gugus fenolik pada sampel bahan alam dapat dilakukan uji pengenalan. Senyawa fenolik akan memberikan warna ungu apabila bereaksi dengan FeCl_3 1%. (Subur, 2008)

2.9. Uji Bioaktivitas (*Bioassay*)

Bioassay (Biological assay) diartikan sebagai suatu metode yang digunakan untuk menentukan potensi atau aktivitas suatu materi atau senyawa terhadap organisme hidup. *Bioassay* mempunyai 3 komponen yaitu stimulus

(perangsang), subyek dan respon. Stimulus adalah suatu perlakuan yang diberikan pada subyek hidup, misalnya mikroorganisme, tumbuhan, hewan, jaringan tumbuhan atau jaringan hewan. Besarnya stimulus dinyatakan sebagai dosis. Respon subyek terhadap dosis yang diberikan dapat diamati dari perubahan atau kelangsungan hidup dari subyek tersebut.

2.9.1. Uji Toksisitas metode 'Brine Shrimp Lethality Test' dengan *Artemia salina*

Pada dosis tinggi, senyawa bioaktif hampir selalu bersifat racun, maka angka kematian organisme sederhana pada paparan zat bioaktif dengan dosis tinggi, dapat digunakan sebagai metode uji cepat untuk mengetahui bioaktivitas suatu zat. Larva udang (*Artemia salina*), merupakan organisme yang sering digunakan sebagai hewan uji pada uji toksisitas *BSLT*, telur udang dapat disimpan dalam jangka waktu lama dan mudah ditetaskan dengan pemeraman dalam air garam selama 48 jam sehingga menjadi larva. Uji dilakukan dengan membandingkan jumlah larva udang yang dapat bertahan hidup pada lingkungan yang diinduksi dengan sampel suatu zat yang akan diuji, dengan jumlah larva udang yang dapat hidup pada lingkungan blanko yang tidak mengandung sampel zat yang diuji. Suatu ekstrak dinyatakan aktif bila memiliki $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (Dey, 1991)

2.9.2. Uji Sitotoksisitas dengan metode *MTT assay*

Aktivitas sitotoksik merupakan kemampuan suatu zat untuk meracuni atau merusak sel hidup, yang menjadi salah satu prinsip pengobatan kanker. Salah satu metode uji sitotoksisitas adalah metode *MTT assay*. Prinsip dari metode *MTT assay* adalah membandingkan densitas optik dengan pewarnaan 3-(4,5-dimeiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium bromida (*MTT*) antara plat kultur sel kanker yang ditumbuhkan dibawah pengaruh zat antikanker yang tengah diuji dengan plat kultur sel yang ditumbuhkan tanpa pengaruh zat antikanker. Kuatnya aktivitas antikanker suatu senyawa dalam uji sitotoksisitas dinyatakan sebagai berikut :

1. $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ = sangat aktif
2. $IC_{50} 5 -10 \mu\text{g/mL}$ = aktif
3. $IC_{50} 11-30 \mu\text{g/mL}$ = sedang

4. $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ = tidak aktif (Anwar, 2009)



2.9.3. Uji aktivitas senyawa sebagai antioksidan

Metode yang paling sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan tanaman obat adalah metode uji dengan menggunakan radikal bebas DPPH. Tujuan metode ini adalah mengetahui parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% efek aktivitas antioksidan (IC_{50}). Hal ini dapat dicapai dengan cara menginterpretasikan data eksperimental dari metode tersebut. DPPH merupakan radikal bebas yang dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, dapat berguna untuk pengujian aktivitas antioksidan komponen tertentu dalam suatu ekstrak.

Karena adanya elektron yang tidak berpasangan, DPPH memberikan serapan kuat pada 517 nm. Ketika elektronnya menjadi berpasangan oleh keberadaan penangkap radikal bebas, maka absorbansinya menurun sesuai jumlah elektron yang diambil. Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning (Dehpour, 2009). Perubahan absorbansi akibat reaksi ini telah digunakan secara luas untuk menguji kemampuan beberapa molekul sebagai penangkap radikal bebas. Tingkat kekuatan antioksidan untuk senyawa murni adalah sebagai berikut:

Tabel 2.4. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH

Intensitas	Nilai IC_{50}
Sangat kuat	< 50 $\mu\text{g/mL}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/mL}$
Sedang	101-150 $\mu\text{g/mL}$
Lemah	> 150 $\mu\text{g/mL}$

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Metode Penelitian

Pada penelitian ini, percobaan dilakukan diawali dengan pemilihan jenis tanaman. Pada penelitian ini dipilih tanaman lichen dari spesies, *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*. Talus lichen yang diambil sebagai sampel tumbuh pada kulit batang tanaman coklat pada PTP XII Glenmore, Banyuwangi. Talus lichen yang diperoleh dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dihaluskan menjadi serbuk. Senyawa yang terdapat dalam serbuk talus lichen kemudian diekstraksi secara berturut-turut dalam pelarut n-heksana, diklorometana, etil asetat dan aseton. Ekstrak yang diperoleh kemudian dikeringkan. Uji warna dilakukan untuk memperoleh gambaran terdapatnya kelompok senyawa tertentu pada setiap ekstrak. Pada setiap jenis ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan secara kromatografi dengan metode kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika dan eluen yang sesuai secara berulang-ulang, sehingga diperoleh fraksi-fraksi hasil pemisahan yang selanjutnya dipisahkan dan dimurnikan dengan metode kromatografi radial dan kromatografi preparatif untuk mendapatkan senyawa murni. Isolat yang berhasil dipisahkan ditentukan strukturnya berdasarkan analisis terhadap data spektroskopis dari senyawa hasil isolasi. Uji aktivitas dilakukan untuk menentukan aktivitas ekstrak dan senyawa hasil isolasi. Uji aktivitas yang dilakukan ialah uji *BSLT* ekstrak kasar, serta uji aktivitas sitotoksik terhadap sel *Murine leukemia* P-388 dan aktivitas sebagai antioksidan senyawa murni dengan metode *DPPH*.

3.2. Bahan Tanaman

Tanaman yang digunakan untuk bahan penelitian yaitu lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* dikumpulkan dari lichen yang tumbuh pada kulit batang tanaman coklat pada PTP XII, Glenmore, Banyuwangi.

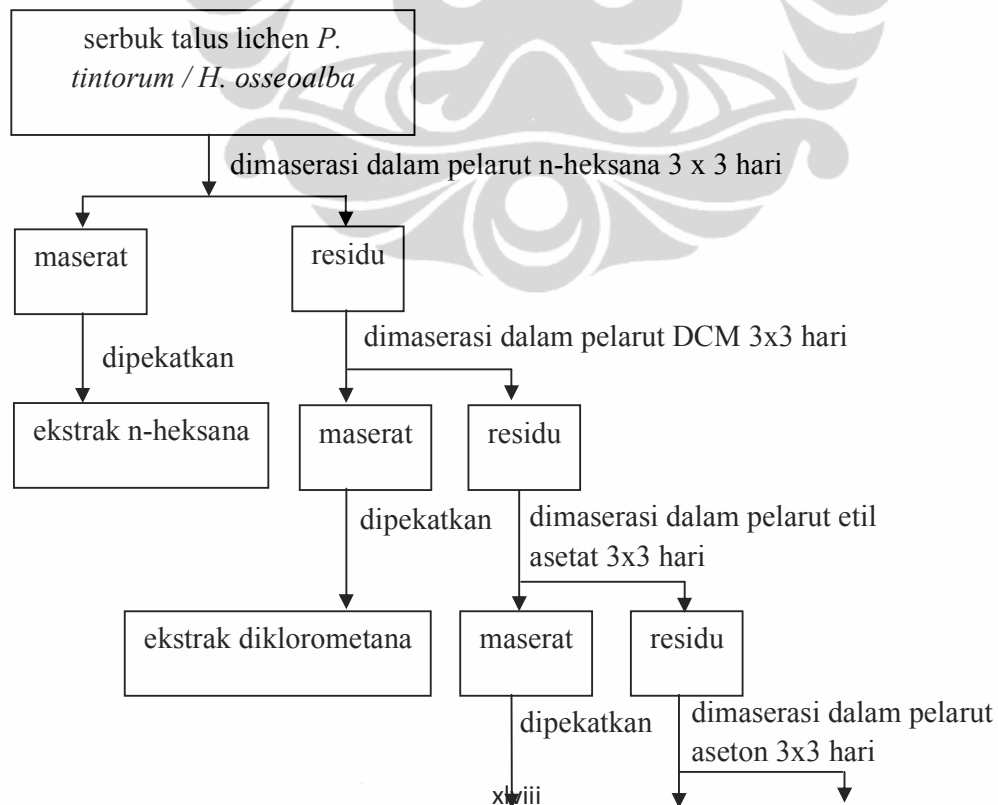
3.3. Alat dan Bahan Kimia

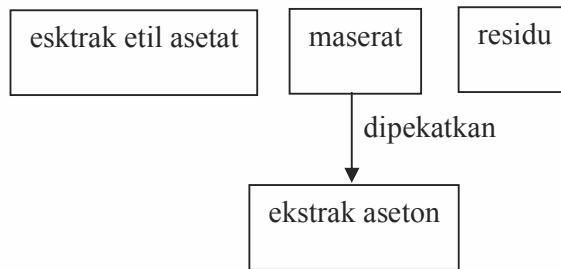
Pemisahan ekstrak dilakukan dengan metode kromatografi kolom, menggunakan kolom kromatografi, dengan fasa diam silika gel Merck 60 G, dengan pelarut pengembang/eluen n-heksana, diklorometana, etil asetat dan aseton teknis yang didestilasi. Pelarut aseton, n-heksana, etil asetat, diklorometana, kloroform, p.a digunakan untuk rekristalisasi dan pencucian kristal. Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan metode kromatografi radial menggunakan seperangkat kromatotron dan pelat yang dilapisi silika gel Merck 60GF, KLT preparatif dilakukan dengan pelat KLT Merck Silika gel 60 F₂₅₄. Sebagai penampak noda digunakan lampu UV dengan panjang gelombang $\lambda = 254$ nm dan 366 nm. Penentuan struktur molekul ditentukan dengan mengkorelasikan data spektroskopi (UV, IR, MS, NMR dan NMR -2D), serta membandingkannya dengan pustaka. Spektrum UV ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV Shimadzu 160A. Spektrum IR diukur dengan spektrofotometer FTIR Perkin Elmer 1600 Jeol FNM-FX 400 , sedangkan spektrum NMR diukur dengan spektrometer NMR Jeol USA JNM ECA-500, ¹H NMR 500 MHz, ¹³C NMR 125 MHz. Berat molekul senyawa diukur dengan LC/MS Mariner. Dalam uji aktivitas biologis ekstrak terhadap *A. salina* dan uji aktivitas anti kanker senyawa murni terhadap sel kanker P-388, digunakan dimetil sulfoksida (DMSO), medium RPM/1640, dapar fosfat, reagen *MTT assay*, dan sel kanker P-388. Aktivitas antioksidan diukur secara spektrofotometri dengan *DPPH*. Uji warna dilakukan dengan pereaksi larutan FeCl₃ 1% dalam etanol, KOH 5%, dan NaOCl.

3.4. Prosedur Penelitian

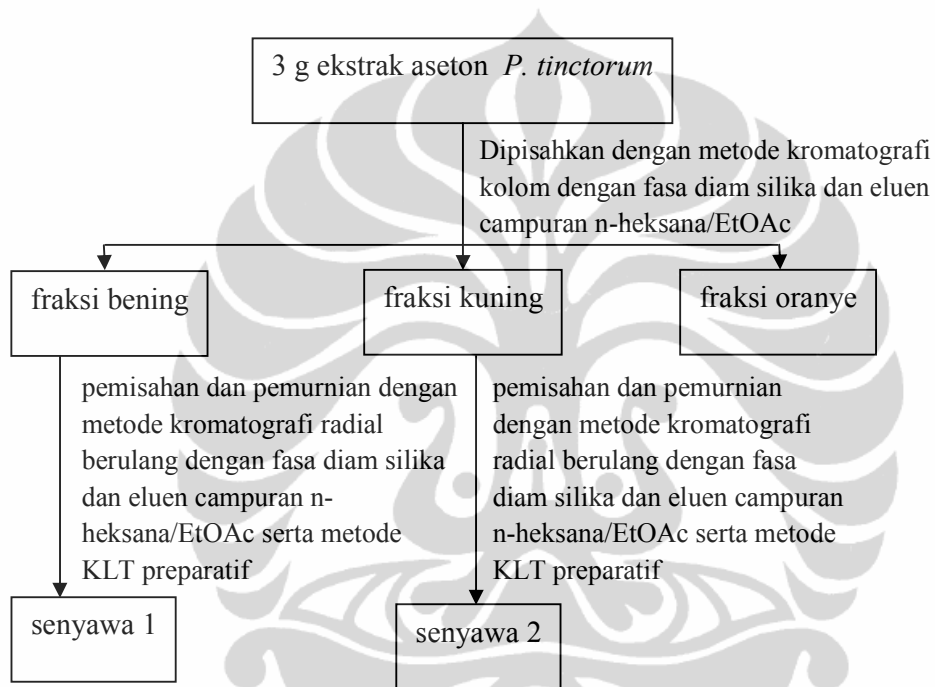
3.4.1. Ekstraksi Serbuk Talus Lichen

Sebanyak 400 g serbuk talus lichen *P. tinctorum* dan 400 g serbuk talus lichen *H. osseoalba* dimaserasi dalam n-heksana selama 3 x 3 hari, dan setiap hari diaduk, dilakukan pengambilan ekstrak dan penggantian pelarut setiap 3 hari. Setelah dimaserasi dengan n-heksana selama 3 x 3 hari, talus dikeringkan selama 2 hari, kemudian diekstrak kembali dengan metode yang sama dengan menggunakan pelarut diklorometana, etil asetat dan aseton, secara berturut-turut. Maserat hasil pemisahan kemudian dikeringkan sehingga diperoleh ekstrak kasar n-heksana, diklorometana, etil asetat dan aseton. Ekstrak kering diklorometana dan aseton selanjutnya dipisahkan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom, dengan menggunakan fasa diam silika dan eluen campuran n-heksana-etil asetat, secara gradien pelarut. Fraksi-fraksi yang memiliki R_f sama dikumpulkan dan selanjutnya dilakukan pemisahan pemurnian lebih lanjut dengan metode kromatografi radial dan kromatografi lapis tipis preparatif, secara berulang-ulang, sehingga diperoleh senyawa murni, (1), (2), (3), yang dapat diisolasi dari ekstrak lichen *P. tinctorum* dan senyawa (4), (5), yang dapat diisolasi dari ekstrak lichen *H. osseoalba*.

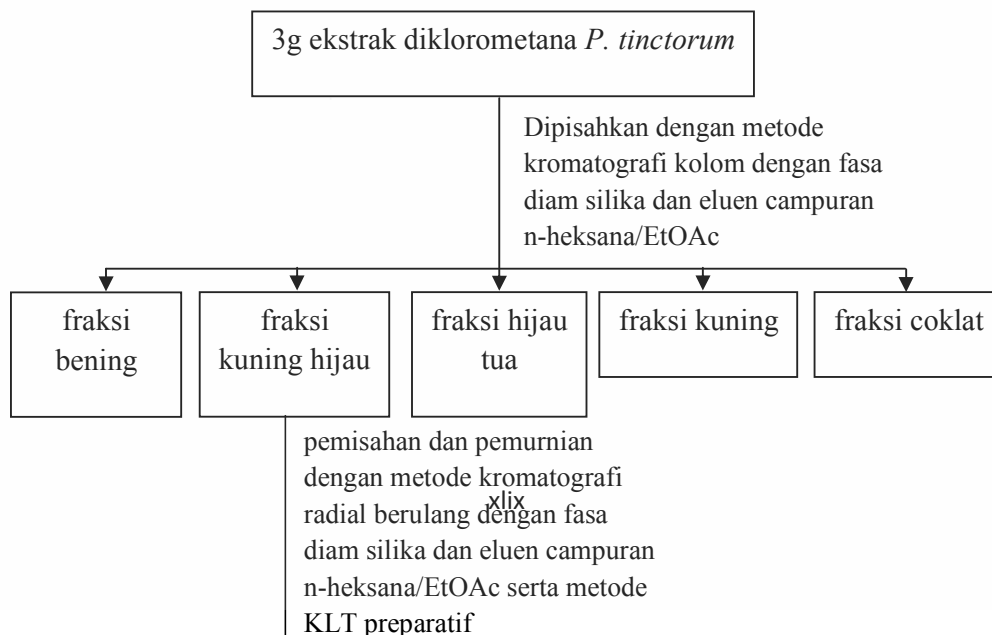




Gambar 3.1. Bagan kerja pembuatan ekstrak lichen *P. tinctorum*/ *H. osseoalba*

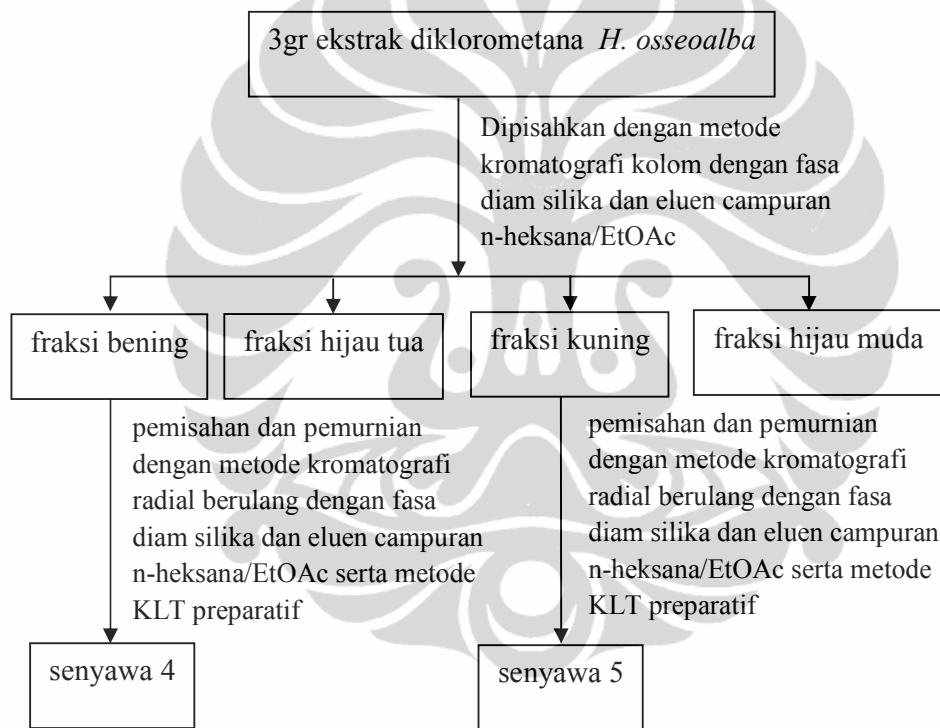


Gambar 3.2. Bagan kerja isolasi senyawa pada ekstrak aseton *P. tinctorum*



senyawa 3

Gambar 3.3. Bagan kerja isolasi senyawa pada ekstrak diklorometana *P. tinctorum*



Gambar 3.4. Bagan kerja isolasi senyawa pada ekstrak diklorometana *H. osseoalba*

3.4.2. Reaksi warna khusus untuk identifikasi umum senyawa kimia pada talus lichen

Reaksi warna ini dilakukan pada ekstrak dan talus lichen yang ditetesi pelarut, umumnya aseton, karena sebagian besar senyawa aktif lichen yang telah ditemukan sebelumnya berada pada fraksi aseton. Beberapa tetes ekstrak serta

serbuk talus lichen ditempatkan diatas kertas saring, kemudian diteteskan beberapa tetes pelarut aseton dan selanjutnya dibiarkan menguap, setelah jumlah senyawa yang diperkirakan tertinggal diatas kertas saring cukup memadai, serbuk talus lichen disingkirkan. Reagen uji warna diteteskan diatas noda ekstrak kemudian diamati hasilnya. Reagen yang digunakan adalah KOH 5% (uji K), NaOCl (uji C), reagen K,C (uji KC), 1% FeCl₃ dalam etanol.

3.4.3. Identifikasi struktur senyawa

Setiap senyawa murni yang diperoleh dari pemisahan kromatografi kolom diidentifikasi dan ditentukan strukturnya dengan melakukan analisis terhadap spektrum UV-VIS, FTIR, GC-MS/LC-MS dan NMR, serta dengan mempelajari sifat fisiko kimianya

3.4.4. Uji Toksisitas Ekstrak Terhadap Larva *Artemia salina* Leach (BSLT)

3.4.4.1. Penetasan Telur Larva *Artemia salina* Leach

Telur *A. salina* Leach ditetaskan dalam corong pisah berisi air sebanyak 1000 mL. Penetasan dilakukan dengan bantuan pencahayaan lampu 10 watt dan aerator agar medium pemeliharaan larva kaya akan oksigen sehingga telur menetas sempurna menjadi larva dalam waktu 24 jam, selanjutnya dipisahkan antara larva yang hidup dengan yang mati, larva hidup dibiarkan dalam corong pisah dalam 24 jam sehingga larva *A. salina* Leach yang dipakai untuk percobaan adalah yang berumur 48 jam (instar II).

3.4.4.2. Persiapan Larutan Induk Ekstrak (10.000 ppm)

Ekstrak ditimbang sebanyak 250,0 mg , kemudian dilarutkan dalam 25 ml etanol 95 % dengan bantuan alat *Ultrasonic Bath* sampai terlarut sempurna dan tidak mengendap.

3.4.4.3. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak

Larutan seri ekstrak dibuat dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5 ppm. Setiap konsentrasi dengan ulangan sebanyak 3x (triplo).

3.4.4.4. Pelaksanaan Uji Toksisitas Ekstrak Terhadap *A. salina* Leach dengan konsentrasi Ekstrak Bahan Uji 1000, 500, 250, 125, 62,5 ppm

Semua larutan seri yang telah dibuat didiamkan selama 24 jam, kemudian didalam setiap vial yang berisi larutan uji ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 1 % dan sedikit air garam pH 8-8,5, lalu didispersikan dengan bantuan *Ultrasonic Bath*. Setelah itu kedalam setiap larutan uji dimasukkan larva sebanyak 20 ekor dan ditambahkan air garam pH 8-8,5 sampai 10 mL. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dan yang hidup diamati dengan metode visual menggunakan pipet tetes serta dengan bantuan penerangan lampu. Nilai LC₅₀ dihitung dari persamaan regresi kurva linear

$$Y = aX+b$$

Dimana kurva regresi merupakan plot dari log konsentrasi (ppm) (sumbu x) vs mortalitas (sumbu y) . Nilai IC₅₀ diperoleh dari perhitungan pada nilai Y=50

3.4.4.5. Uji Toksisitas Larutan Blanko (pelarut DMSO 1 % dan etanol 95 %) Dilakukan dengan cara yang sama seperti pada larutan sampel.

3.4.5. Uji Sitoksisitas Senyawa Hasil Isolasi Terhadap Sel *Murine Leukimia P-388*

Aktivitas sitotoksik senyawa terhadap sel *M. leukemia P-388* ditentukan dengan metode *MTT assay*, dengan prosedur sebagai berikut:

3.4.5.1. Pembuatan stok sel

Sel dalam medium RPMI 1640 (dengan konsentrasi > 10⁶ sel/mL) disentrifugasi dengan kecepatan 1200-1300 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar. Supernatan dipisahkan dan endapan (*pellet sel*) ditambahkan 1 ml *FBS* (*Fetal Bovine Serum*) dan 100 µL DMSO selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung 2 mL dan ditutup dengan paraffin. Disimpan dalam freezer (-80°C) semalam, kemudian di pindahkan ke dalam tabung *Dewar* pada -80°C.

3.4.5.2. Melarutkan sel

Stok sel di atas dikondisikan pada suhu 37°C. Ke dalam tabung sentrifuse steril 15 mL dimasukkan 10 mL medium RPMI 1640 dan larutan sel, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200-1300 rpm selama 5 menit pada temperatur

kamar, supernatan dikeluarkan dengan pipet Pasteur steril. Selanjutnya, ke dalam labu kultur dimasukkan 9 ml medium dan pelet sel yang telah diencerkan dengan sedikit medium yang sama dan disimpan dalam inkubator CO₂. Pertumbuhan sel diamati dengan mikroskop setelah semalam, sel yang pertumbuhannya baik dapat digunakan untuk uji atau subkultur lebih lanjut.

3.4.5.3. Subkultur

Ke dalam labu kultur 25 mL dimasukkan 9 mL medium *RPMI* 1640. Sel yang telah diseleksi dari inkubator CO₂, kemudian dimasukkan ke dalam tiga labu kultur, pada masing-masing labu diisi dengan 1, (labu pertama) 2 (labu kedua) dan 4 tetes (labu ketiga) larutan sel menggunakan pipet bengkok steril, kemudian disimpan dalam inkubator CO₂.

3.4.5.4. Protokol uji

1. Hari ke-0. Inokulasi sel

Dalam sel dengan pertumbuhan pada fase logaritma, larutan sel dibuat sekitar 3×10^3 sel/mL, kemudian diinokulasikan dalam plat mikro 96 lubang dasar rata, dan kultivasi dilakukan dalam inkubator CO₂.

2. Hari ke-1. Penambahan sampel

Sampel dilarutkan dalam DMSO. Pengenceran sampel dilakukan menggunakan larutan buffer fosfat. Sampel dengan konsentrasi yang dikehendaki (20 mg/mL) ditambahkan ke dalam sel dalam plat mikro, kemudian dikocok dengan *mixer plate micro* dan disimpan kembali dalam inkubator CO₂ selama 48 jam.

3. Hari ke-3. Penambahan reagen MTT dan *stop solution*

Penambahan reagen MTT dilakukan setelah 48 jam dari penambahan sampel, kemudian dikocok dengan *mixer plate micro* selama ± 2 menit, disimpan kembali dalam incubator CO₂. Empat jam kemudian ditambahkan *stop solution* dan dikocok dengan baik sehingga tidak menimbulkan banyak busa yang dapat mengganggu dalam penglihatan atau pengamatan di bawah mikroskop, selanjutnya disimpan kembali dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

4. Hari ke-4. Pengukuran *optical density* (OD)

Pengukuran *optical density* dilakukan dengan reader *plate micro* selama 24 jam setelah penambahan stop solution. Dari OD larutan uji maka OD larutan blanko dapat ditetapkan. Kemudian data ini dimasukkan dalam program Cricket untuk menghitung nilai IC_{50} .

3.4.5.5. Derajat sitotoksitas sampel terhadap sel *M. leukemia P-388*

Bahan uji disebut sangat aktif menghambat pertumbuhan sel *M. leukemia P-388* jika mempunyai nilai $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$, aktif jika nilai IC_{50} 5-10 $\mu\text{g/mL}$, sedang IC_{50} 11-30 $\mu\text{g/mL}$ dan tidak aktif jika $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ (Anwar, Lenny, 2009).

3.4.6. Uji aktivitas senyawa hasil isolasi sebagai antioksidan

3.4.6.1. Sampel dan bahan

Senyawa hasil isolasi digunakan sebagai sampel, metanol p.a (Merck), DPPH.

3.4.6.2. Metode Preparasi larutan sampel

Larutan induk dipersiapkan dengan cara melarutkan sejumlah sampel dalam 20 mL metanol sehingga dihasilkan larutan sampel dalam metanol dengan konsentrasi 227,5 ppm kemudian dari larutan sampel induk ini diencerkan sedemikian hingga dengan metanol sehingga dihasilkan satu seri larutan dengan konsentrasi 45,5; 91; 136,5; 182; 227,5 ppm

3.4.6.3. Pembuatan larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 2 mg dan dilarutkan dalam 50,76 mL metanol, sehingga dihasilkan larutan DPPH pada konsentrasi 0,1 mmol/L.

3.4.6.4. Pengukuran serapan pada spektrofotometer ($\lambda = 515 \text{ nm}$)

1. Pengukuran absorbansi metanol, absorbansi metanol diukur sebelum pengukuran absorbansi DPPH dan larutan sampel, serapan metanol menjadi faktor pengurang pada serapan DPPH dan larutan sampel yang terukur
2. Pengukuran absorbansi larutan DPPH, larutan DPPH sebanyak 2 mL ditempatkan dalam kuvet kemudian ditambah dengan 2 mL metanol kemudian diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25.

3. Pengukuran absorbansi sampel, sebanyak 2 mL larutan sampel ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 2 mL larutan DPPH, campuran ini kemudian dipindahkan ke kuvet dan diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25. Nilai serapan setelah dikurangi dengan serapan metanol dari larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan ekstrak tersebut dihitung sebagai persen inhibisi (% inhibisi) dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}) / A_{\text{kontrol}}) \times 100\%$$

Keterangan:

$A_{\text{kontrol}} = \text{Absorbansi}_{\text{tidak mengandung sampel}} - A_{\text{metanol}}$

$A_{\text{sampel}} = \text{Absorbansi}_{\text{sampel-Ametanol}}$

Nilai IC_{50} dihitung dari persamaan regresi kurva linear plot dari konsentrasi (ppm) (sumbu x) vs % inhibisi (sumbu y). Nilai IC_{50} diperoleh dari perhitungan pada nilai $Y=50$ dengan menggunakan rumus regresi linear sebagai berikut :

$$Y = aX + b \text{ pada } Y=50$$

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Gambaran Umum

Dari hasil ekstraksi 400 gram serbuk talus *P. tinctorum* diperoleh ekstrak n-heksana sebanyak 12,8 gram, ekstrak diklorometana 18,4 gram, etil asetat 37,8 gram dan ekstrak aseton sebanyak 67,4 gram. Sedangkan dari hasil ekstraksi 400 gram serbuk talus *H. osseoalba* diperoleh ekstrak n-heksana sebanyak 12,6 gram, ekstrak diklorometana 22,3 gram, etil asetat 42,5 gram dan ekstrak aseton sebanyak 80,4 gram. Berdasarkan hasil uji warna, pada ekstrak heksana talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* terdapat senyawa fenolik. Pada ekstrak etil asetat dan aseton lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*, terdapat senyawa fenolik dan senyawa aromatik yang tersubstitusi dua gugus OH pada posisi meta. Pada keseluruhan ekstrak talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* kemungkinan terdapat atranorin, asam hipothamnolat dan turunan beta-orsinol depsidon dalam konsentrasi yang sangat rendah. Pada ekstrak talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* tidak terdapat turunan kuinon atau konsentrasinya terlalu rendah. Dari talus lichen *P. tinctorum* dapat diisolasi senyawa (1), (2), (3), sedangkan dari talus lichen *H. osseoalba* dapat diisolasi senyawa (4), (5). Senyawa (3) memiliki struktur senyawa yang sejauh ini belum pernah dikemukakan oleh peneliti lain.

4.2. Hasil Uji Warna

Uji warna yang dilakukan pada lichen merupakan uji pendahuluan yang khas dan bermanfaat untuk menunjukkan terdapatnya kelompok tertentu senyawa-senyawa pada lichen, termasuk terdapatnya depsida dan depsidon, kelompok isolat lichen yang umumnya memiliki potensi bioaktif. Hasil uji warna yang telah dilakukan adalah sebagaimana tercantum pada Tabel 4.1 dan 4.2 berikut ini :

Tabel 4.1. Hasil uji warna untuk ekstrak dan serbuk talus lichen *P. tinctorum*

Ekstrak	Perubahan warna			
	5% KOH (K)	CaOCl ₂ (C)	5% KOH + Ca(OCl) ₂ (KC)	1%FeCl ₃ dalam etanol
Heksana	Kuning	Tidak ada perubahan	Kuning	Ungu
Diklorometana	Kuning	Tidak ada perubahan	Kuning	Ungu
Etil asetat	Kuning+	Merah	Kuning kemerahan	Ungu
Aseton	Kuning+	Merah	Kuning kemerahan	Ungu
Serbuk talus + aseton	Kuning	Merah	Kuning kemerahan	Ungu

Tabel 4.2. Hasil uji warna untuk ekstrak dan serbuk talus lichen *H. osseoalba*

Ekstrak	Perubahan warna			
	5% KOH (K)	NaOCl (C)	5% KOH + CaOCl ₂ (KC)	1%FeCl ₃ dalam etanol
Heksana	Kuning	Tidak ada perubahan	Kuning	Ungu
Diklorometana	Kuning	Tidak ada perubahan	Kuning	Ungu
Etil asetat	Kuning	Merah	Kuning kemerahan	Ungu
Aseton	Kuning+	Merah	Kuning kemerahan	Ungu
Serbuk talus + aseton	Kuning	Merah	Kuning kemerahan	Ungu

Hasil uji warna terhadap ekstrak dan serbuk talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* menunjukkan hasil yang serupa, hal ini mungkin terjadi karena kedua

lichen memiliki famili yang sama, sehingga terdapat banyak persamaan kandungan kimia dalam kedua spesies tersebut.

Uji FeCl_3 5% dalam etanol dilakukan untuk menunjukkan terdapatnya senyawa fenolik pada sampel, pada uji ini semua sampel memberikan hasil uji positif, yang menunjukkan terdapatnya gugus fenolik.

Pada uji K terhadap kedua spesies, terbentuk warna kuning pada penambahan reagen KOH terhadap ekstrak heksana, diklorometana, etil asetat, aseton dan serbuk talus lichen, dengan intensitas yang lebih kuat pada ekstrak etil asetat dan aseton. Hasil uji positif pada uji K ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah sampai ungu, yang menandakan terdapatnya turunan kuinon atau turunan asam pulvinat, namun pada penelitian ini, tidak terbentuk warna ungu yang memberikan indikasi tidak terdapat atau sangat rendahnya kandungan kuinon. Beberapa senyawa yang umum pada lichen atranorin, asam hipothamnolat dan beberapa turunan beta-orsinol depsidon memberikan pewarnaan kuning yang mengarah ke merah. Terbentuknya warna kuning setelah penetesan reagen uji K pada noda ekstrak menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan adanya kandungan atranorin, asam hipothamnolat dan turunan beta-orsinol depsidon dalam konsentrasi yang rendah.

Pemberian reagen uji C pada ekstrak heksana dan diklorometana tidak menyebabkan perubahan, sedangkan pada ekstrak etil asetat dan aseton, serta serbuk talus terbentuk warna merah bata. Hasil uji C yang positif ditunjukkan dengan terjadinya warna merah muda yang lemah sampai dengan merah tua, atau hijau muda yang sangat lemah. Terbentuknya warna merah menandakan terdapatnya senyawa aromatik yang memiliki dua gugus hidroksil pada posisi meta, sedangkan warna hijau muda menunjukkan terdapatnya setidaknya satu gugus hidroksil dari senyawa turunan dibenzofuran.. Dari hasil percobaan terlihat bahwa hanya ekstrak etil asetat dan aseton talus lichen yang memberikan hasil positif. Dapat disimpulkan pada ekstrak etil asetat dan aseton talus lichen terdapat senyawa aromatik yang tersubstitusi dua gugus -OH pada posisi meta, struktur semacam ini lazim ditemui pada senyawa depsida. Sedangkan pada ekstrak heksana dan diklorometana tidak nampak terdapatnya senyawa aromatik yang tersubstitusi dua gugus OH yang saling berposisi meta, atau konsentrasinya terlalu rendah.

Uji KC dilakukan untuk menunjukkan terdapatnya suatu depsida yang bila terhidrolisis akan menghasilkan senyawa dengan gugus -OH fenolik yang berposisi saling meta, yang merupakan ciri khas suatu depsida. Uji KC hanya bermakna apabila dengan reagen K atau C suatu sampel tidak memberikan respon terbentuknya warna merah. KOH menghidrolisis ikatan ester pada depsida dan depsidon, dan jika gugus hidroksil fenolik yang terbentuk saling berposisi meta, maka reagen C yang selanjutnya ditambahkan akan memberikan hasil uji positif. Pada ekstrak heksana dan diklorometana tidak terjadi warna merah, warna kuning yang terbentuk merupakan hasil reaksi uji K, sehingga dari hasil uji ini, ekstrak diklorometana dan heksana tidak menunjukkan terdapatnya senyawa yang jika dihidrolisis akan menghasilkan senyawa dengan gugus OH yang berposisi meta, atau konsentrasinya sangat rendah, sehingga tidak teruji. Sedangkan pada ekstrak etil asetat, aseton uji ini menjadi tidak berarti karena hasil uji C memberikan warna merah.

Dari keseluruhan hasil uji dapat disimpulkan:

1. Pada ekstrak heksana dan diklorometana lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* terdapat senyawa fenolik, namun tidak terdapat senyawa aromatik yang memiliki dua gugus -OH yang saling berposisi meta, maupun senyawa yang bila dihidrolisis akan menghasilkan senyawa aromatik dengan gugus OH yang saling berposisi meta, atau konsentrasinya sangat rendah, fakta ini menunjukkan bahwa pada ekstrak heksana dan aseton konsentrasi depsida sangat rendah.
2. Pada ekstrak etil asetat dan aseton lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*, terdapat senyawa fenolik dan senyawa aromatik yang tersubstitusi dua gugus -OH pada posisi meta, hal ini menunjukkan bahwa pada lichen kandungan depsida banyak terdapat pada ekstrak etil asetat dan aseton.
3. Pada ekstrak lichen kemungkinan terdapat atranorin, asam hipothamnolat dan turunan beta-orsinol dalam konsentrasi yang sangat rendah
4. Pada ekstrak lichen tidak terdapat turunan kuinon atau konsentrasinya sangat rendah.

4.3. Toksisitas Ekstrak Talus Lichen Terhadap *A. salina* Leach

Hasil uji toksisitas ekstrak terhadap *A. salina* Leach adalah sebagai berikut:

Tabel 4.3. Hasil uji toksisitas ekstrak talus lichen *P. tinctorum*

No	Ekstrak P. tinctorum	LC ₅₀ µg/mL	aktivitas
1	Heksana	152.41	Toksik/aktif
2	Diklorometana	57.02	Toksik/aktif
3	Etil asetat	28,80	Toksik/aktif
4	Aseton	17,70	Toksik/aktif

Tabel 4.4. Hasil uji toksisitas ekstrak talus lichen *H. osseoalba*

No	Ekstrak H. osseoalba	LC ₅₀ µg/mL	aktivitas
1	Heksana	128,8	Toksik/aktif
2	Diklorometana	91,20	Toksik/aktif
3	Etil asetat	11,70	Toksik/aktif
4	Aseton	6,68	Toksik/aktif

Toksisitas terhadap *A. salina* dapat digunakan sebagai skrining awal bioaktivitas senyawa. Senyawa bioaktif hampir selalu bersifat racun dalam dosis yang tinggi. Beberapa senyawa yang diketahui bersifat anti kanker, misalnya piceatannol yang secara *in vivo* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker L 1210, dan secara *in vitro* menghambat pertumbuhan sel murine 9 PS (ED₅₀ = 2,5 µg/mL) memiliki nilai LC₅₀ sebesar 278 µg/mL pada uji BSLT. Iridoid memiliki nilai LC₅₀ sebesar 1,7 µg/mL pada uji BSLT, merupakan anti leukemia pada sel murine 9 KB (ED₅₀ = 2,6 µg/mL). Hasil uji BSLT juga memberikan panduan yang relevan untuk skrining potensi bioaktivitas ekstrak

tanaman, untuk mendapatkan senyawa dengan bioaktivitas selain anti kanker, misalnya ekstrak etanol batang dan akar *Asimina triloba* Dunal yang hasil uji BSLT-nya menunjukkan kategori aktif, secara *in vivo* juga bersifat toksik pada tikus ($LC_{50} = 6,25 \text{ } 2,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Dari hasil isolasi diperoleh senyawa asimisin yang pada uji BSLT memiliki nilai LC_{50} sebesar $0,03 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Asimisin memiliki bioaktivitas yang sangat tinggi sebagai anti malaria, nematosida dan antikanker. (Dey, 1991)

Pada penelitian ini uji BSLT digunakan sebagai skrining untuk memperoleh senyawa anti kanker dari ekstrak lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba*. Berdasarkan hasil uji toksisitas ekstrak talus lichen terhadap *A. salina* Leach dengan metode BSLT, sebagaimana terdapat pada Tabel 4.3 dan 4.4, maka tingkat toksisitas ekstrak talus lichen *P. tinctorum* secara berurutan adalah ekstrak heksana < ekstrak diklorometana < ekstrak aseton < ekstrak etil asetat. Pada ekstrak lichen *P. tinctorum* keseluruhan ekstrak dinyatakan dalam batas aktif. Ekstrak etil asetat dan aseton memiliki toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak heksana dan diklorometana. Sedangkan pada ekstrak talus lichen *H. osseoalba* keseluruhan ekstrak dinyatakan dalam batas aktif. Ekstrak etil asetat dan aseton memiliki toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak heksana dan diklorometana, dimana ekstrak aseton memiliki toksisitas yang tertinggi. Merujuk pada hasil uji BSLT, ekstrak lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* merupakan ekstrak yang bersifat toksik dan berpotensi mengandung senyawa bioaktif.

Berdasarkan hasil uji warna kandungan senyawa kimia ekstrak heksana sangat mendekati ekstrak diklorometana sedangkan kandungan senyawa kimia ekstrak etil asetat sangat mendekati ekstrak aseton. Senyawa fenolik didapatkan pada seluruh ekstrak, namun depsida, kelompok senyawa pada lichen yang umumnya bersifat bioaktif pada lichen terdapat dalam konsentrasi yang tinggi hanya pada ekstrak etil asetat dan aseton, hal ini juga didukung oleh hasil uji BSLT yang menunjukkan bahwa tingkat toksisitas ekstrak aseton dan etil asetat yang bersifat semi polar, jauh lebih tinggi dibandingkan tingkat toksisitas ekstrak heksana dan diklorometana, namun meski tingkat toksisitas ekstrak heksana dan diklorometana yang bersifat non polar, jauh lebih rendah,

kedua ekstrak tersebut masih berada dalam kategori aktif, karena itu selanjutnya eksplorasi senyawa tetap dilakukan pada ekstrak non polar dan semi polar. Karena jenis senyawa yang terdapat pada ekstrak heksana dan diklorometana dan hampir sama, demikian pula ekstrak etil asetat dan aseton, sementara itu hasil ekstraksi dengan diklorometana dan aseton menghasilkan rendemen yang lebih banyak daripada ekstraksi dengan heksana dan etil asetat, karena itu dalam penelitian selanjutnya isolasi dilakukan pada ekstrak diklorometana untuk fraksi non polar dan ekstrak aseton untuk fraksi semi polar.

4.4. Penentuan Struktur Senyawa

4.4.1. Penentuan Struktur Senyawa (1)

Senyawa (1) diisolasi dari ekstrak aseton *P. tinctorum*, berbentuk kristal jarum berwarna putih tersusun seperti bunga es, senyawa ini larut dalam aseton. Data hasil analisis spektroskopi dipaparkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (1) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS

Instrumen	Pembacaan
UV (nm, aseton)	246 ; 318
FTIR (cm ⁻¹), KBr	3533; 2993; 1627; 1465; 1357; 1280; 1172; 995; 725
LC-MS [M+1]	169 [M+1]

Tabel 4.6. Data hasil analisis spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa (1)

C	H	¹³ C-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500	¹ H-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500

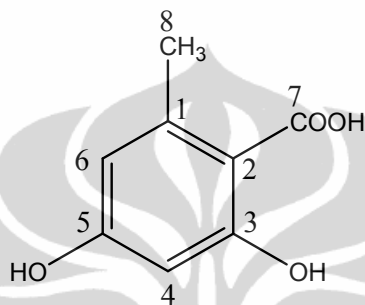
		MHz, δ , ppm)	MHz, δ , ppm)
C-1	-	104,89	-
C-2	-	166,98	-
C-3	-H-3	101,5	6,22 (1H,d,J=2,4 Hz)
C-4	-	163,37	-
C-5	H-5	112,16	6,28 (1H,d,J=2,4 Hz)
C-6	-	144,99	-
7-(CH ₃)	7-(CH ₃)	29,7	2,51 (3H,s)
8-(COOH)	-	174,18	-

Dari data LC-MS tampak puncak ion (M+H) pada 169, sehingga berat molekul senyawa (1) adalah 168. Puncak serapan UV senyawa (1) terletak pada 246 nm dan 318 nm, serapan UV pada 246 nm ini ditimbulkan oleh transisi $\pi-\pi^*$ pada cincin benzena dan serapan UV pada 318 nm ditimbulkan oleh transisi $n-\pi^*$ dari kromofor $-C=O-$ pada gugus benzoil. Dapat disimpulkan kemungkinan dalam senyawa (1) terdapat benzena yang tersubstitusi oleh substituen yang memiliki karbonil. Terdapatnya kromofor $-C=O$ terkonfirmasi oleh data spektrum FTIR. Dari hasil analisa spektrum infra merah, nampak adanya gugus $-OH$ bebas yang memberikan serapan $-O-H_{str}$ yang berpusat di sekitar bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) 3533, terdapatnya substitusi $-O-H$ pada struktur juga nampak dari terdapatnya serapan pada bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) 1280 dan 1172 yang merupakan serapan $-C-O$ fenolik. Terdapatnya gugus karboksil nampak dari serapan $-O-H_{def}$ karboksilat pada bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) 995. Adanya struktur aromatik ditunjukkan oleh serapan pada (ν , cm^{-1}) 1465 merupakan serapan $C=C_{str}$ dari cincin aromatik, dan (ν , cm^{-1}) 725 yang merupakan serapan $-C=C_{bend\ oop}$ aromatik

Spektrum ^1H-NMR menunjukkan pergeseran kimia pada $\delta H = 2,51$ ppm (3H,s) menunjukkan terdapatnya 1 gugus metil, 6,28 ppm (1H,d) dan ; 6, 22 ppm (1H,d) menunjukkan adanya 2 $-H$ pada cincin aromatik. Dari spektrum $^{13}CNMR$ (lampiran 5) senyawa (1) memberikan pergeseran kimia pada $\delta C = 29,74$; 101, 50; 104, 89; 112, 16; 144, 99; 163,37; 166, 98; 174, 18; senyawa (1) mengandung 8 karbon yang terdiri dari 1 karbon dari gugus karbonil $C=O$ pada pergeseran $\delta C = 174,18$ ppm. Karbon dari gugus $-CH_3$, pada $\delta C = 24,34$ ppm, 6 atom C aromatik

pada $\delta C = 101,50; 104, 89; 112, 16; 144, 99; 163,37; 166, 98$ ppm. Semua data spektrum ^{13}C NMR tepat berpasangan dengan data pada spektrum 1H NMR.

Berdasarkan data spektroskopi serta dengan melakukan penelusuran dan perbandingan dengan referensi, senyawa (1) sesuai dengan data referensi dari senyawa asam orselinat, perbandingan dari data spektroskopi senyawa (1) dengan senyawa asam orselinat yang dapat dilihat pada Tabel 4.7.



Gambar 4.1. Struktur molekul senyawa (1)

Tabel 4.7. Perbandingan data pergeseran kimia 1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa (1) dengan pergeseran kimia 1H NMR dan ^{13}C NMR Asam orselinat [Huneck, 1996]

C	H	¹³ C-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)		¹ H-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)	
		Senyawa (1)	Asam orselinat	Senyawa (1)	Asam orselinat
C-1	-	104,89	105,0	-	-
C-2	2-(OH)	166,98	164,5	-	-
C-3	3-H	101,5	100,6	6,22 (1H,d,J=1)	6,23 (1H,d,J=1)
C-4	4-(OH)	163,37	161,8	-	-
C-5	H-5	112,16	110,9	6,28 (1H,d,J=1)	6,29 (1H,d,J=1)
C-6	-	144,99	142,9	-	-
7-(CH ₃)	7-(CH ₃)	29,7	23,5	2,51 (3H,s)	2,52
8-(COOH)	8-(COOH)	174,18	173,3	-	12,0 (2H,bs)

4.4.2. Penentuan Struktur Senyawa (2)

Senyawa (2) diisolasi dari ekstrak aseton *P. tinctorum*, berbentuk kristal jarum berwarna putih, senyawa ini larut dalam aseton. Data hasil analisis spektroskopi dipaparkan pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (2) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrum IR, dan kromatogram LC-MS

Instrumen	Pembacaan
UV (nm, aseton)	248 ; 317
FTIR (cm ⁻¹), KBr	3510; 3271; 2931; 1728; 1589; 1458; 1280; 1165; 840; 725
LC-MS [M+1]	183,17 [M+1]

Tabel 4.9. Data hasil analisis spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa (2)

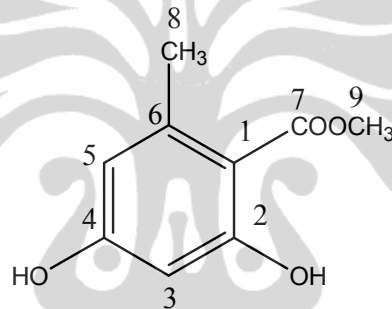
C	H	¹³ C-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)	¹ H-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)
C-1	-	105,43	-
C-2	2-(OH)	166,38	11,6 (1H,s)
C-3	H-3	101,70	6,23 (1H,d,J=1,85 Hz)
C-4	4-(OH)	163,40	12,01 (1H,s)
C-5	H-5	112,40	6,28 (1H,d,J=1,85 Hz)
C-6	-	144,40	-
7-(COO)	7-(COO)	173,4	-
8-(CH ₃)	8-(CH ₃)	29,58	2,45 (3H,s)
9-(OCH ₃)	9-(OCH ₃)	52,23	3,91 (3H,s)

Dari data LC-MS tampak puncak ion (M+1) pada 183,17, sehingga berat molekul senyawa (2) adalah 182,17. Puncak serapan UV senyawa (2) terletak pada 248 nm dan 317 nm, serapan UV pada 248 nm ini ditimbulkan oleh transisi $\pi-\pi^*$ pada cincin benzena dan serapan UV pada 317 nm ditimbulkan oleh transisi $n-\pi^*$ dari kromofor $-C=O-$ pada gugus benzoil. Dapat disimpulkan kemungkinan dalam senyawa (2) terdapat benzena yang tersubstitusi oleh substituent yang memiliki karbonil. Dari hasil analisa spektrum infra merah, nampak adanya serapan $-OH_{str}$ dari gugus OH bebas yang memberikan serapan pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 3510, $C-O_{str}$ gugus karbonil metil ester, nampak pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 1728 terdapatnya ikatan C-O-C ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 1280, ikatan C-O fenolik nampak dari serapan pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 1172. Adanya struktur aromatik ditunjukkan oleh serapan pada (ν, cm^{-1}) 1589 merupakan serapan $C=C_{str}$ dari cincin aromatik, dan (ν, cm^{-1}) 725 yang merupakan serapan $-C-H_{str}$ aromatik.

Spektrum ¹H-NMR memberikan pergeseran kimia pada $\delta H = 2,45$ ppm (3H,s) menunjukkan terdapatnya 1 gugus metil, 3,91, (3H, s) menunjukkan terdapatnya gugus $-OCH_3$; 6,23 (1H, d) dan 6,28, (1H, d) menunjukkan adanya 2-H pada benzena. 11,60, (1H, s) menunjukkan terdapatnya substitusi $-OH$ pada cincin aromatik.

Spektrum ^{13}C NMR senyawa (2) memberikan pergeseran kimia pada $\delta\text{C} = 24,3; 52,23; 101,70; 105,43; 112,40; 144,40; 163,40; 166,38; 173,04$ mengandung 9 karbon yang terdiri dari 1 karbon dari gugus karbonil $-\text{C}=\text{O}$ pada pergeseran $\delta\text{C} = 173,4$ ppm, 1 karbon dari gugus metil, pada $\delta\text{C} = 24,3$ ppm, 1 karbon dari gugus metil $-\text{COOMe}$, pada $\delta\text{C} = 52,23$ ppm, 6 atom C aromatik pada $\delta\text{C} = ; 101,70; 105,43; 112,40; 144,40; 163,40; 166,38$ ppm.

Berdasarkan data spektroskopi serta dengan melakukan penelusuran dan perbandingan dengan referensi, senyawa (2) sesuai dengan data referensi dari senyawa metil orselinat, perbandingan dari data spektroskopi senyawa (2) dengan senyawa metil orselinat yang dapat dilihat pada Tabel 4.8, struktur senyawa metil orselinat adalah sebagai berikut,



Gambar 4.2. Struktur molekul senyawa (2)

Tabel 4.10. Perbandingan data pergeseran kimia ^1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa (2) dengan pergeseran kimia ^1H NMR dan ^{13}C NMR metil orselinat

[Huneck, 1996]

C	H	¹³ C-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)		¹ H-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)	
		Senyawa (2)	Metil orselinat	Senyawa (2)	Metil orselinat
C-1	-	105,43	107,0	-	-
C-2	2-(OH)	166,38	161,2	-	-
C-3	H ₃	101,7	100,4	6,22 (1H,d,J=2)	6,31 (1H,s)
C-4	4-(OH)	163,40	161,2	-	-
C-5	H ₅	112,4	110,3	6,28 (1H,d,J=2)	6,31 (1H,s)
C-6	-	144,40	141,1	-	-
7-(CH ₃)	7-(CH ₃)	29,58	22,2	2,51 (3H,s)	2,49
8-(COOH)	8-(COOH)	173,4	170,3	11,6 (1H,s)	11,77 (1H,s)

4.4.3. Penentuan Struktur Senyawa (3)

Senyawa (3) diisolasi dari ekstrak diklorometana *P. tinctorum*, berbentuk kristal berwarna kuning pucat, senyawa ini larut dalam diklorometanadan aseton. Data hasil analisis spektroskopi dipaparkan pada Tabel 4.11.

Tabel 4.11. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (3) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrogram IR, dan kromatogram LC-MS

Instrumen	Pembacaan
UV (nm, aseton)	242
FTIR (cm ⁻¹), KBr	3410; 3232; 1750; 1620; 1512; 1219; 979; 825; 624;
LC-MS [M+1]	197,27 [M+1]

Tabel 4.12. Data hasil analisis spektroskopi ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan HMBC

lxviii

senyawa (3)

C	H	¹³ C-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)	¹ H-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)	HMBC (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ, ppm)
C-1	-	108	-	-
C-2	-H-2	110,68	6,2(1H,s)	24~108
C-3	-	-	-	-
C-4	4-(OH)	158	5,02 (1H,s)	-
C-5	-	140,34	-	-
C-6	6-(OH)	163,3	12,03 (1H,s)	-
7-(COO)	-	173	-	-
8-(CH ₃)	8-(CH ₃)	7,83	2,1(3H,s)	158~163
9-(CH ₃)	9-(CH ₃)	24,3	2,46 (3H,s)	110~140
10-(OCH ₃)	10-(OCH ₃)	52,02	3,92 (3H,s)	173

Dari data LC-MS tampak puncak ion (M+H) pada 197,2, sehingga berat molekul senyawa (3) adalah 196,2. Puncak serapan UV senyawa (1) terletak pada 246 nm dan 318 nm, serapan UV pada 242 nm ini ditimbulkan oleh transisi $\pi-\pi^*$ pada cincin benzena. Dapat disimpulkan bahwa senyawa (3) merupakan suatu benzena yang tersubstitusi. Dari hasil analisa spektrum infra merah, nampak adanya gugus -OH terikat yang memberikan serapan pada bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) 3232.

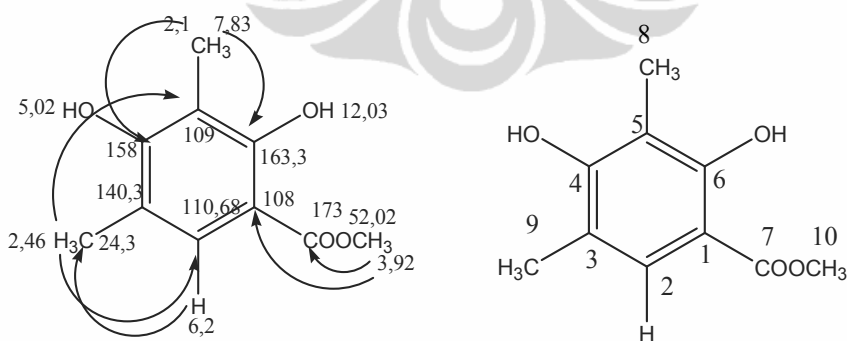
Terdapatnya gugus karbonil ester ditunjukkan oleh terdapatnya puncak (ν , cm^{-1}) 979 yang merupakan vibrasi -OH dan puncak $\text{C}=\text{O}_{\text{str}}$ pada bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) sekitar 1750. Adanya struktur aromatik ditunjukkan oleh puncak (ν , cm^{-1}) 1620 yang identik dengan vibrasi $\text{C}=\text{C}_{\text{str}}$ dari cincin aromatik, dan diperkuat (ν , cm^{-1}) 825 yang merupakan vibrasi $\text{C}-\text{H}_{\text{str}}$ aromatik tersubstitusi $\text{C}-\text{H}$ (Creswell, 1982)

Spektrum ¹H-NMR memberikan pergeseran kimia pada $\delta\text{H} = 2,10$ ppm (3H, s) dan 2,46 ppm (3H,s) menunjukkan terdapatnya 2 gugus -CH₃, 3,92, (3H, s); menunjukkan terdapatnya gugus -OCH₃; 5,02 (1H,s) menunjukkan terdapatnya

substitusi –OH pada cincin aromatik; 6,20 (1H,s) menunjukkan adanya –H pada cincin aromatik yang tidak tersubstitusi, dan 12,03 (1H,s), menunjukkan gugus –OH pada senyawa aromatik.

Dari spektrum ^{13}C NMR senyawa (3) memberikan pergeseran kimia pada $\delta\text{C} = 7,83; 24,31; 52,02; 110,68; 140,34; 158,15; 163,34$, menunjukkan bahwa senyawa (3) memiliki atom karbon yang berada diluar cincin aromatik, yang terdiri dari 2 karbon dari gugus metil, pada $\delta\text{C} = 7,83$ ppm dan $24,31$ ppm, 1 karbon dari gugus metoksi –OCH₃, pada $\delta\text{C} = 52,03$ ppm, terdapat 6 puncak C aromatik, terdapatnya cincin aromatik didukung oleh terdapatnya puncak 6,20 (singlet, 1H) pada spektrum ^1H NMR yang merupakan puncak khas –H yang terikat pada cincin benzena. Atom karbon dalam cincin aromatik pada spektrum ^{13}C NMR senyawa (3) nampak pada $\delta\text{C} = ; 110,68; 140,34; 158,15; 163,34$ ppm.

Hasil pengukuran HMQC senyawa (3) memperlihatkan bahwa proton dari gugus –CH₃ pada pergeseran kimia $\delta\text{H} = 2,1$ ppm (s) terikat pada karbon $\delta\text{C} = 7,83$ ppm, proton pada gugus –CH₃ pergeseran kimia $\delta\text{H} = 2,46$ ppm (s) terikat pada karbon $\delta\text{C} = 24,31$ ppm. Gugus metil ester dengan $\delta\text{H} = 3,92$ ppm terikat pada karbon $\delta\text{C} = 52,02$ ppm. Sedangkan proton –H aromatik pada pergeseran kimia $\delta\text{H} = 6,2$ ppm terikat pada karbon $\delta\text{C} = 110,68$ ppm. Berdasarkan analisis spectrum HMBC maka dengan memperhatikan korelasi antara atom H dan atom C maka struktur senyawa (3) diduga adalah sebagai berikut :



Gambar 4.3. Struktur molekul senyawa (3)

Hasil analisis data spektroskopi diatas, dapat disimpulkan bahwa senyawa (3) adalah senyawa 2,4- dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester. Dari hasil

penelusuran literatur dalam ranah eksplorasi senyawa alami dari ekstrak lichen, senyawa ini belum pernah dipublikasi karena itu diusulkan sebagai senyawa bahan alam baru dalam ranah penelitian lichen.

4.4.4. Penentuan Struktur Senyawa (4)

Senyawa (4) diisolasi dari ekstrak diklorometana *H. osseoalba*, berbentuk kristal jarum berwarna putih. Senyawa ini larut dalam diklorometana, kloroform dan aseton. Data hasil analisis spektroskopi dipaparkan pada Tabel 4.13.

Tabel 4.13. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (4) λ_{\max} absorbansi UV-Vis, spektrum IR, dan kromatogram LC-MS

Instrumen	Pembacaan
UV (CH ₂ Cl ₂ , nm)	245; 264; 301
FTIR (cm ⁻¹), KBr	3556; 3410; 3232; 2993; 2006; 1735; 1620; 1257; 1134; 1095; 979; 840
LC-MS [M+1]	374,99 [M+H]

Puncak serapan UV senyawa (1) terletak pada 245; 264 dan 301 nm, serapan UV pada 245 nm ini ditimbulkan oleh transisi $\pi-\pi^*$ pada cincin benzena jalur K, serapan UV pada 264 nm ini ditimbulkan oleh transisi $\pi-\pi^*$ pada cincin benzena jalur R, dan serapan UV pada 301 nm ditimbulkan oleh transisi $n-\pi^*$ dari kromofor -C=O- pada gugus benzoiil. Dapat disimpulkan kemungkinan dalam senyawa (4) terdapat substitusi gugus karbonil pada cincin benzena. Dari data LC-MS tampak puncak ion (M+H) pada 374,99. Sehingga senyawa ini memiliki berat molekul = 373,99.

Spektrum IR memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang (ν , cm⁻¹) 3556 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus -OH bebas dan serapan pada 3410 cm⁻¹ menunjukkan terdapatnya OH yang terikat. Nampak terdapat adanya gugus karboksil, yang ditunjukkan oleh vibrasi ulur C=O pada $\nu = 1735$ cm⁻¹, terdapatnya gugus karboksil terkonfirmasi dengan adanya serapan melebar diantara 3000 -2600 cm⁻¹, dengan puncak pada 2993 cm⁻¹. Vibrasi C=O fenolik nampak pada $\nu = 1257$ cm⁻¹ Serapan $\nu = 1134$ cm⁻¹ menunjukkan adanya ikatan C-O-C.

Dari spektrum ¹H-NMR terlihat adanya 4 gugus metil pada pergeseran kimia $\delta = 2,16$ ppm (3H, s), 2,17 ppm (3H, s), 2,46 ppm (3H, s) dan 2,60 ppm (3H,

s), dua gugus metoksi, pada pergeseran kimia $\delta H = 3,84$ ppm (3H, s) dan 3,86 ppm (3H, s), dan pergeseran kimia pada $\delta H = 6,53$ ppm (1H, s) dan 6,61 ppm (1H, s) menunjukkan adanya dua proton yang terikat pada cincin aromatik. Jumlah atom H keseluruhan sesuai dengan pembacaan spektrum 1H -NMR adalah 20 atom H. Berdasarkan spektrum IR nampak adanya gugus karboksilat, dan adanya gugus hidroksil, karena itu jumlah atom H diperkirakan sebanyak 22 atom, dimana atom H dari gugus hidroksil dan gugus karboksilat tidak nampak pada spektrum 1H -NMR.

Spektrum ^{13}C -NMR senyawa (4) menunjukkan terdapatnya 13 atom C yang terdiri dari 4 gugus $-CH_3$, 2 gugus $-OCH_3$, 1 gugus $-CO-O$, dan 6 atom karbon aromatik. Empat gugus metil terlihat pada $\delta C = 9,06; 9,29; 20,37; 24,28$ ppm. Dua gugus metoksi terlihat pada $\delta C = 55,89; 62,29$ ppm. Pergeseran kimia $\delta C = 108,29; 116,66; 117,72; 135,62; 157,38; 160,21$; ppm merupakan pergeseran kimia karbon aromatik. Berdasarkan spektrum HMQC (lampiran 23), terdapat 2 C-H aromatik pada $\delta C = 108,29$ dan 117,72. Sedangkan terdapatnya ikatan $CO-O$, ditunjukkan oleh pergeseran kimia pada 166,41 ppm. Spektrum IR menunjukkan terdapatnya gugus karboksilat, namun tidak tergambar pada spektrum ^{13}C -NMR, terdapatnya gugus karboksilat menambah satu atom karbon. Dengan berat molekul sebesar 373,99, dan jumlah substituen sebanyak 6 gugus, terdapatnya 2 C-H aromatik, dan 1 $-CO-O$, maka jumlah cincin aromatik harus dua cincin aromatik, sehingga jumlah karbon aromatik adalah 12 atom. Jumlah atom karbon keseluruhan adalah, 12 atom karbon aromatik, 4 atom karbon substituen $-CH_3$, 1 atom karbon dari $-CO-O$, 2 atom karbon dari 2 substituen metoksi, 1 atom karbon dari substituen $-COOH$, maka jumlah atom karbon keseluruhan adalah 20 atom.

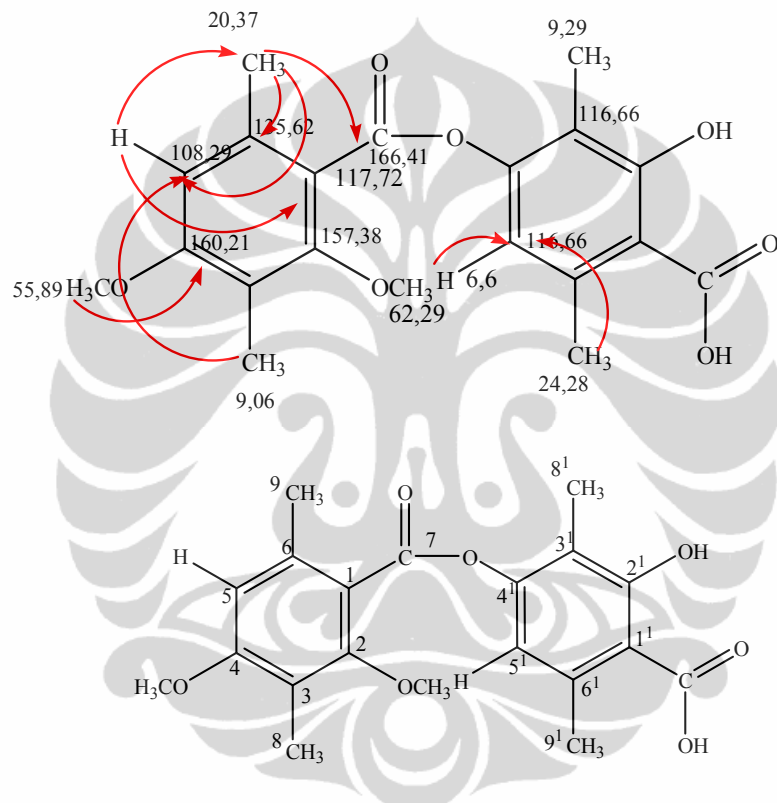
Jumlah atom O yang dimiliki oleh senyawa (4) dapat dihitung sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah atom O} &= (\text{Berat molekul} - \text{berat atom C} - \text{berat atom H}) / \text{massa atom O} \\ &= (373,99 - (20 \times 12) - (22 \times 1)) / 16 = 7 \text{ atom O} \end{aligned}$$

Rumus senyawa untuk senyawa (4) dapat dituliskan sebagai $C_{20}H_{22}O_7$

Berdasarkan data spektroskopi serta dengan melakukan penelusuran dan perbandingan dengan literatur (Huneck, 1996)

data spektroskopi struktur senyawa (4) mendekati data spektroskopi senyawa asam difraktat. Berdasarkan literatur asam difraktat, memiliki rumus molekul $C_{20}H_{22}O_7$. Asam difraktat sebelumnya telah ditemukan dalam lichen golongan *Usnea* (Huneck, 1996), namun belum ada publikasi yang melaporkan penemuan senyawa asam difraktat pada lichen *H.osseoalba*.



Gambar 4.4. Struktur molekul senyawa (4)

Perbandingan dari data spektroskopi senyawa (4) dengan senyawa asam difraktat dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Tabel 4.14. Perbandingan data pergeseran kimia ^1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa (4) dengan pergeseran kimia ^1H NMR dan ^{13}C NMR asam difraktat

H	C	Senyawa (4)		Asam difraktat	
		δH (TMS, aseton D-6, ppm)	δC (TMS, aseton D-6, ppm)	δH (TMS, aseton D-6, ppm)	δC (TMS, aseton D-6, ppm)
H-5	1		117,72		119,7
	2		157,38		159,5
	3		-		116,1
	4		160,21		156,4
	5	6,54(s)	108,29	6,54 (s)	108,4
	6		135,62		134,6
	7		166,41		165,5
H-8	8	2,16 (s)	9,06	2,18 (s)	8,8
H-9	9	2,46 (s)	20,37	2,47 (s)	19,5
H-5 ¹	1 ¹		-		116,5
	2 ¹		162,0		161,7
	3 ¹		-		111,0
	4 ¹		-		152,4
	5 ¹	6,60 (s)	116,66	6,62 (s)	115,8
	6 ¹		-		139,3
	7 ¹		173,0		173,4
H-8 ¹	8 ¹	2,18 (s)	9,29	2,18 (s)	9,0
H-9 ¹	9 ¹	2,60 (s)	24,28	2,61 (s)	23,0
2-(OCH ₃)	2-(OCH ₃)	3,84 (s)	62,29	3,85 (s)	61,7
4-(OCH ₃)	4-(OCH ₃)	3,86 (s)	55,89	3,87 (s)	55,7
2 ¹ -(OH)				11,7 (s)	173,4

4.4.5. Penentuan Struktur Senyawa (5)

Senyawa (5) diisolasi dari ekstrak aseton *H. osseoalba*, berbentuk kristal jarum berwarna kuning pucat, senyawa ini larut dalam aseton. Data hasil analisis spektroskopi dipaparkan pada Tabel 4.15.

Tabel 4.15. Data pembacaan hasil analisis spektroskopi senyawa (5) λ_{\max} absorpsi UV-Vis, spektrum IR, dan kromatogram LC-MS

Instrumen	Pembacaan
UV (nm, aseton)	246, 301
FTIR (cm ⁻¹), KBr	3008; 2802; 1649; 1595; 1502; 1462; 1280; 1178; 840; 798; 729; 692
LC-MS [M+1]	183,3 [M+1]

Tabel 4.16. Data hasil analisis spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa (5)

C	H	¹³ C-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ , ppm)	¹ H-NMR δ (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ , ppm)	HMBC (TMS, aseton d-6, 500 MHz, δ , ppm)
C-1	-	111,40	-	-
C-2	-	164,00	-	-
C-3	-H-3	101,44	6,22 (1H,d,J=2,4)	24,48
C-4		160,29	-	-
C-5	-H-5	105,92	6,27 (1H,d,J=2,4)	-
C-6	-	144,18	-	-
7-(CH ₃)	7-(CH ₃)	24,48	2,49 (3H,s)	111~144~173-
8-(COOH)	8-(COOH)	173,00	11,7 (1H,s)	164,00
9-(OCH ₃)	9-(OCH ₃)	52,08	3,92 (3H,s)	-

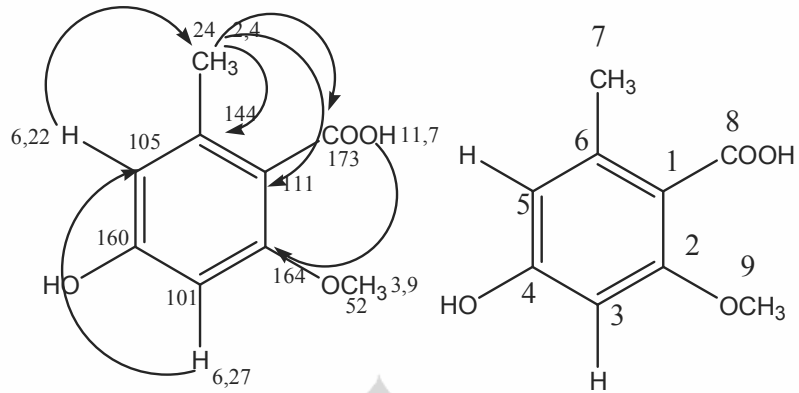
Dari data LC-MS tampak puncak ion (M+1) pada 183,3 sehingga berat molekul senyawa (5) adalah 182,3. Puncak serapan UV senyawa (5) terletak pada

246 nm dan 301 nm. Puncak serapan pada 246 nm, yang menunjukkan terdapatnya suatu transisi $\pi - \pi^*$ dari kromofor $-C=C-C=C-$ pada cincin benzena yang tersubstitusi, dan serapan pada 301 nm, yang menunjukkan suatu transisi $n-\pi^*$ dari gugus benzoil. Kemungkinan senyawa (5) merupakan suatu benzena tersubstitusi yang memiliki gugus $-CO-O$. Dari hasil analisa spektrum infra merah, nampak adanya serapan dari gugus $-OH$ bebas yang memberikan serapan pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 3008. Terdapatnya ikatan $C=O$ ditunjukkan oleh serapan dari $C=O_{\text{str}}$ pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 1649 dan ikatan $C-O-C$ ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang (ν, cm^{-1}) 1280. Adanya struktur aromatik ditunjukkan oleh serapan pada (ν, cm^{-1}) 1502 merupakan serapan $C=C_{\text{str}}$ dari cincin aromatik.

Spektrogram $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan pergeseran kimia pada $\delta\text{H} = 2,49$ ppm (3H,s); menunjukkan terdapatnya 1 gugus metil, pergeseran kimia 3,92 (3H,s); menunjukkan terdapatnya gugus $-OCH_3$; 6,22 (1H,d) dan 6,67, (1H,d) menunjukkan adanya 2 x $-H$ pada benzena yang tidak tersubstitusi, 11,7 (singlet, 1H) menunjukkan terdapatnya substitusi $-OH$ pada cincin aromatik. Jika dihitung dari BM senyawa sebesar 182,3, maka terdapat satu substituen yang tidak nampak pada spektrum NMR dengan massa 17, yang tepat dengan massa $-OH$

Spektrogram $^{13}\text{CNMR}$ senyawa (5) menunjukkan pergeseran kimia pada $\delta\text{C} = 24,48$; 52,08; 101,41; 105,92; 111,40; 144,18; 160,26, senyawa (5) memiliki 2 karbon diluar cincin aromatik, yang terdiri dari 1 karbon dari gugus metil, pada $\delta\text{C} = 24,48$ ppm, 1 karbon dari gugus metoksi $-OCH_3$, pada $\delta\text{C} = 52,08$ ppm, atom C aromatik pada $\delta\text{C} = 101,41$; 105,92; 111,40; 144,18; 160,26; ppm.

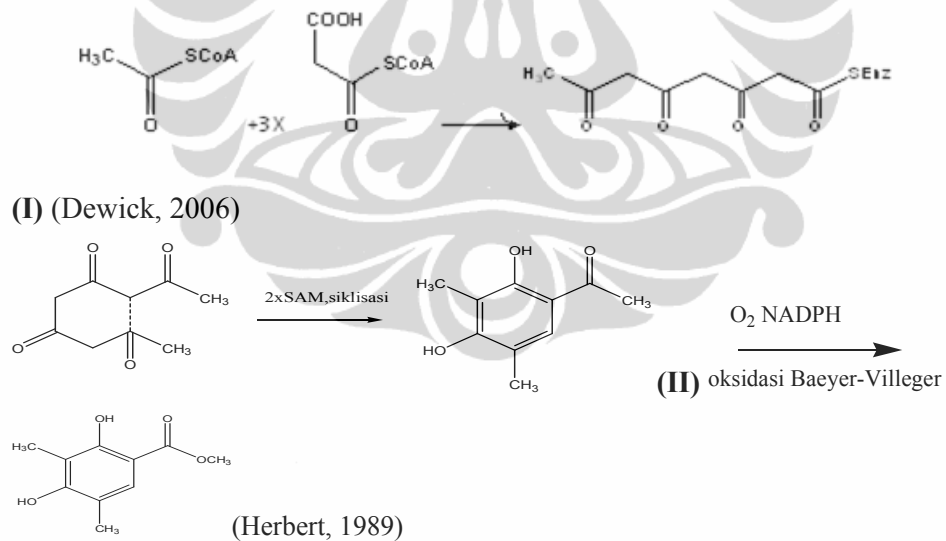
Hasil pengukuran HMQC (lampiran 30) memperlihatkan bahwa proton dari gugus $-CH_3$ pada pergeseran kimia $\delta\text{H} = 2,49$ ppm (s) terikat pada karbon $\delta\text{C} = 24,48$ ppm. Gugus metoksi dengan $\delta\text{H} = 3,92$ ppm terikat pada karbon $\delta\text{C} = 52,08$ ppm. Sedangkan proton $-H$ aromatik pada pergeseran kimia $\delta\text{H} = 6,22$ ppm terikat pada karbon $\delta\text{C} = 111,40$ ppm dan proton $-H$ aromatik pada pergeseran kimia $\delta\text{H} = 6,27$ ppm terikat pada karbon $\delta\text{C} = 101,41$ ppm. Berdasarkan analisis spektrum HMBC maka dengan memperhatikan korelasi antara atom H dan atom C maka struktur senyawa (5) adalah sebagai berikut :



Gambar 4.5. Struktur molekul senyawa (5)

Dari analisis data spektroskopi diatas, dapat disimpulkan bahwa senyawa (5) adalah senyawa asam iso everninat.

4.5. Usulan biosintesis senyawa 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester



Gambar 4.6. Biosintesis senyawa 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoate metil ester

Biosintesis senyawa (3) dimulai dari pembentukan tetraketida dari penggabungan asetil-CoA dan 3 malonil-CoA, menjadi produk antara hipotetik (I)

yang kemudian mengalami metilasi yang melibatkan S-adenin metionin dan siklisasi menjadi produk antara (II), produk antara (II) selanjutnya mengalami reaksi oksidasi Baeyer –Villegier yang melibatkan $[O_2]$ dan NADPH menjadi produk akhir (III) yaitu senyawa 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester.

4.6. Sitotoksisitas senyawa hasil isolasi terhadap sel *murine leukemia P-388*

Uji sitotoksisitas senyawa terhadap sel murine leukemia P-388 dilakukan pada senyawa murni hasil isolasi yaitu terhadap senyawa (1) senyawa (2), senyawa (3), senyawa (4) dan senyawa (5). Senyawa (1) adalah asam orselinat, senyawa (2) adalah metil orselinat, senyawa (3) adalah 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester, senyawa (4) adalah asam difraktat, senyawa (5) adalah asam everninat.

Tabel. 4.17. Hasil pengujian sitotoksisitas terhadap sel *murine leukemia P-388* pada senyawa hasil isolasi

No	Senyawa	IC ₅₀ µg/ml.
1	Asam orselinat (1)	<100
2	Metil orselinat (2)	60
3	2,4- dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester. (3)	32
4	Asam difraktat (4)	62
5	Asam iso everninat (5)	21,5

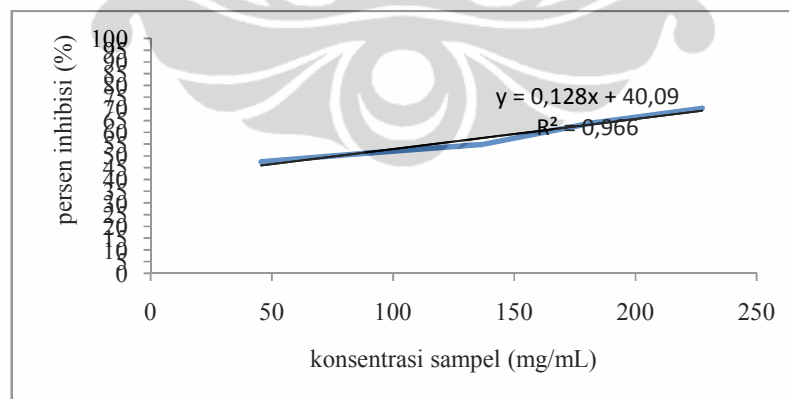
Dari hasil uji sitotoksisitas, senyawa asam iso everninat (5) memiliki kemampuan dalam taraf sedang untuk menghambat pertumbuhan sel murine leukemia P-388, senyawa asam orselinat (1), senyawa metil orselinat (2), senyawa 2,4 dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester (3), senyawa asam difraktat (4) bersifat tidak aktif sebagai penghambat pertumbuhan sel *M. leukemia P-388*.

4.7. Aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi

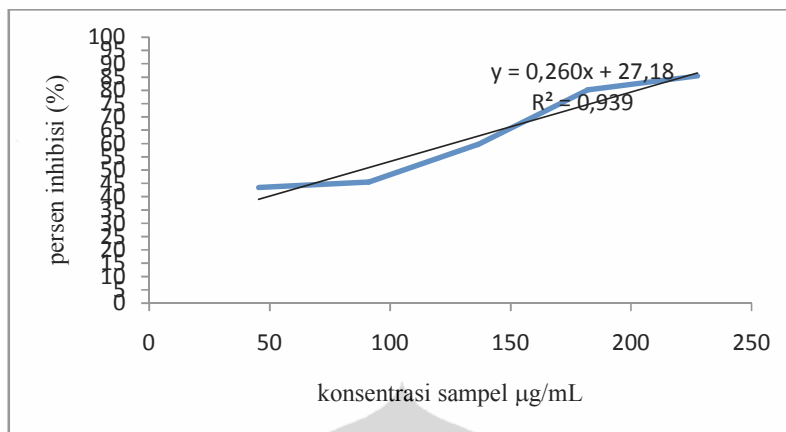
Aktivitas antioksidasi yang dimiliki oleh suatu senyawa menunjukkan kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal bebas. Ekstrak lichen memiliki potensi yang tinggi untuk bertindak sebagai senyawa antioksidan.

Kandungan fenolik pada senyawa yang terdapat dalam ekstrak lichen berkaitan dengan aktivitas antioksidan yang dimiliki. Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan reagen DPPH. Reagen DPPH berwarna ungu, sesaat setelah bereaksi dengan sampel, radikal DPPH akan ditangkap oleh sampel sehingga konsentrasi DPPH akan menurun. Pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH, hal ini menjadi prinsip pengukuran aktivitas antioksidan. Pengurangan intensitas warna ungu DPPH disebabkan oleh bereaksinya molekul difenil pikril hidrazil dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul sampel sehingga terbentuk senyawa difenil pikril hidrazin dan menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu ke kuning. Penangkapan radikal DPPH oleh sampel menyebabkan turunnya intensitas warna ungu. Penangkapan radikal mengakibatkan ikatan rangkap diazo pada DPPH berkurang sehingga terjadi penurunan absorbansi.

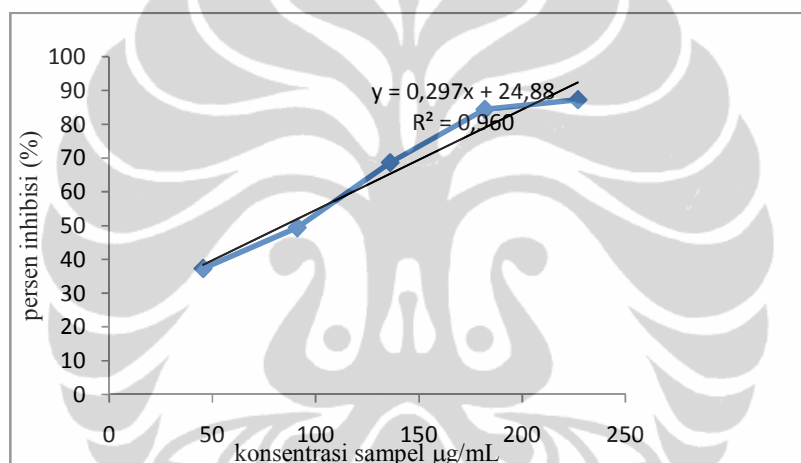
Data hasil penelitian uji aktivitas antioksidan dihitung sehingga diperoleh persen inhibisi dari sampel. Selanjutnya persen inhibisi dari sampel diplotkan terhadap konsentrasi sampel, sehingga diperoleh suatu kurva regresi linear. Kurva hasil uji aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi adalah sebagaimana disajikan pada Gambar 4.7 sampai dengan Gambar 4.11



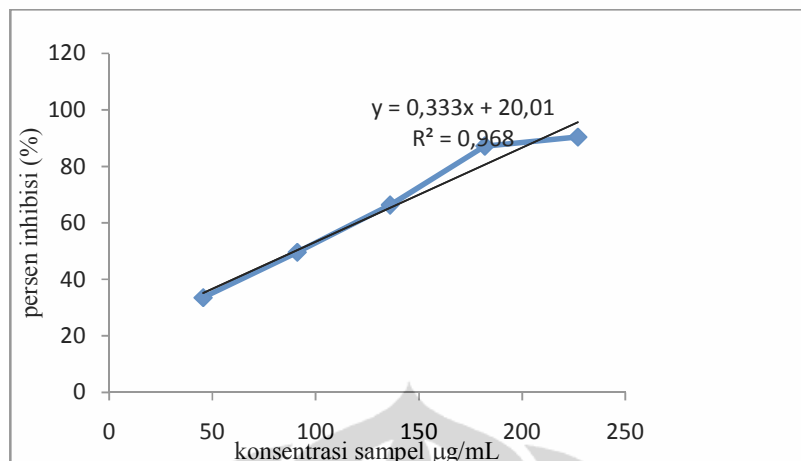
Gambar 4.7 Aktivitas antioksidan senyawa asam orselinat



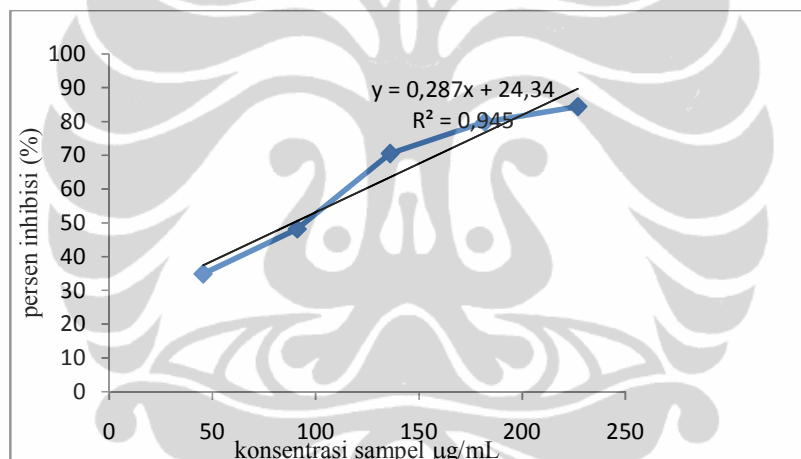
Gambar 4.8. Aktivitas antioksidan senyawa metil orsellinat



Gambar 4.9. Aktivitas antioksidan senyawa 2,4- dihidroksi 3,5- dimetil benzoat metil ester (3)



Gambar 4.10. Aktivitas antioksidan senyawa asam difraktat



Gambar 4.11. Aktivitas antioksidan senyawa asam iso everninat

Dari persamaan regresi dapat dihitung nilai IC_{50} , asam orselinat memiliki nilai IC_{50} sebesar 77.42 µg/mL, metil orselinat memiliki nilai IC_{50} sebesar 87.77 µg/mL, asam difraktat 90,06 µg/mL, senyawa 2,4- dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester 84,57 µg/mL, 70,83 µg/mL untuk senyawa asam iso everninat. Dari hasil uji aktivitas antioksidan nampak bahwa semua senyawa hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan pada kategori kuat, asam iso everninat memiliki aktivitas anti oksidan paling kuat daripada senyawa hasil isolasi yang lain. Menurut hasil penelitian Noraslamiyah (Noraslamiyah, 2010), aktivitas antioksidan yang kuat merupakan salah satu indikasi terdapatnya sifat

sitotoksik yang baik. Pada penelitian ini senyawa (5), asam isoeverninat, yang merupakan senyawa dengan aktivitas antioksidan yang paling kuat, juga memiliki aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel *murine leukemia P-388*, sementara senyawa lain yang memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah daripada asam isoeverninat bukan merupakan senyawa sitotoksik.



BAB 5

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak talus lichen *P. tinctorum* dan *H. osseoalba* dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Dari hasil isolasi ekstrak talus lichen *P. tinctorum* telah diidentifikasi senyawa (1) yaitu asam orselinat, senyawa (2) metil orselinat, senyawa (3) yang diusulkan sebagai senyawa baru pada ranah penelitian lichen yang diberi nama 2,4-dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester
2. Dari hasil isolasi ekstrak talus lichen *H. osseoalba* telah diidentifikasi senyawa (4) yaitu asam difraktat, dan senyawa (5) yaitu asam iso everninat
3. Dari hasil uji sitotoksitas, senyawa asam everninat (5) memiliki kemampuan dalam taraf sedang untuk menghambat pertumbuhan sel murine leukemia P-388, senyawa asam orselinat (1), senyawa metil orselinat (2), senyawa 2,4-dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester (3), senyawa asam difraktat (4) bersifat tidak aktif sebagai penghambat pertumbuhan sel murine leukemia P-388.
4. Senyawa hasil isolasi memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} masing-masing sebagai berikut, asam orselinat memiliki nilai IC_{50} sebesar 77.42 $\mu\text{g/mL}$, metil orselinat memiliki nilai IC_{50} sebesar 87.77 $\mu\text{g/mL}$, asam difraktat 90,06 $\mu\text{g/mL}$, senyawa 2,4-dihidroksi 3,5-dimetil benzoat metil ester 84,57 $\mu\text{g/mL}$, senyawa asam iso everninat 70,83 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

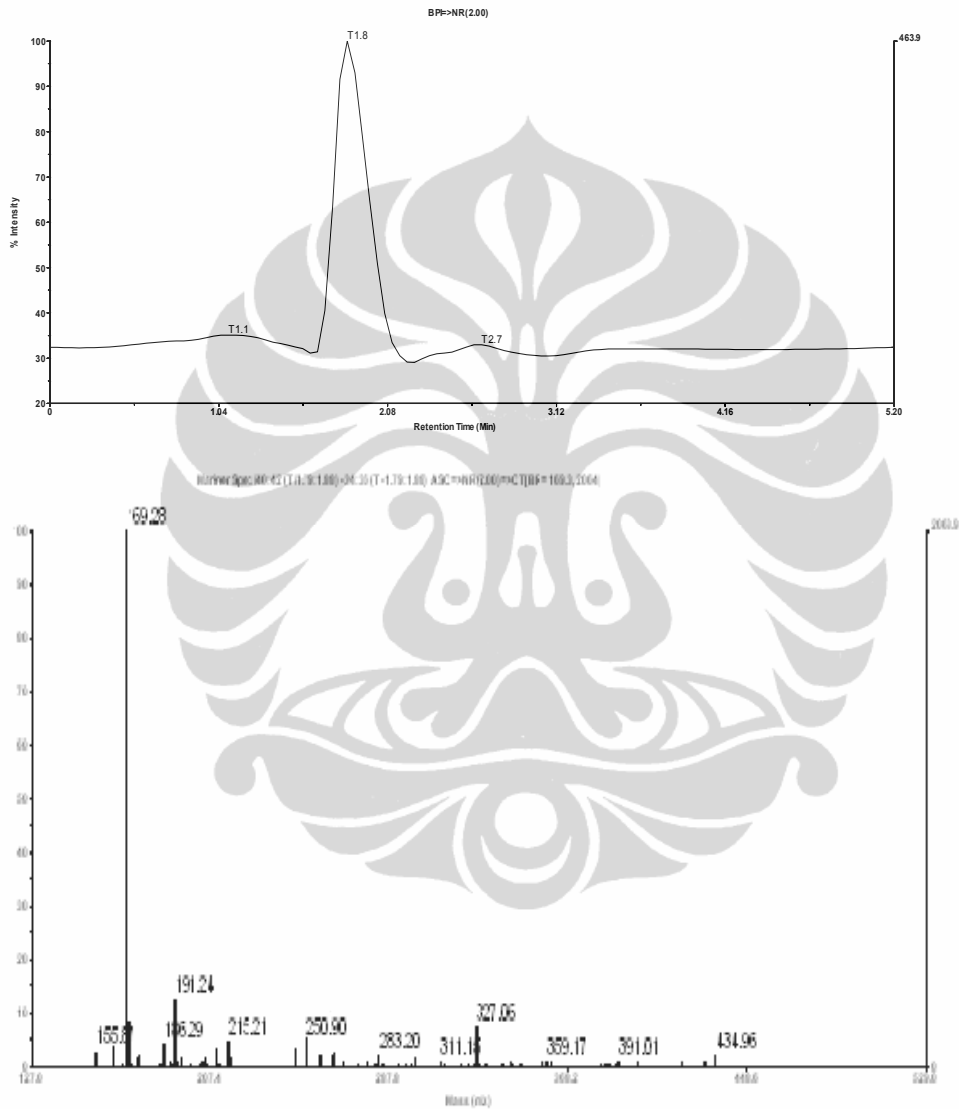
- Anwar, Fitriya. L.,(2009). Uji Aktivitas Antikanker Secara *In Vitro* dengan *Sel Murine P-388* Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etilasetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helmynthostachis Zeylanica (Linn) Hook*). Jurnal Penelitian Sains, **2**, (1C) : 121061-121064
- Ashariati, A., (2007). Ekspresi *Her-2/neu* dan *Mdr-1* Berkorelasi dengan Gen *MDR-1* Pada Penderita Kanker Payudara “*Locally Advance*” Pasca Pengobatan Antrasiklin. Disertasi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Indonesia
- Australian Government. (2007), Checklist of the Lichens of Australia and its Island Territories: *Parmotrema Tinctorum (Nyl.) Hale*.
<http://www.anbg.gov.au/abrs/lichenlist/parmeliaceae>
- Balaji, P., Hariharan, G.N. (2007). Invitro Antimicrobial Activity of *P. Praesoredium* Thallus Extract. Research Journal of Botany, **2**, (1) : 54-59
- Bialonska, D., Dayan, F.E. (2005). Chemistry of Lichen *Hypogymnia physodes* Transplanted to an Industrial Region, Journal of Chemical Ecology, **31**(12):2975-2991.
- Chin Y.W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. (2006). Drug Discovery From Natural Sources. AAPS Journal. **8**(2): E239-E253
- Correche, E., (2002). Cytotoxic Screening Activity of Secondary Lichen Metabolites, Acta farm. Bonaerence (**4**), 273-278, Chile:
<http://www.Latanjpharm.org/trabajos/21/4/LAJOP>.
- Creswell, Clifford, J., Runquist, Olaf, A., Campbell, M.M., (1982), Analisis Spektrum Senyawa Organik, Bandung, Indonesia: Penerbit ITB.
- Culberson C.F., (1969). Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. Chapel Hill, USA: University of North Carolina Press.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S., dan Mohammad, N.S. (2009). Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Ferula Assafoetida* and Its Essential Oil Composition. Grasas Aceites, **60**(4), 405-412.
- Dewick, Paul M., (2006). Medicinal Natural Products, John Wiley & Sons. England.

- Dey, P.M., and Harborne, J.B., (1991). *Methods In Plant Biochemistry*, **6**, Harcourt: Academic Press.
- Ding Zhihui, Ding Jingkai. (1990). *Chemical Constituent from Parmelia Tinctorum*, *Acta Botanica Yunnanica*: **12**(1): 1-3 <http://en.cnki.com.cn>.
- Elix, J.A., Engkaninan, U. The Structure of Lividic Acid. A Depsidone from the lichen *Parmelia formosana*. *Australian Journal of Chemistry* **29** (1): 203-207
- Fessenden, R.J., and Fessenden, J.S. (1982). *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga.
- Gitawati, Retno. (1995). Radikal Bebas - Sifat dan Peran dalam Menimbulkan Kerusakan/ Kematian Sel. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 102 : 33 - 36
- Gomes, A.T., Smania Jr, A., et.al. (2003). Antibacterial Activity of Orsellinates. *Brazilian Journal of Microbiology*, **34**, (3) : 194 -196
- Gordaliza, M. (2007). Natural Product As Leads For anticancer Drug, *Clinical Transl. Oncology*, Milan: Springer Milan **9** : 767 -776
- Halama, P., & Van Haluwin, C. (2004). Antifungal Activity of Lichen Extracts and Lichenic Acids. *Mendeley*, **49** (1) : 95 -107
- Hale, M.E., Ahmadjian V. (1973). *The Lichens*. New York: Academic Press NY
- Herbert, R.B.,(1989), *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, 2nd.ed, London : Chapman and Hall
- Huneck, S., Yoshimura I. (1996). *Identification of Lichen Substance*, Berlin: Springer
- Katno, S., Pramono, Edi. (2007). *The Commercial Use of Traditional Knowledge and Medicinal Plant in Indonesia*, *Copendium of Medicinal and Aromatic Plants*, **2**
- Kosanic, Marijana, Rankovic, dan Branislav. (2011). Lichen as Possible Sources of Antioxidant. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **24**, (2) : 165 - 171
- Malhotra, S. (2008). Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *Internet Journal of Alternative Medicine*: <http://www.ispub.com/ostia>
- Markham, K.R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB.
- Pasaribu, P. S., Marliana, E., Napitupulu, B. S., (2008), Uji Fitokimia, Toksisitas, Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Batang Jarak Cina (*Jatropha Multifida L.*), *Jurnal Kimia Universitas Mulawarman*, **5**, (2) : 1-9

- Pokorny, J.N, M. Yanishlieva, Gordon. (2001). *Antioxidant in Food*. Boca Raton, Boston, New York, Washington D.C: CRC Press.
- Ramkovic B., Mistic Sukdolav. (2007). Antimicrobial, Activity of Extract of the Lichen *Cladonia furcata*, *parmelia Caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes*, *Umbilicaria polyphylla*, *British journal of Biomedis Science*, **64** : 143-148
- Rao, G. Venkateshwar. (2008). *Folk Medicines For Anti Cancer Therapy*, A Current Status, *Cancer Therapy*, **6** : 913 - 922
- Russo A, Piovano M, Lombardo L. (2006). Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma *DU-145* cells. *Anticancer Drugs*, **17**(10):1163-1169
- Sarju, N., Ghani, M.A, Hamdan, S., Samad A.A., (2010). Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaves of *Melastoma decemfidum Roxb. Ex. Jack*. National Biotechnology Seminar, Malaysia
- Sharnoff, Sylvia D. (2009). *Bibliographical Database of The Human Uses of Lichen*. On line (<http://www.com/usetype.html>)
- Shibamoto T, Kumon H. (2006). Inhibitory effect of Lichen Constituent on Mutagenicity Induced by Heterocyclic Amines. *Env. Mutagen, Wiley Inter Science*, **18**(1): 35
- Silverstein, R.M., Bassler. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compound*. Singapore: John Wiley & Sons, Inc.
- Siswandono, Soekardjo, B. (1995). *Kimia Medisinal*, Surabaya: Airlangga University Press.
- Tjitrosoepomo, G. (1989). *Taksonomi Tumbuhan Shizophyta, Thallophyta, Bryophyta, Pteridophyta*, Yogyakarta: Gajahmada University Press.
- Wei, Xinli , Jeon, Hae-Sook. (2008). Antifungal Activity of Lichen-forming against *Colletotrichum acutatum* on Hot Pepper. *The Plant Pathology Journal*, **24**(2): 204
- ZipcodeZoo.com, *Hypotrachyna osseoalba (Vain) Y.S. Park & Hale*. <http://www.zipcodezoo.com>
- ZipcodeZoo.com, *Parmelia Tinctorum (Nyl.) Hale*. <http://www.zipcodezoo.com>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kromatogram LC-MS Senyawa (1)

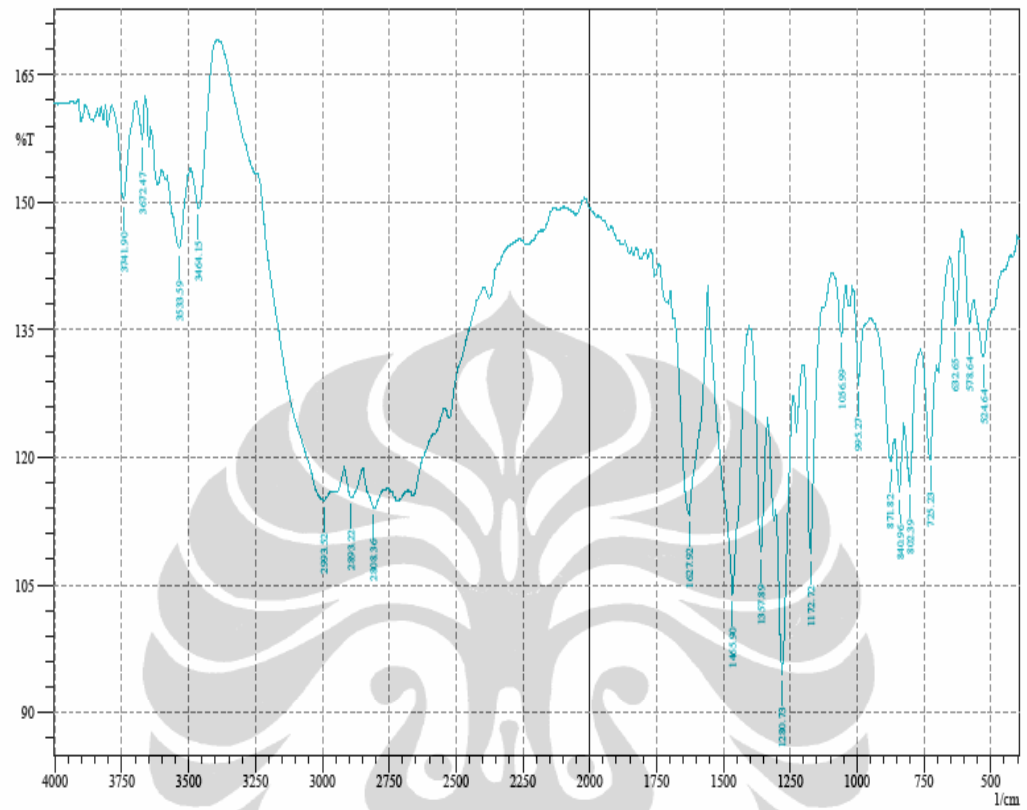


Volume injeksi 20 ul

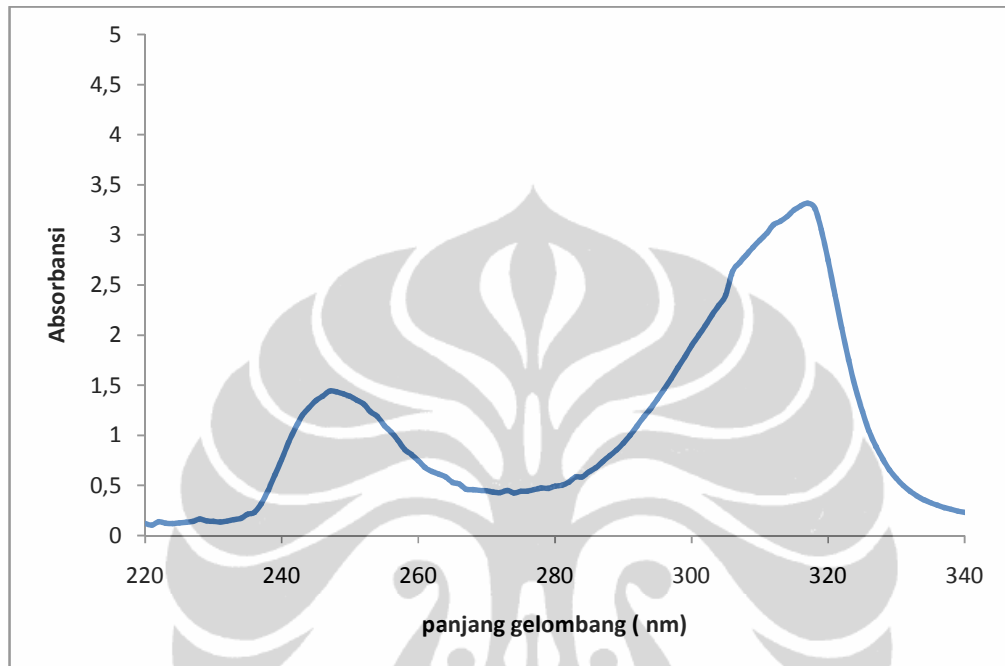
Kecepatan alir 1 ml/min

Eluent methanol+air = 98+2

Lampiran 2. Spektrum FT-IR Senyawa (1)

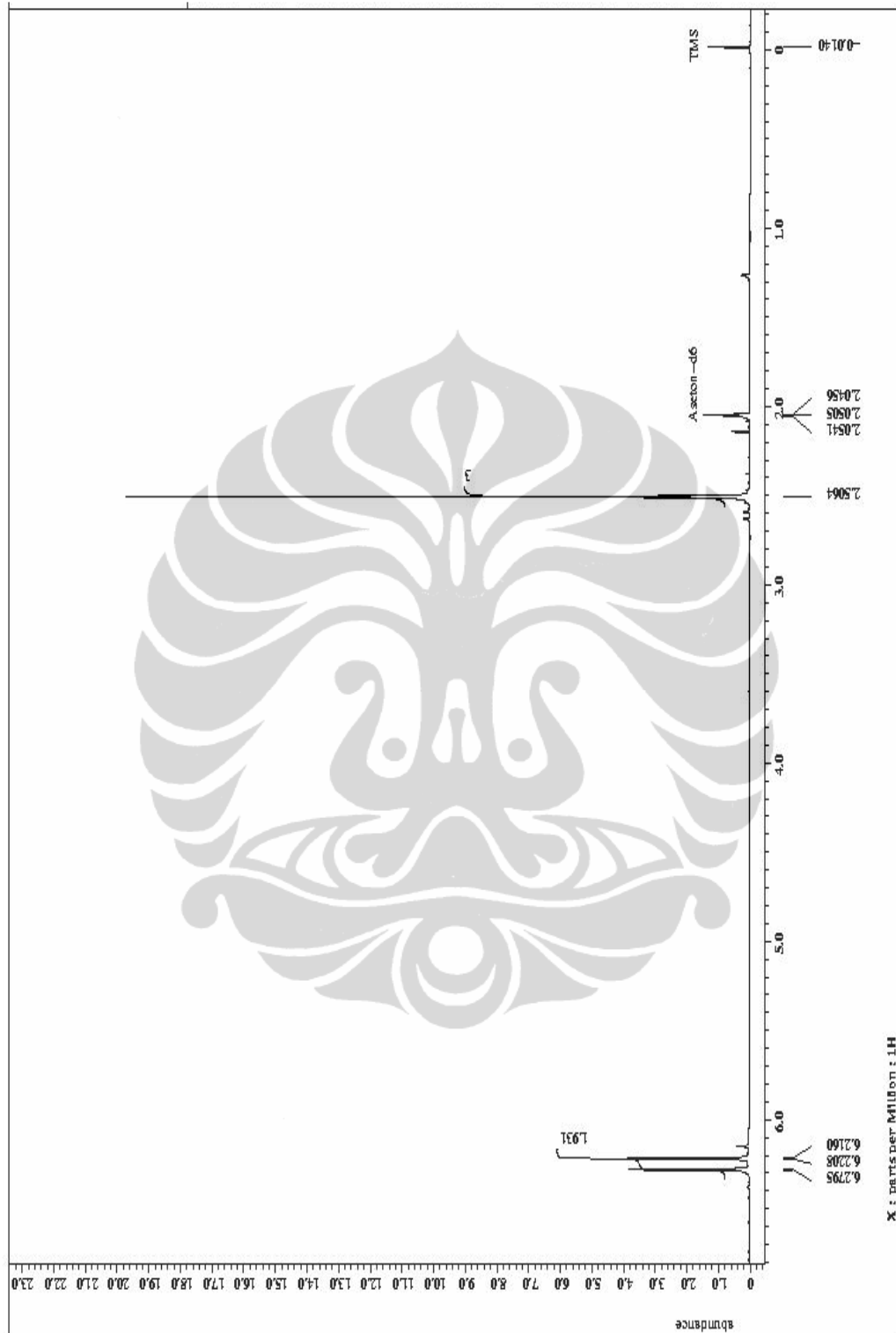


Lampiran 3. Spektrum UV-Vis Senyawa (1)



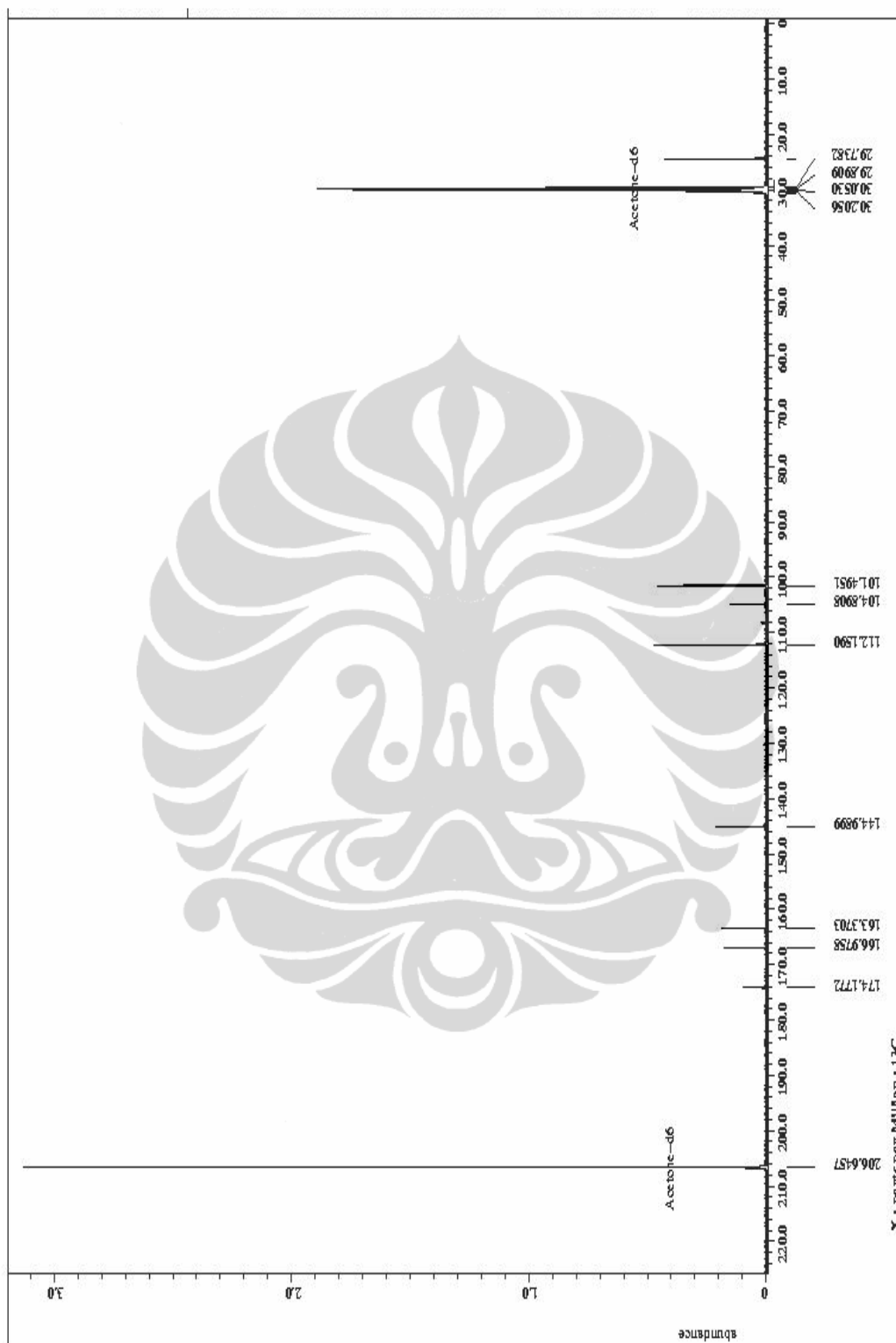
Lampiran 4. Spektrum ^1H NMR Senyawa (1)



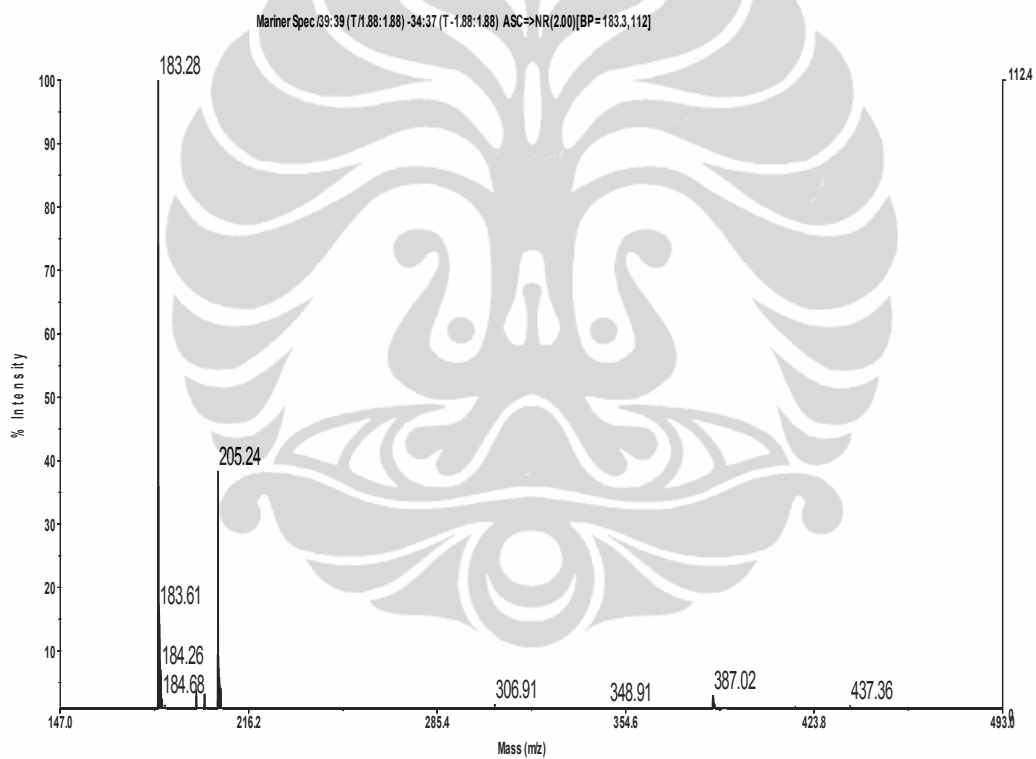
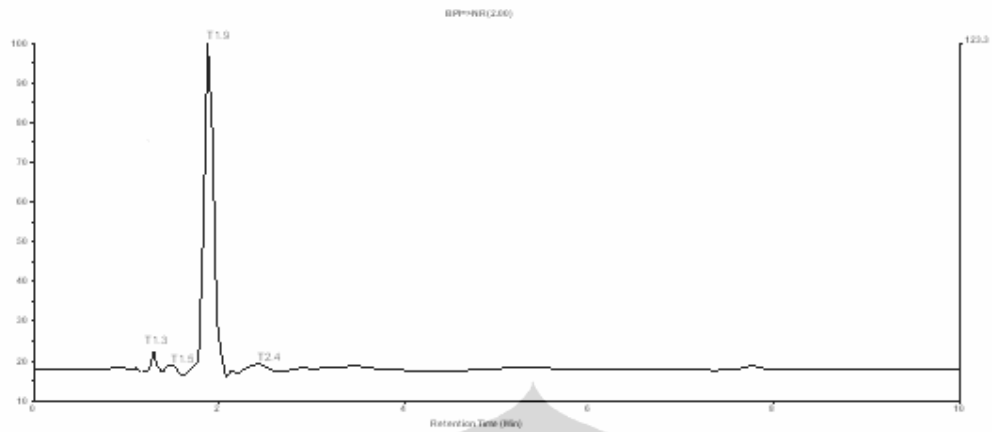


Lampiran 5. Spektrum Senyawa ^{13}C NMR Senyawa (1)





Lampiran 6. Kromatogram LC-MS Senyawa (2)

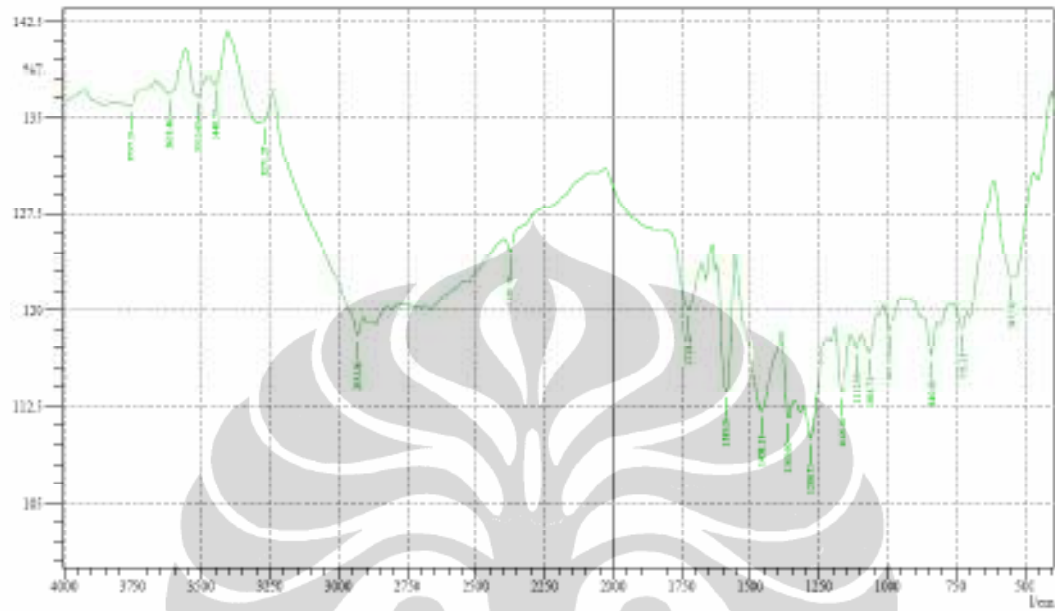


Volume injeksi 20 ul

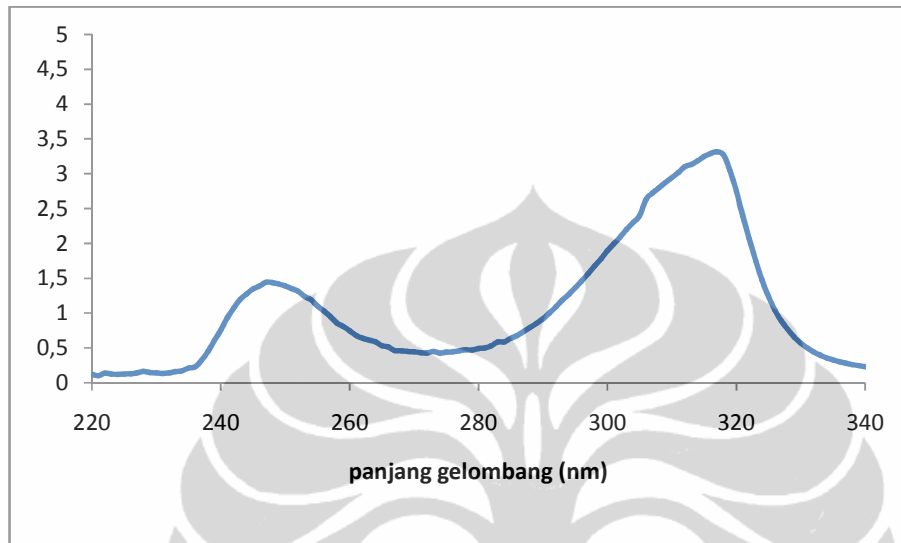
Kecepatan alir 1 ml/min

Eluent methanol+air = 98+2

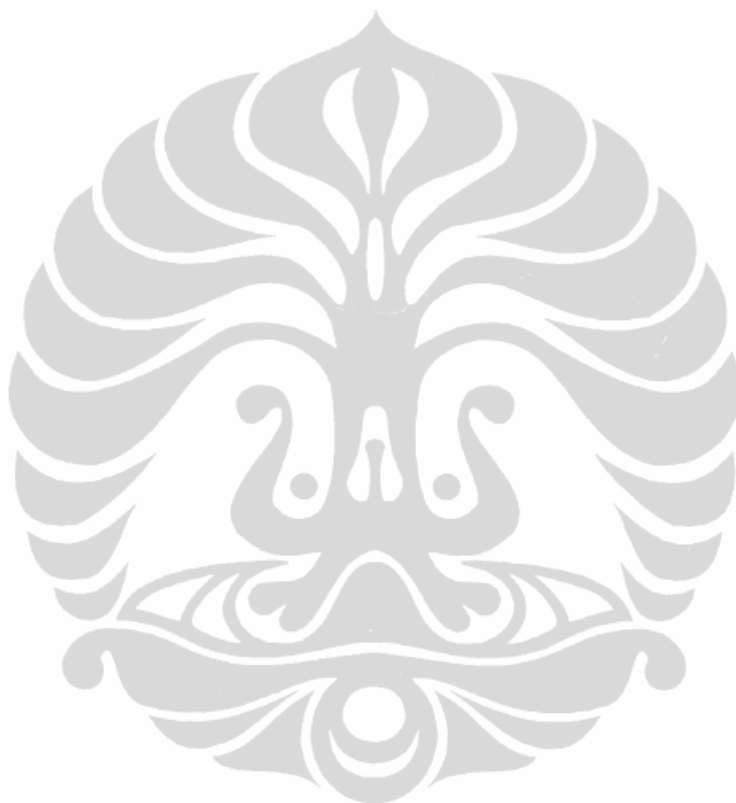
Lampiran 7. Spektrum FT-IR Senyawa (2)

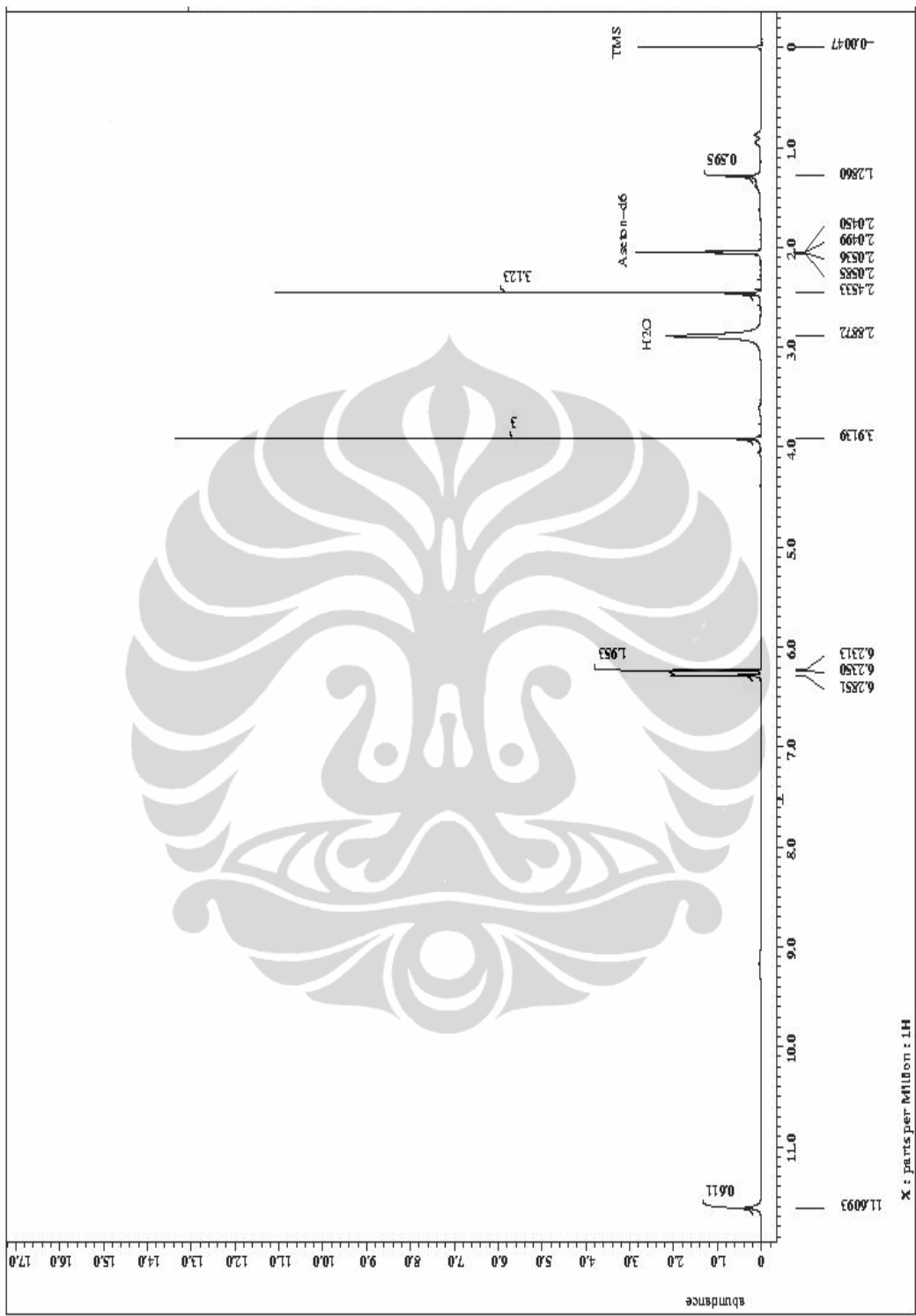


Lampiran 8. Spektrum UV-Vis Senyawa (2)

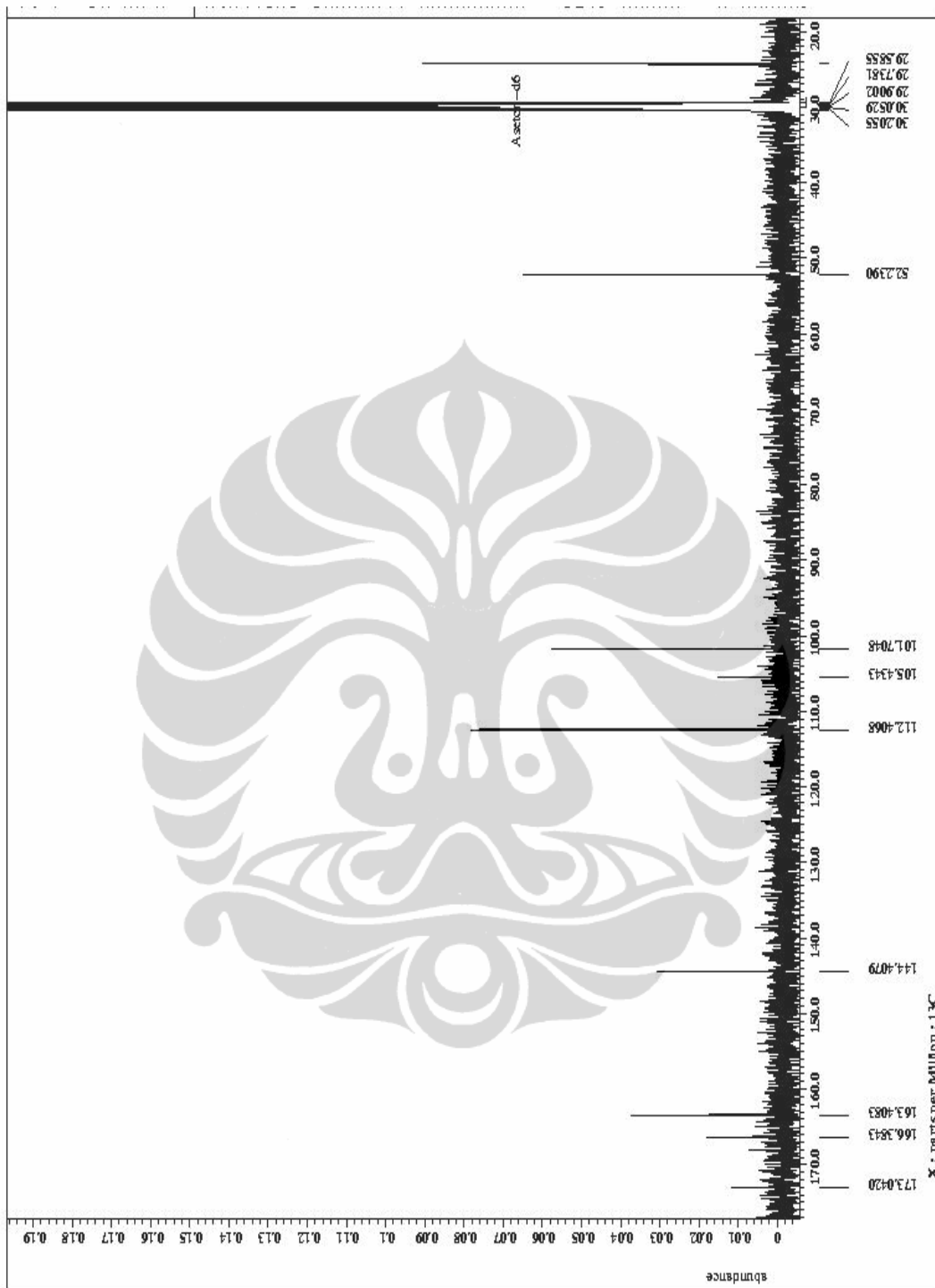


Lampiran 9. Spektrum ^1H NMR Senyawa (2)

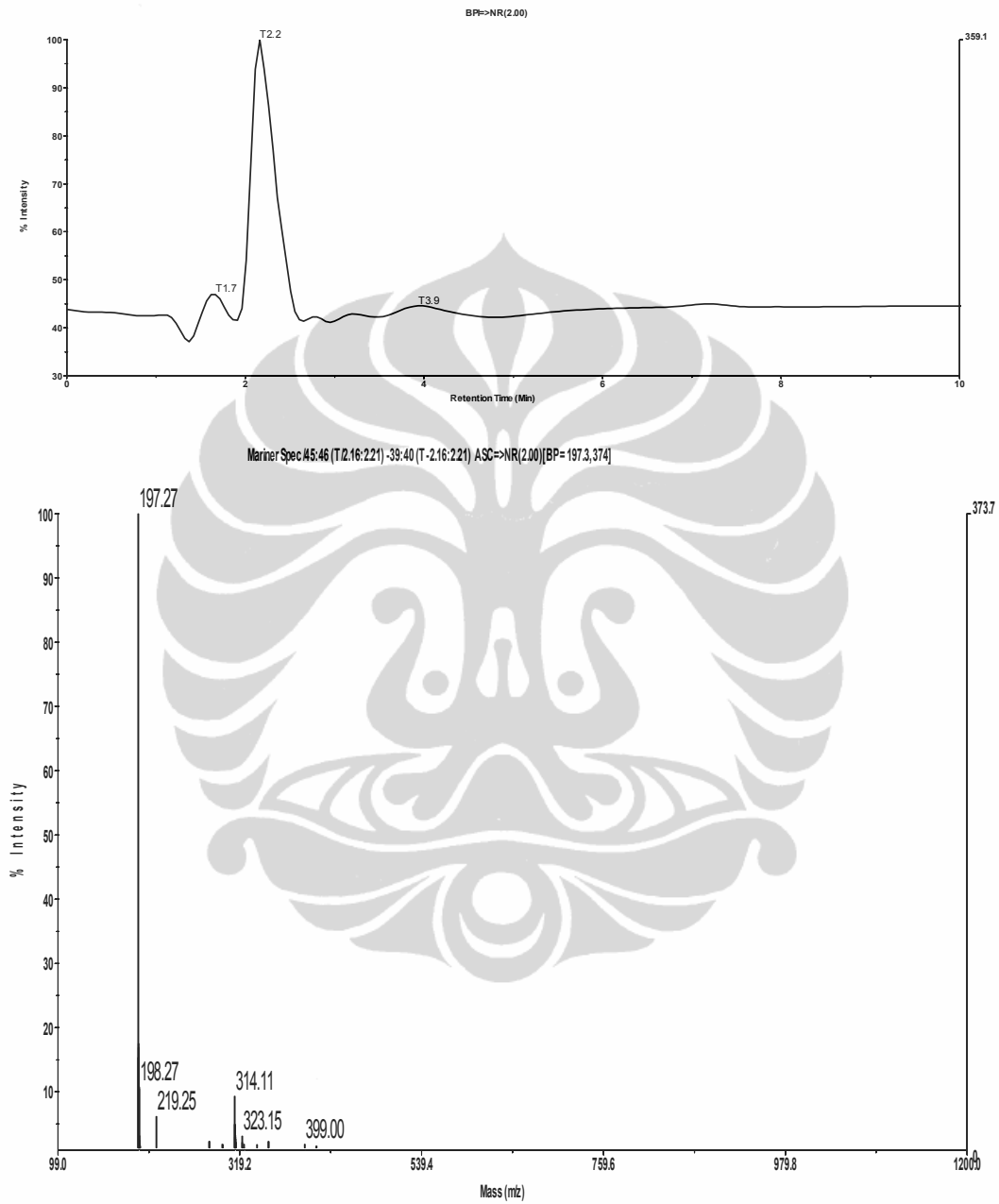




Lampiran 10. Spektrum Senyawa ¹³CNMR Senyawa (2)



Lampiran 11. Kromatogram LC-MS Senyawa (3)



Volume injeksi 20 ul

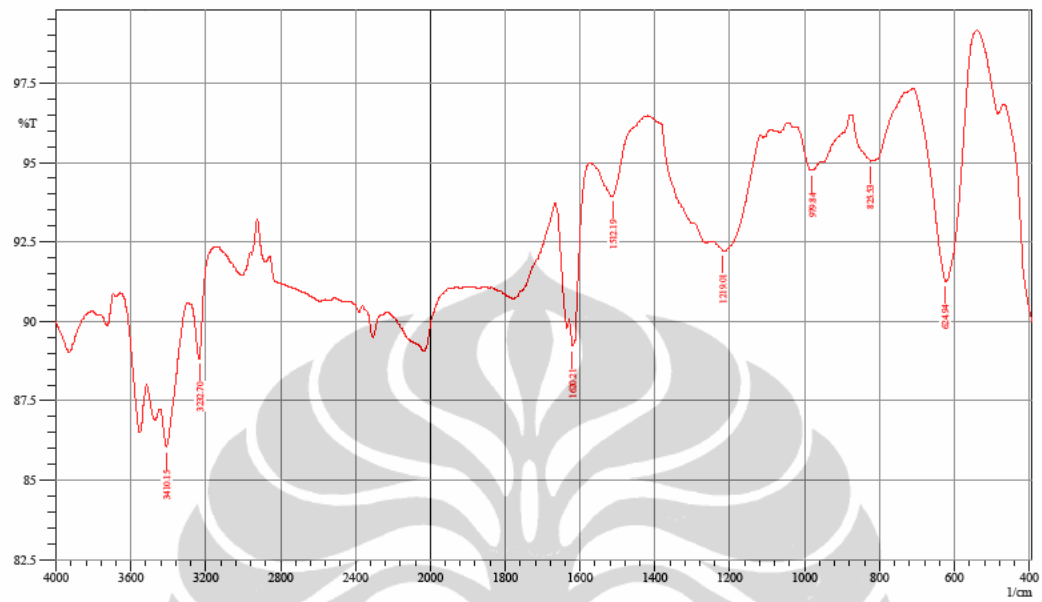
Kecepatan alir 1 ml/min

Eluent metanol+air = 98+2

C

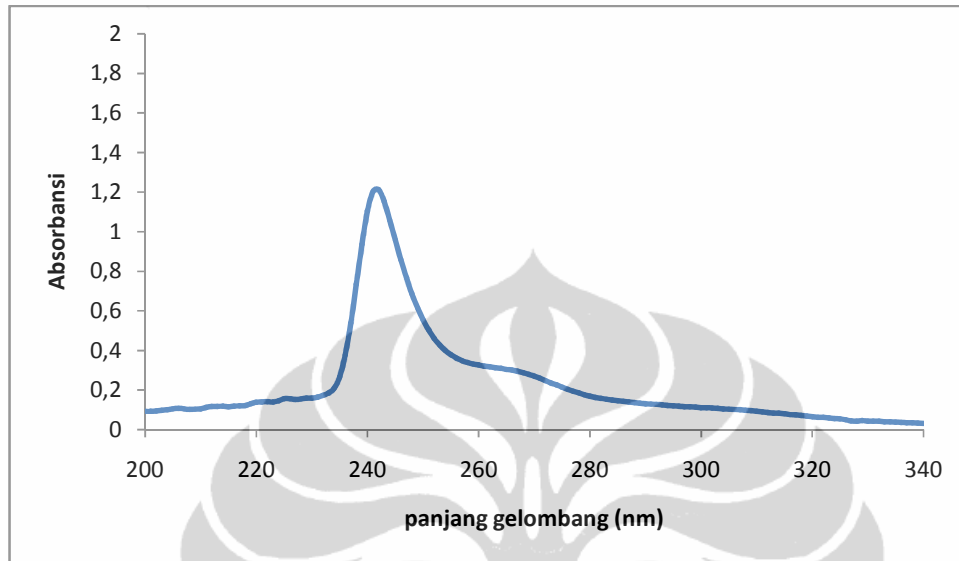
Lampiran 12. Spektrum FT-IR Senyawa (3)

SHIMADZU

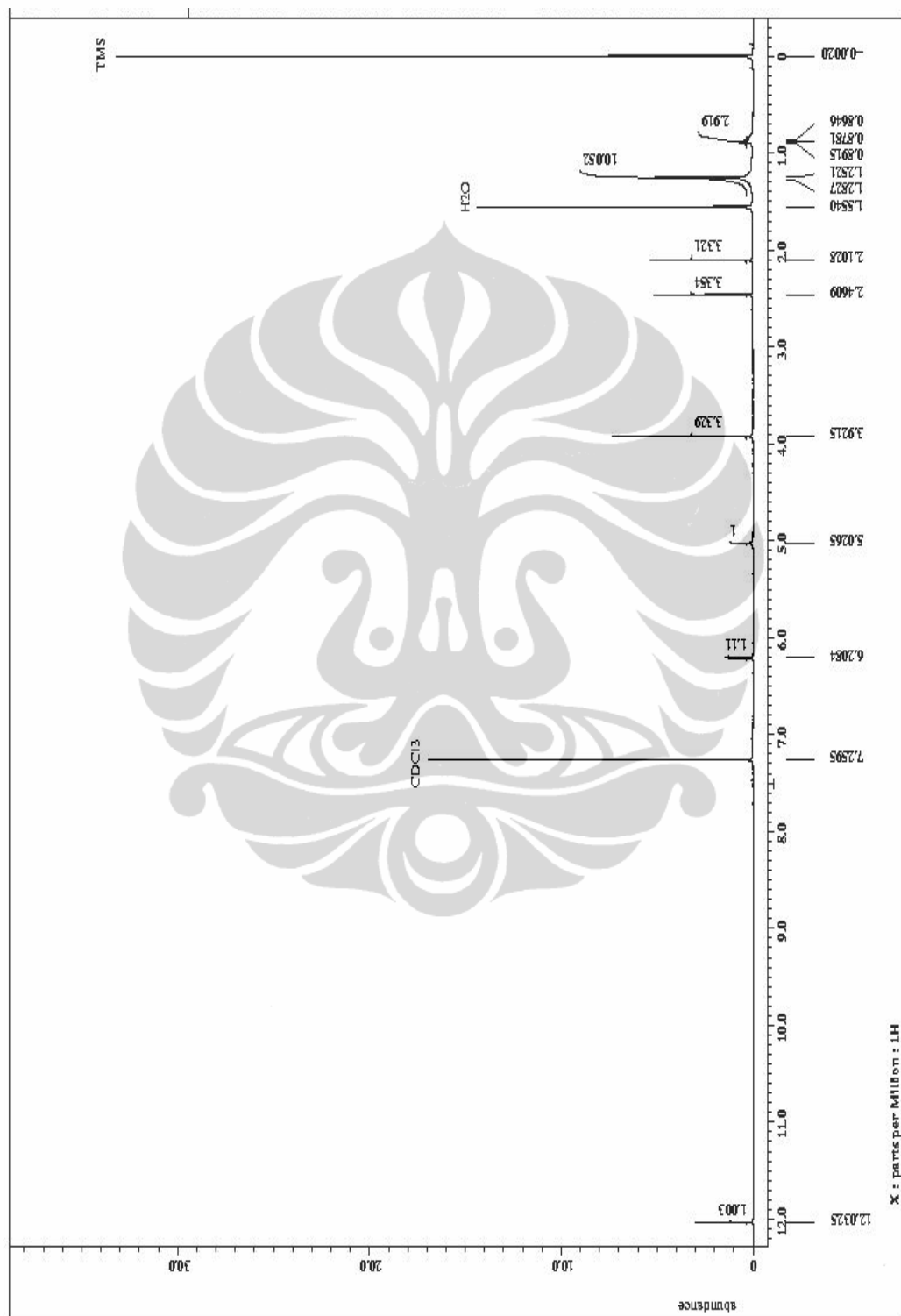


ci

Lampiran 13. Spektrum UV-Vis Senyawa (3)



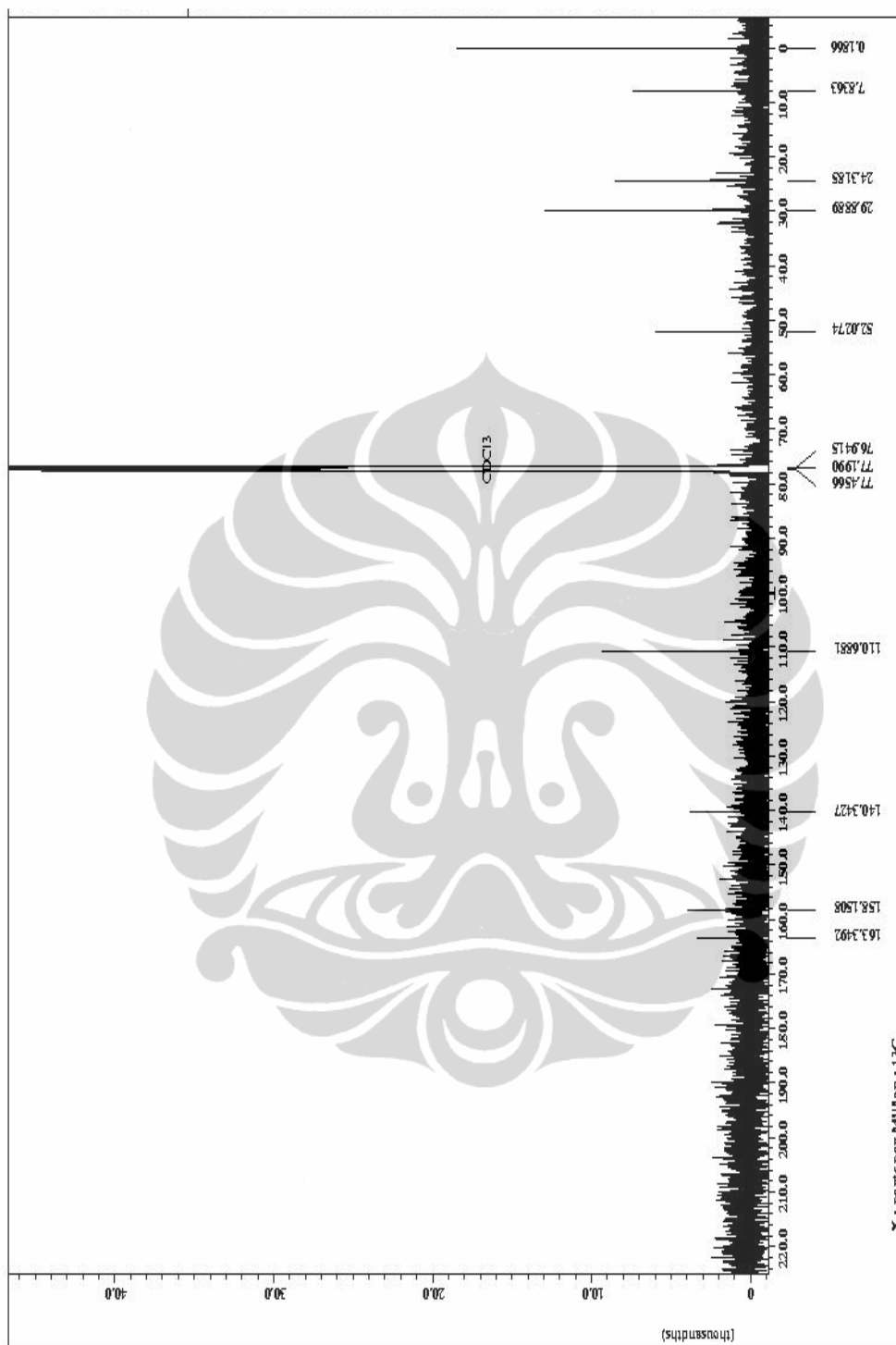
Lampiran 14. Spektrum ^1H NMR Senyawa (3)



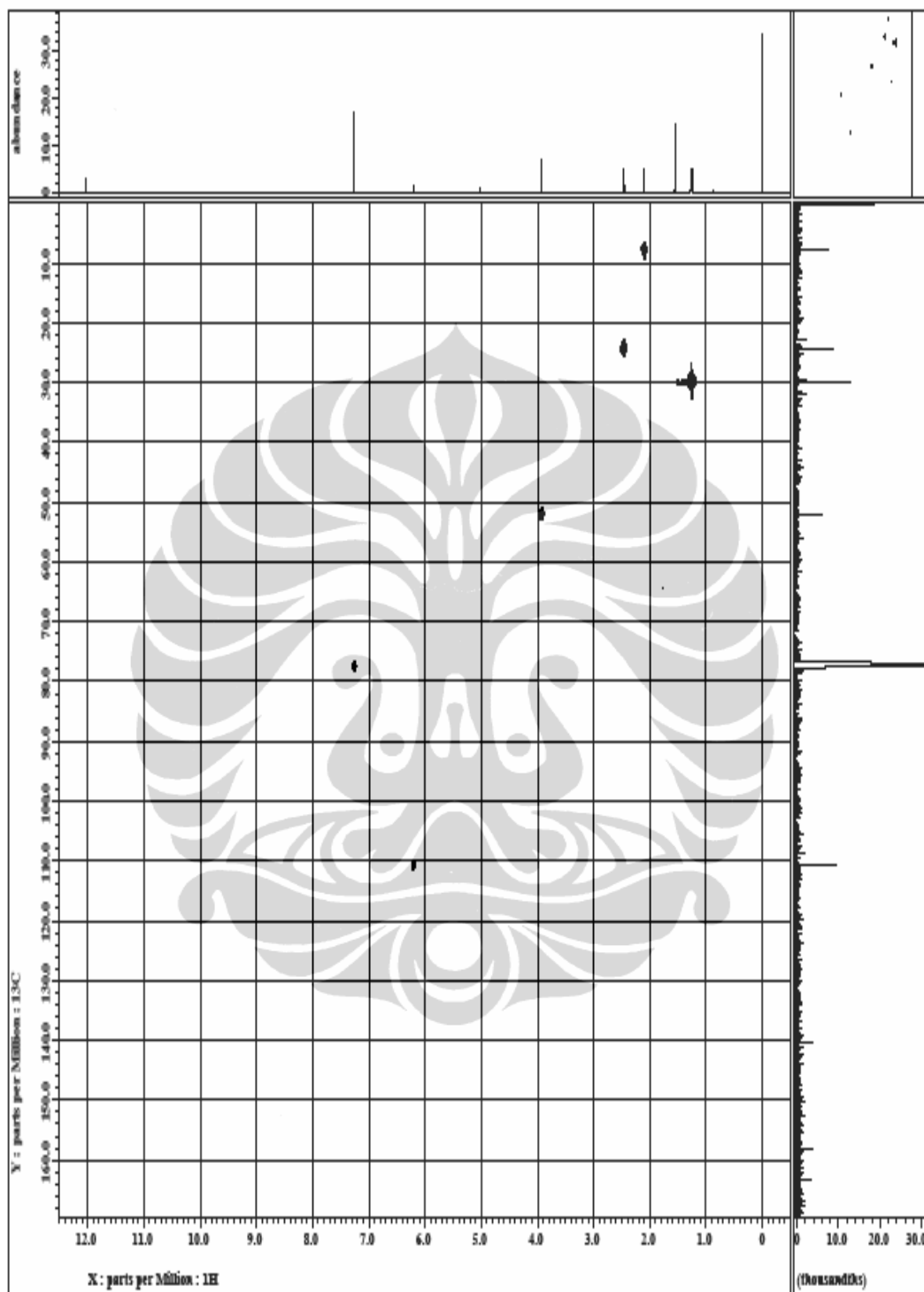
ciii

Lampiran 15. Spektrum Senyawa ^{13}C NMR Senyawa (3)



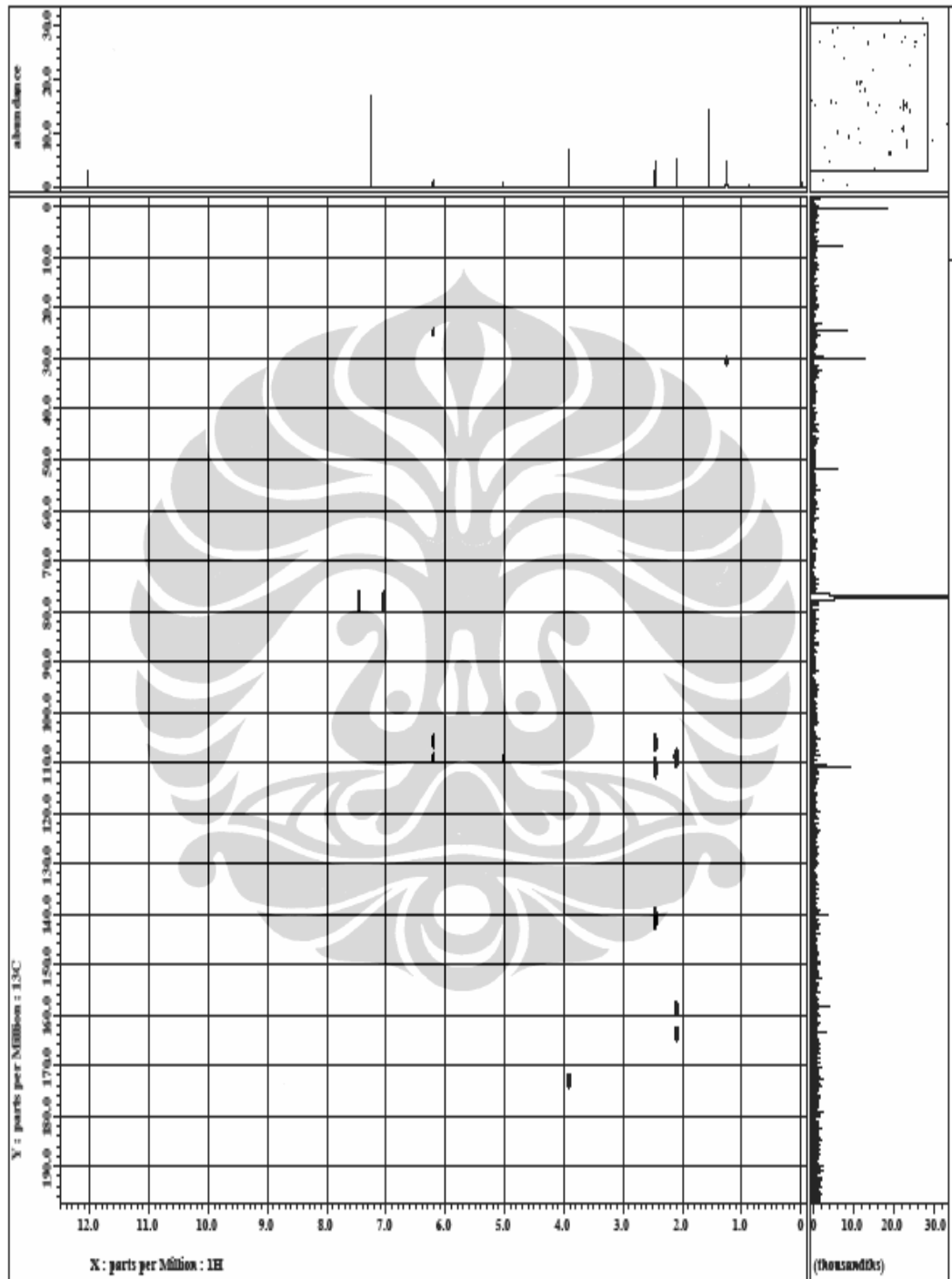


Lampiran 16. Spektrum HMQC Senyawa (3)

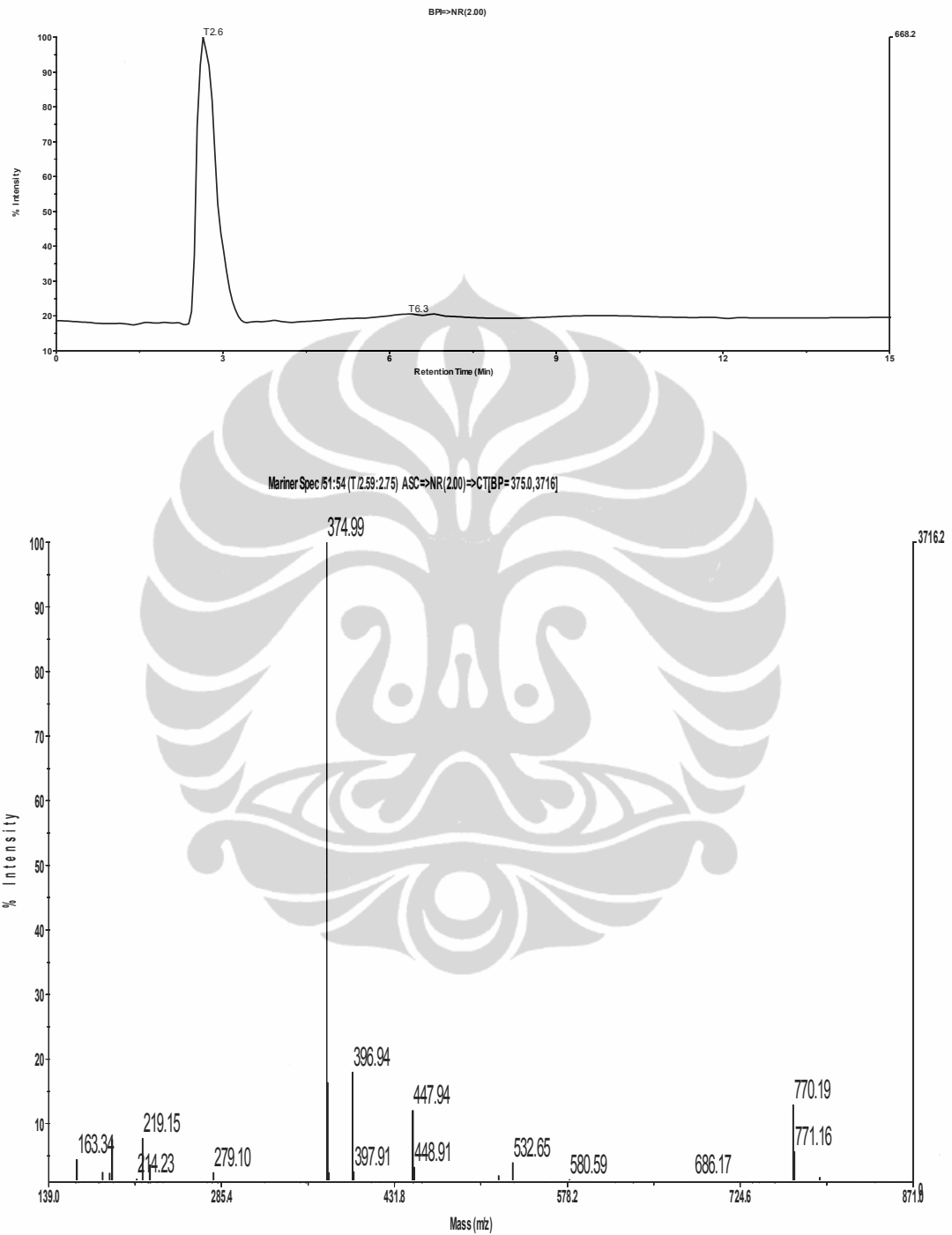


Lampiran 17. Spektrum HMBC Senyawa (3)

cvi



Lampiran 18. Kromatogram LC-MS Senyawa (4)



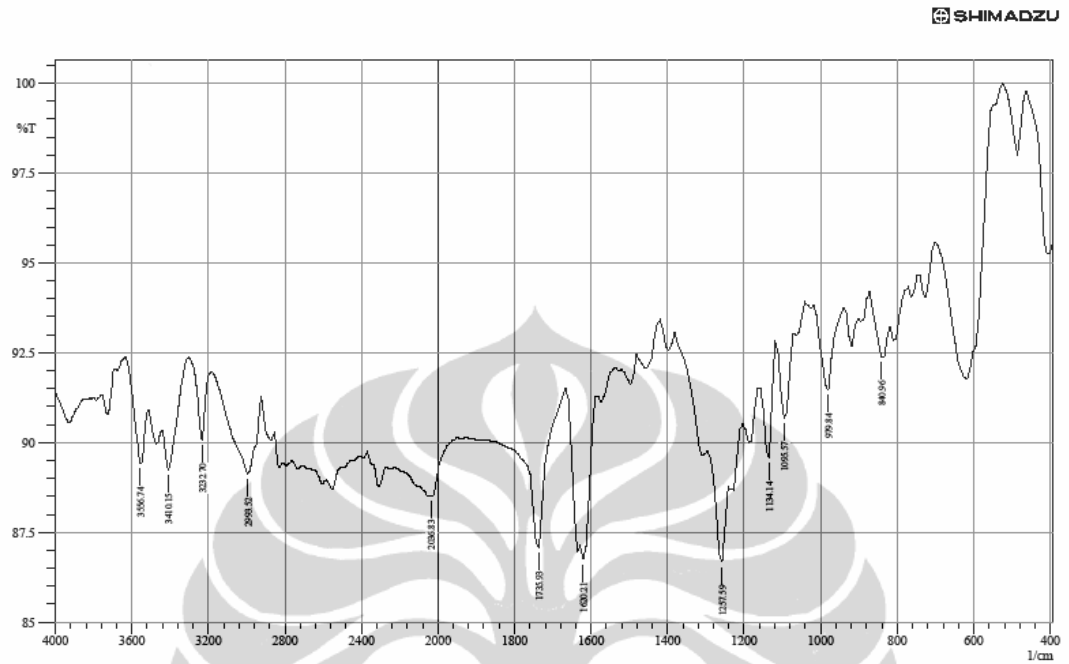
Volume injeksi 20 ul

Kecepatan alir 1 ml/min

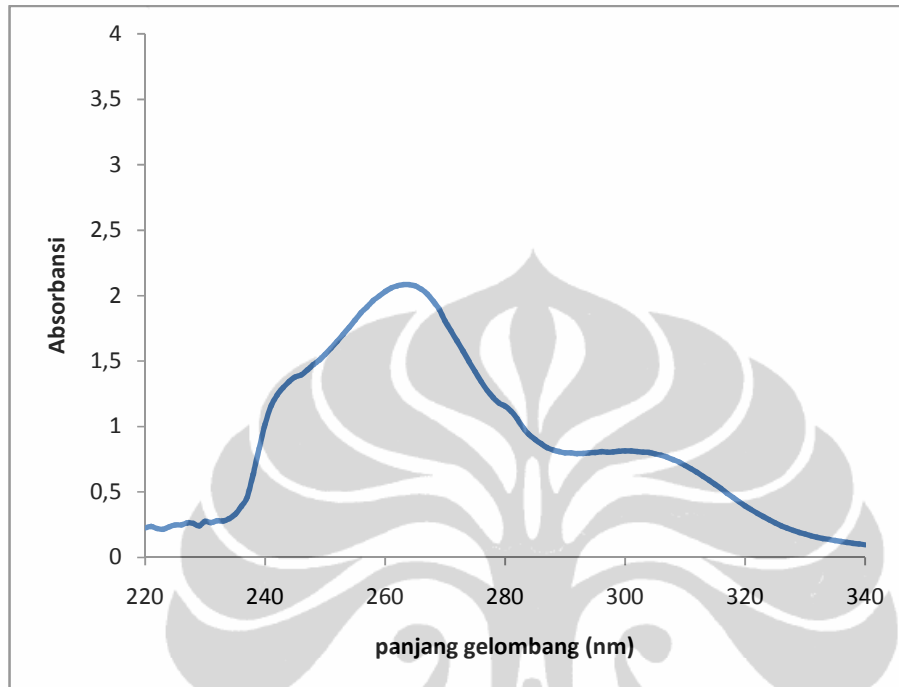
Eluent methanol+air = 98+2

cviii

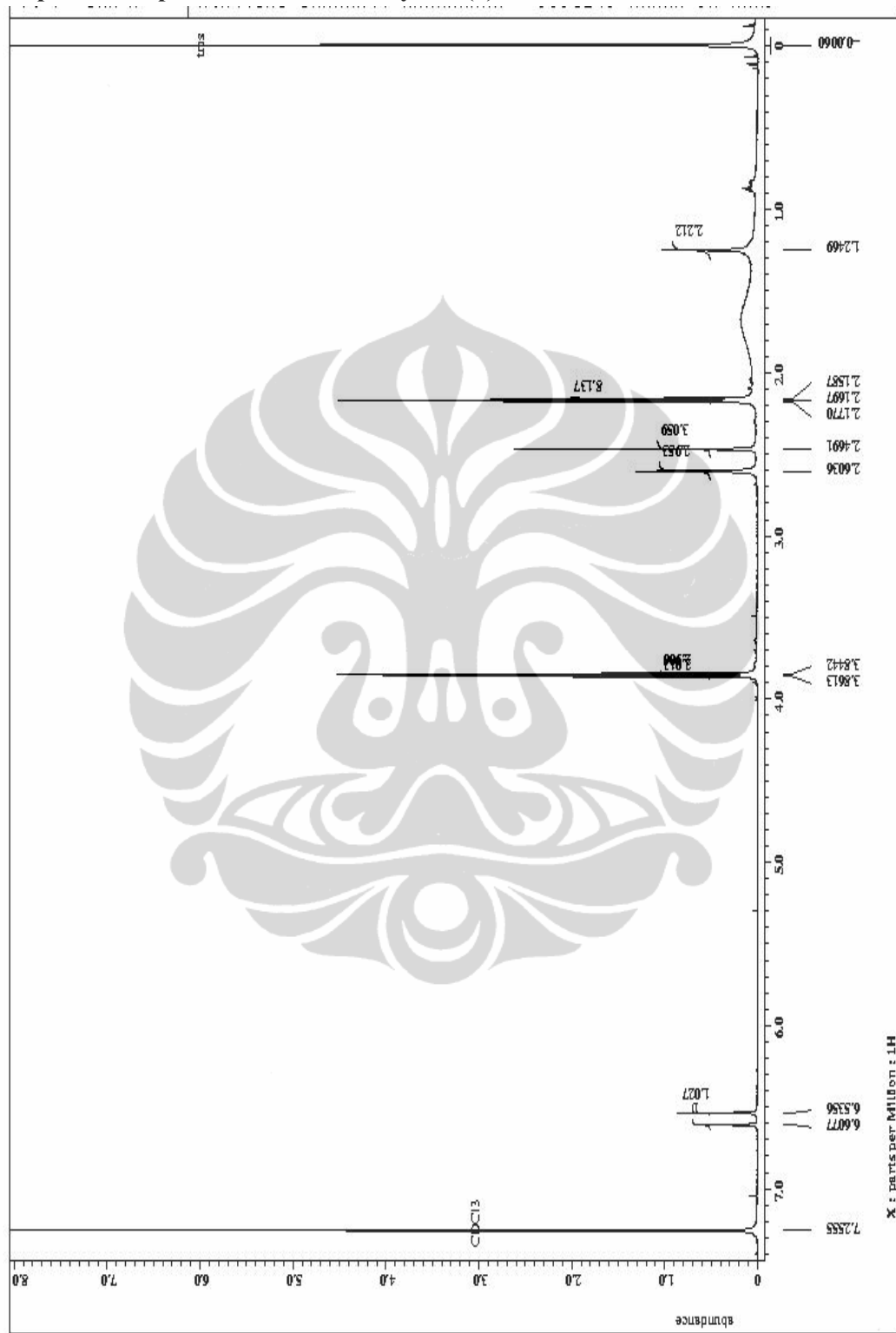
Lampiran 19. Spektrum FT-IR Senyawa (4)



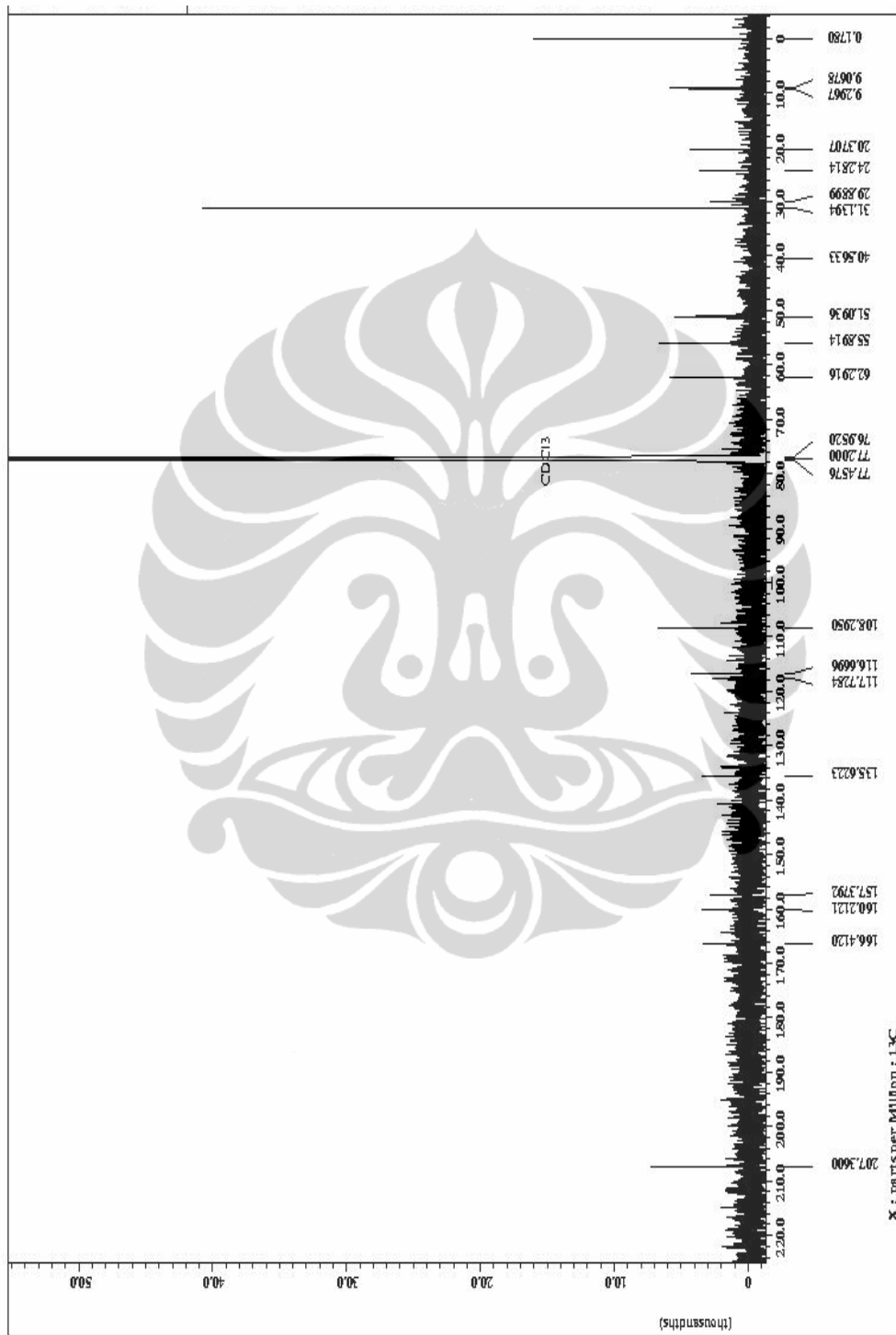
Lampiran 20. Spektrum UV-Vis Senyawa (4)



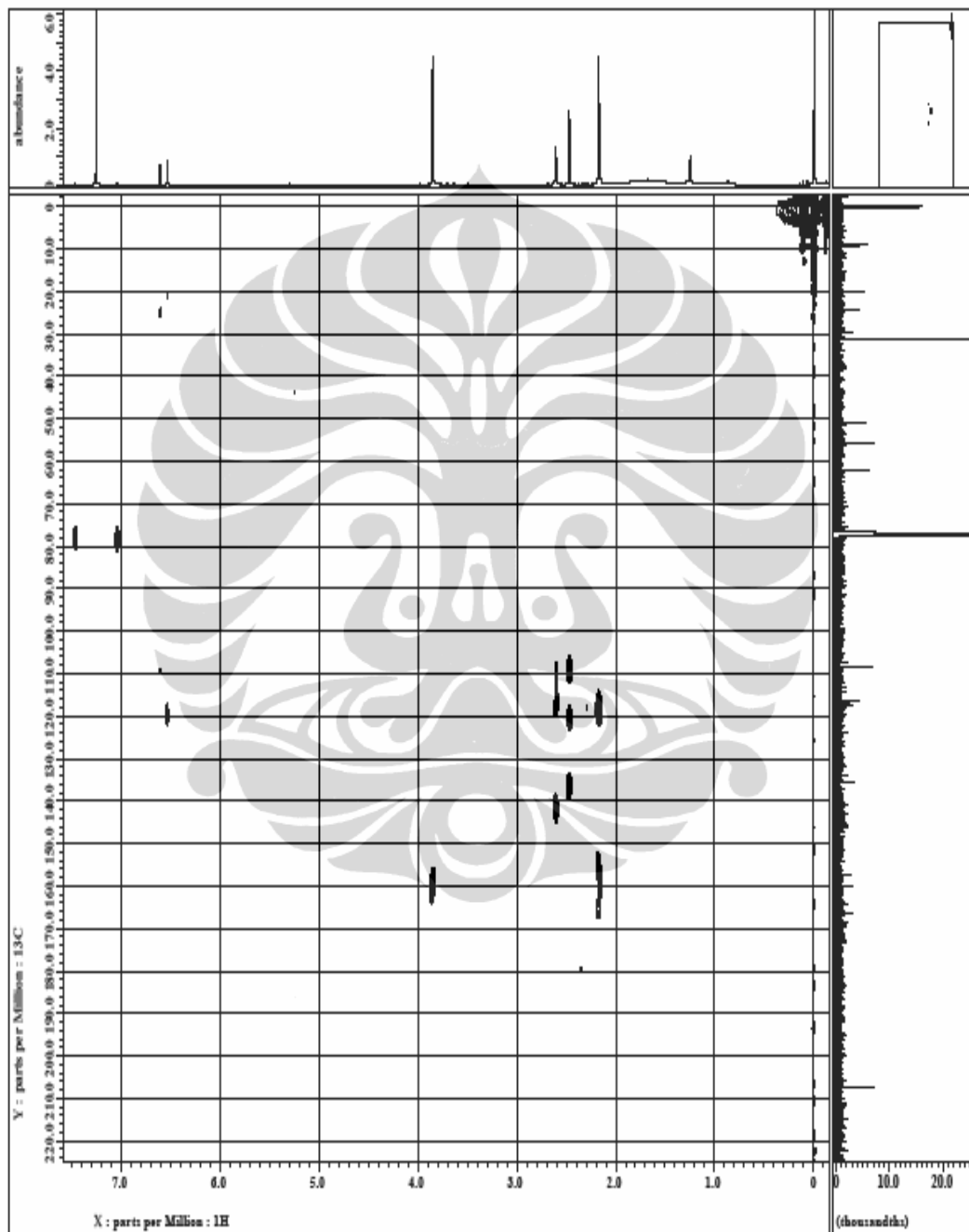
Lampiran 21. Spektrum ^1H NMR Senyawa (4)



Lampiran 22. Spektrum Senyawa ^{13}C NMR Senyawa (4)

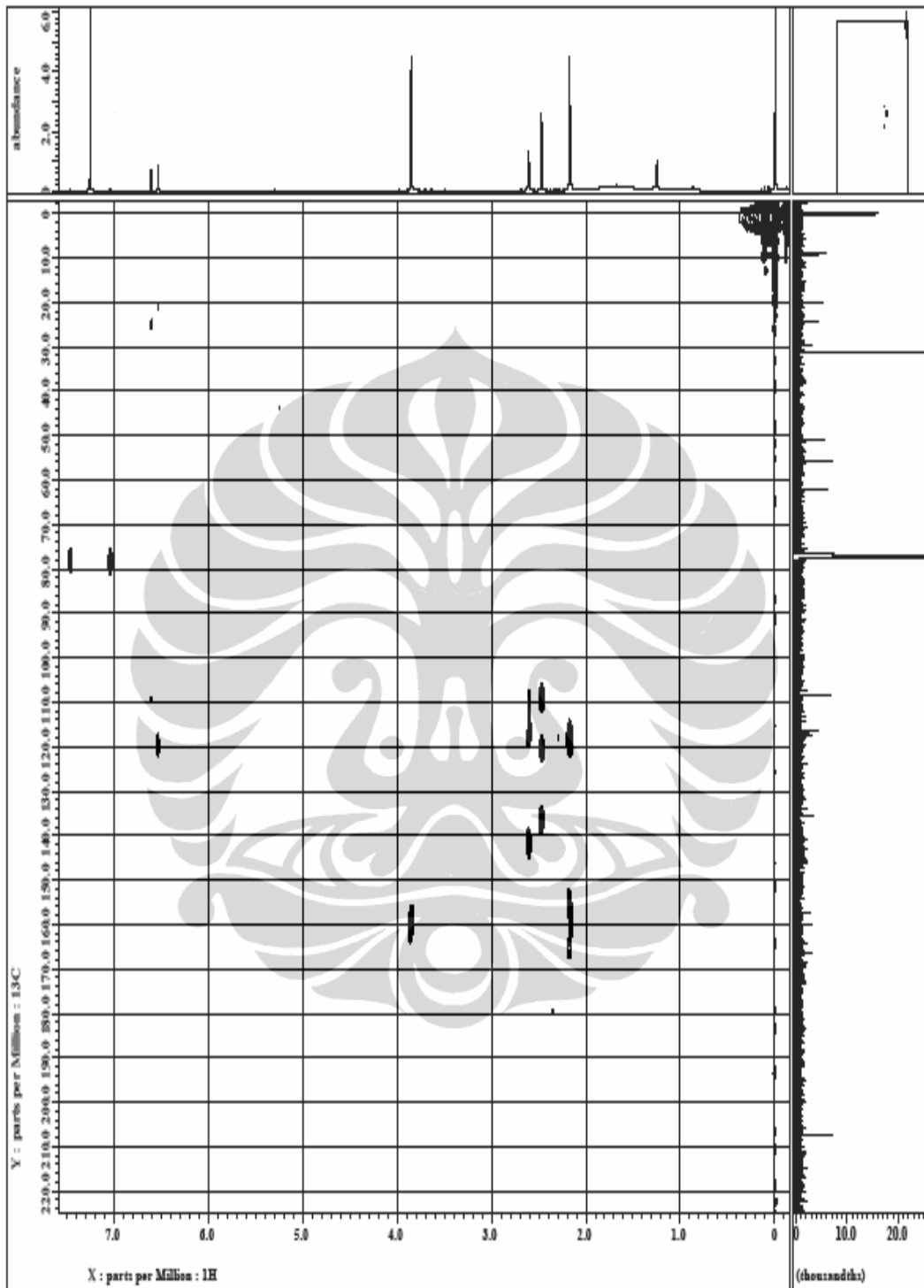


Lampiran 23. Spektrum HMQC Senyawa (4)



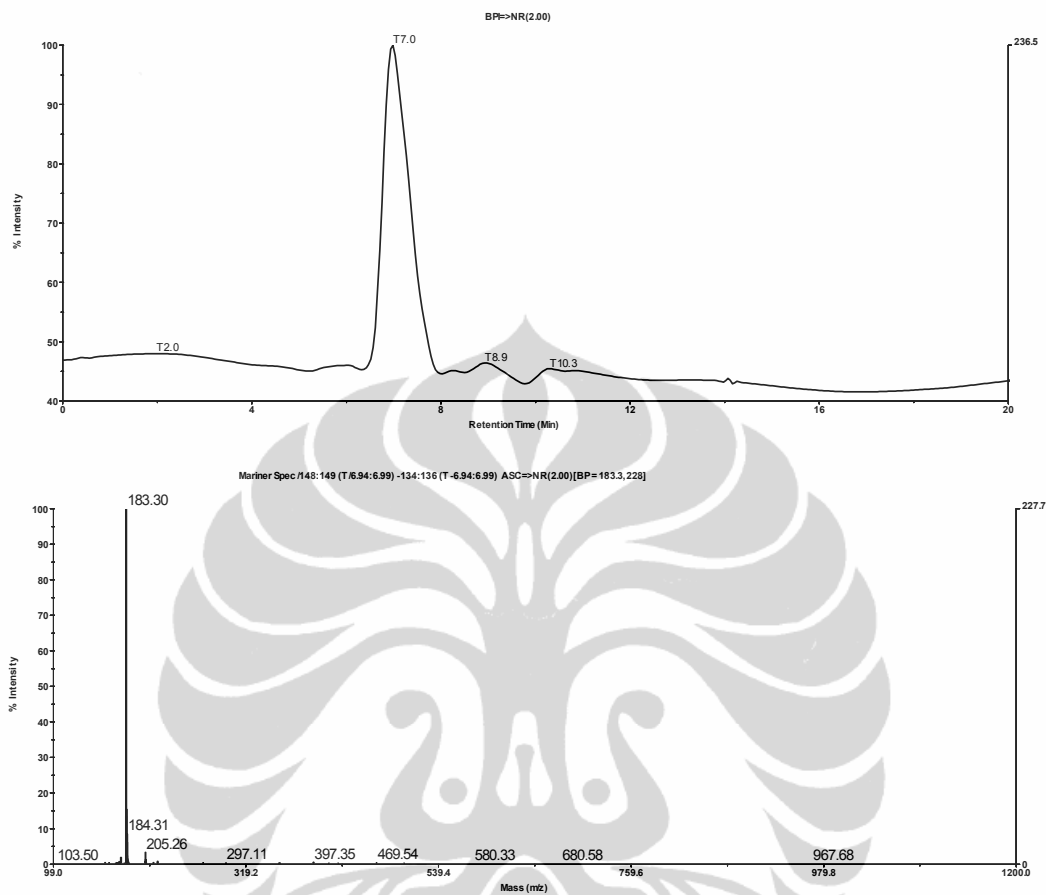
Lampiran 24. Spektrum HMBC Senyawa (4)





Lampiran 25. Kromatogram LC-MS Senyawa (5)

CXV



Volume injeksi 20 ul

Kecepatan alir 1 ml/min

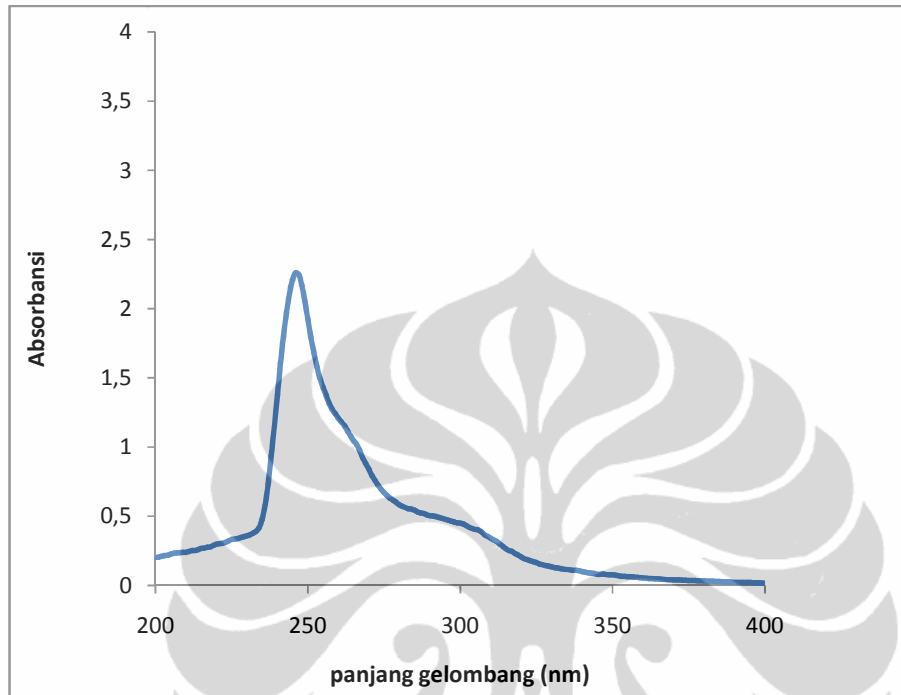
Eluent metanol+air = 90+10

Lampiran 26. Spektrum FT-IR Senyawa (5)

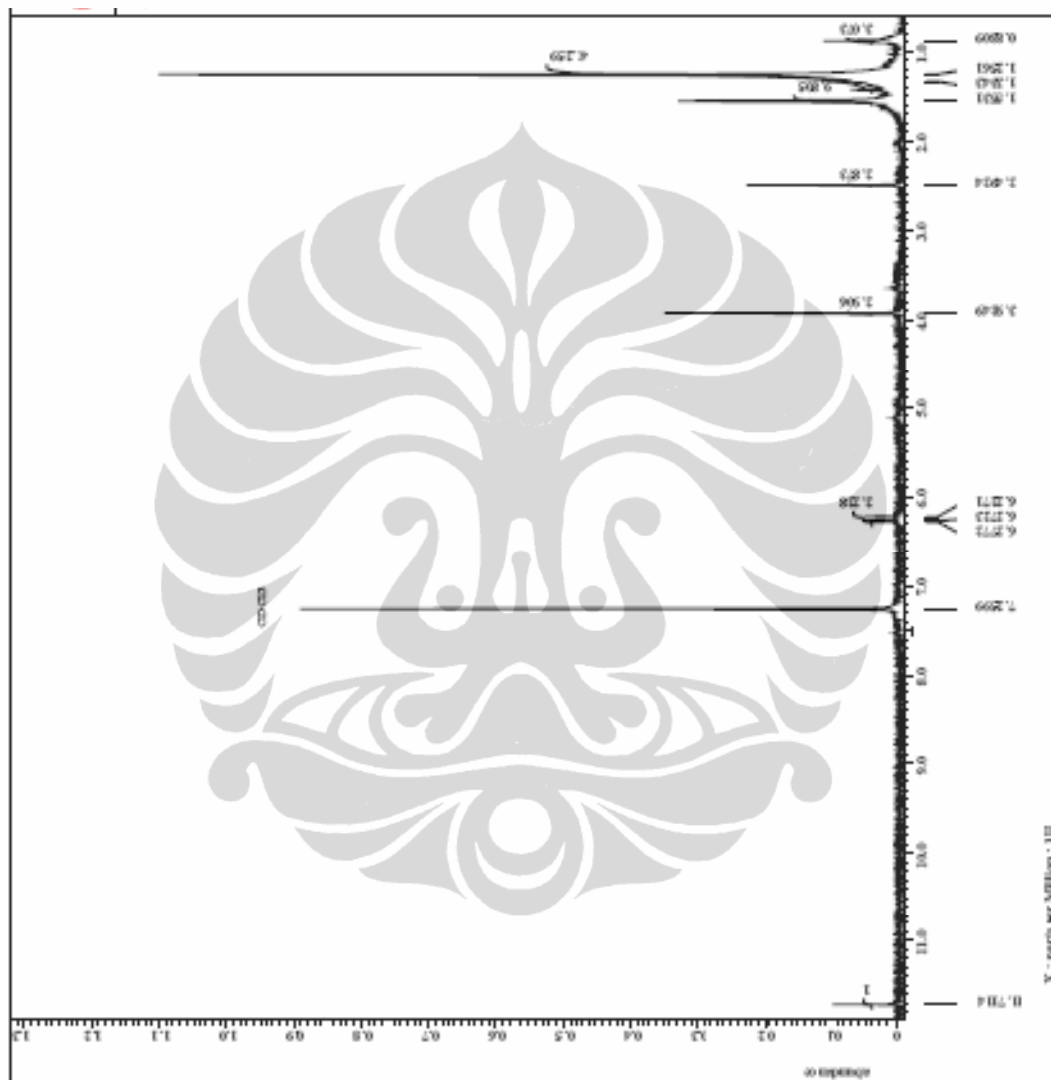
CXVI



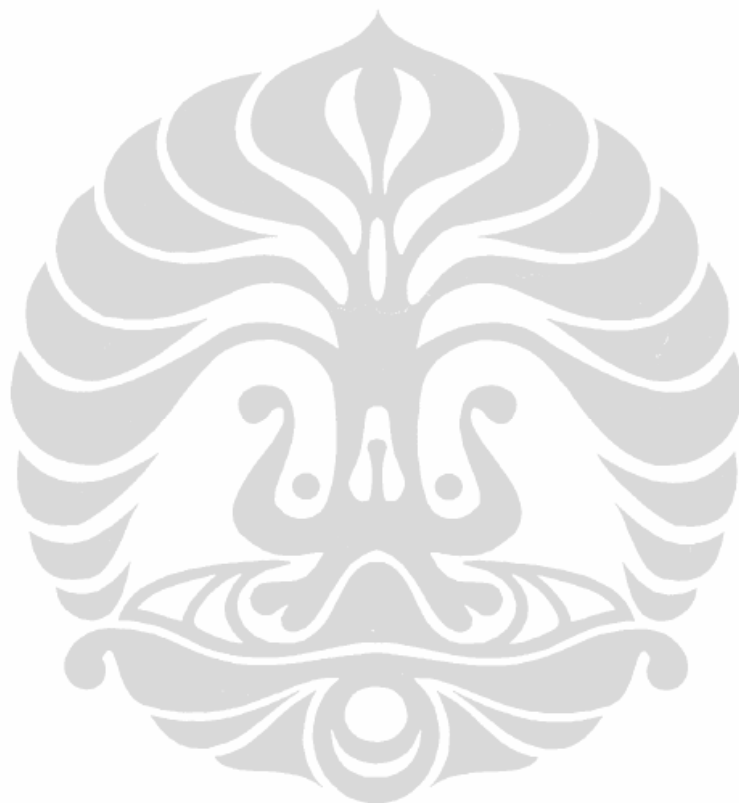
Lampiran 27. Spektrum UV-Vis Senyawa (5)



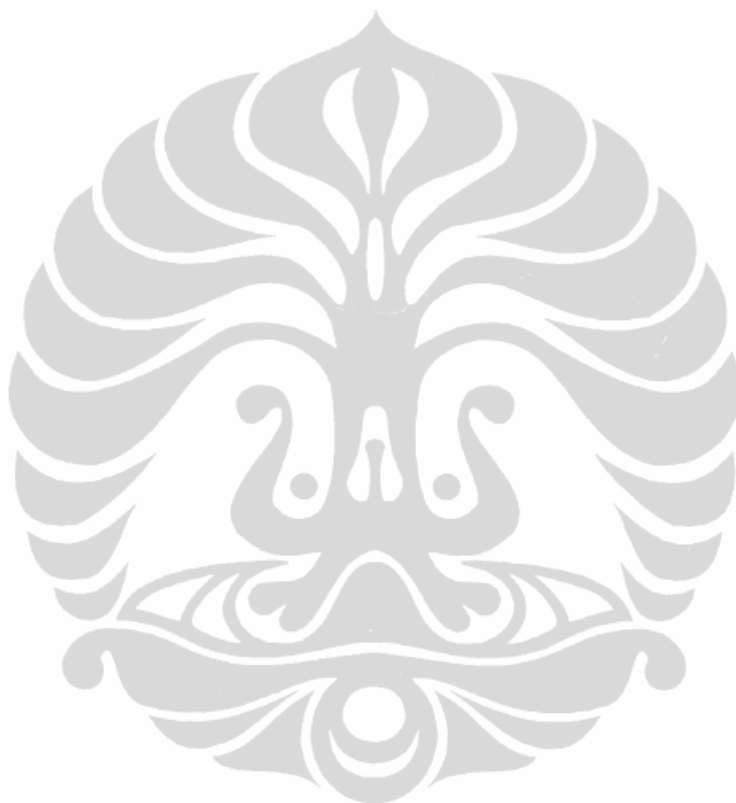
Lampiran 28. Spektrum ^1H NMR Senyawa (5)

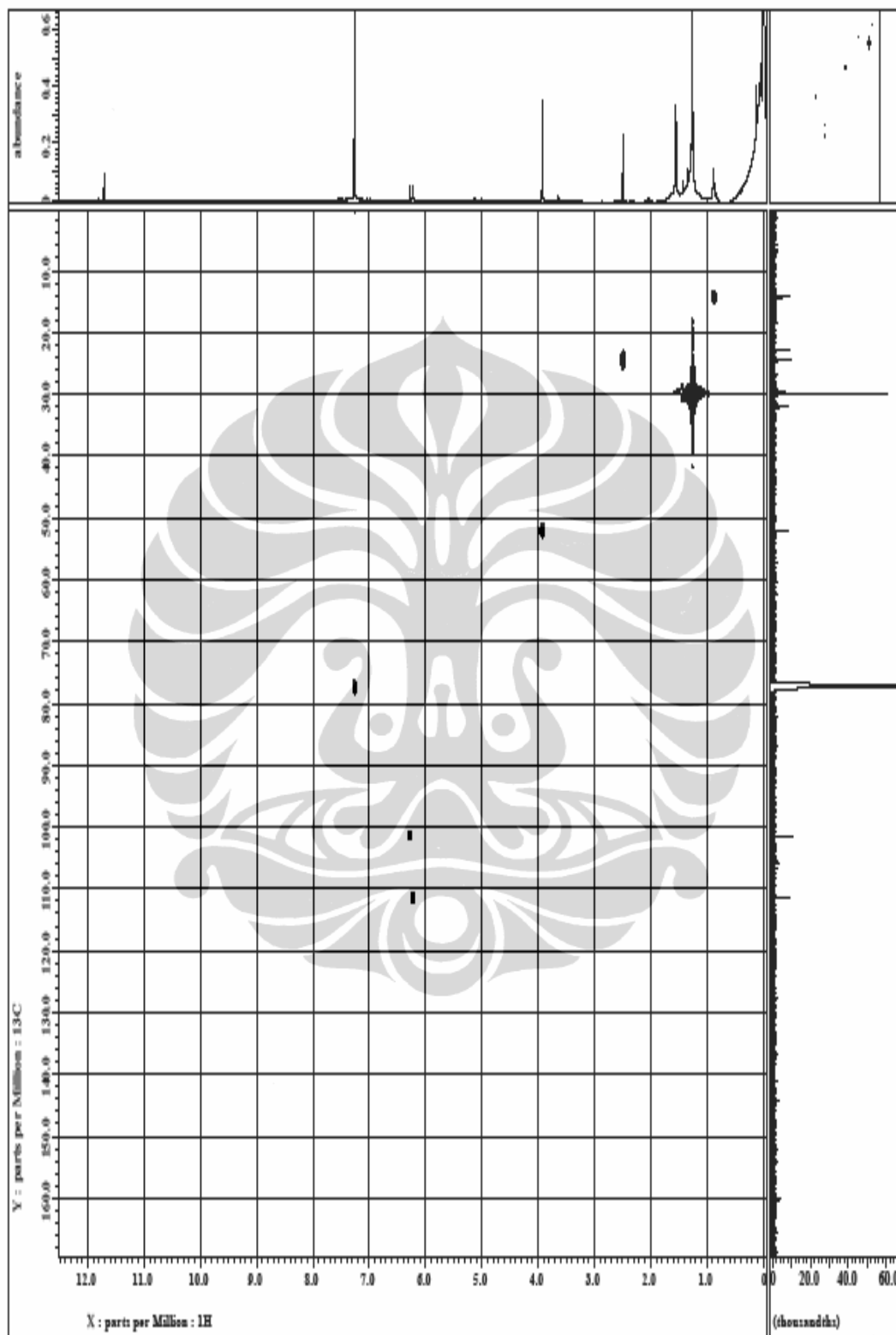


Lampiran 29. Spektrum Senyawa ^{13}C NMR Senyawa (5)



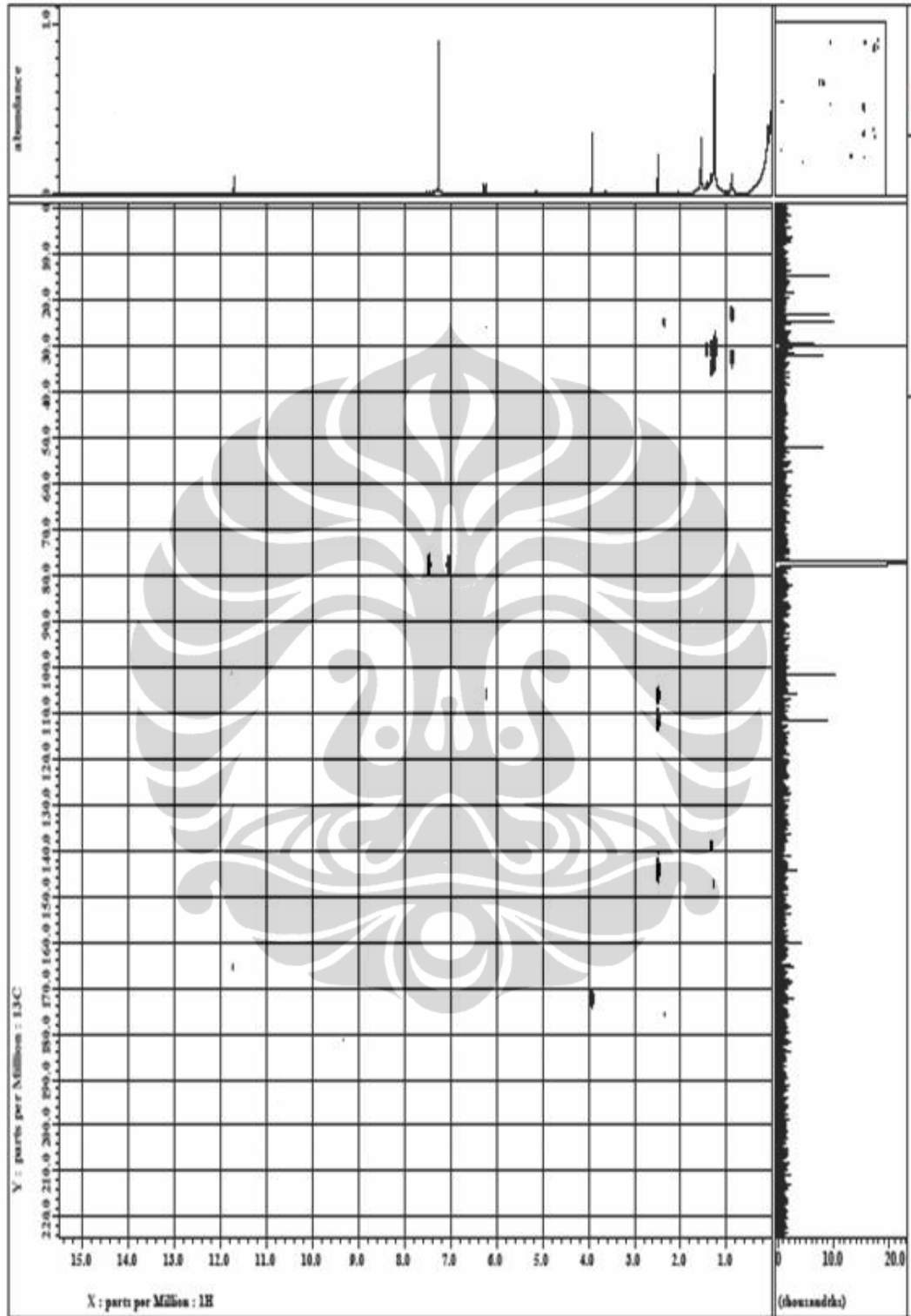
Lampiran 30. Spektrum HMQC Senyawa (5)





Lampiran 31. Spektrum HMBC Senyawa (5)

cxxii



Lampiran 32. Data uji BSLT Ekstrak Talus Lichen *P. Tinctorum*

Konsentrasi sampel (K) ppm	log K	<i>A.salina</i> awal	<i>A.salina</i> hidup	<i>A salina</i> mati	LC-50 mg/L
Ekstrak Heksana P. Tinctorum					
10	1	30	28	2	152.41
100	2	30	23	7	
200	2.4	30	14	16	
500	2.7	30	6	24	
Ekstrak Diklorometana P. Tinctorum					
10	1	30	26	4	57.02
100	2	30	10	20	
200	2.4	30	7	23	
500	2.7	30	0	30	
Ekstrak Etil Asetat P. Tinctorum					
62.5	1.8	30	10	20	28.80
125	2.1	30	7	23	
250	2.4	30	2	28	
500	2.7	30	0	30	
1000	3	30	0	30	
Ekstrak Aseton P. Tinctorum					
62.5	1.8	30	8	22	17.70
125	2.1	30	6	24	
250	2.4	30	2	28	
500	2.7	30	0	30	
1000	3	30	0	30	

Lampiran 34. Data uji BSLT Ekstrak Talus Lichen *H. osseoalba*

Konsentrasi sampel (K) ppm	log K	<i>A.salina</i> awal	<i>A.salina</i> hidup	<i>A salina</i> mati	LC-50 mg/L
Ekstrak Heksana <i>H. osseoalba</i>					
62.5	1.8	30	15	15	128.80
125	2.1	30	11	19	
250	2.4	30	9	21	
500	2.7	30	6	24	
1000	3	30	5	25	
Ekstrak Diklorometana <i>H. osseoalba</i>					
62.5	1.8	30	15	15	91.20
125	2.1	30	12	18	
250	2.4	30	6	24	
500	2.7	30	2	28	
1000	3	30	0	30	
Ekstrak Etil Asetat <i>H. osseoalba</i>					
62.5	1.8	30	7	23	11.70
125	2.1	30	5	25	
250	2.4	30	2	28	
500	2.7	30	0	30	
1000	3	30	0	30	
Ekstrak Aseton <i>H. osseoalba</i>					
62.5	1.8	30	9	21	6.68
125	2.1	30	7	23	
250	2.4	30	4	26	
500	2.7	30	1	29	
1000	3	30	0	30	

Lampiran 35. Hasil Uji Aktivitas Anti Oksidan Senyawa Hasil Isolasi

Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa (1)

Konsentrasi sampel	Absorbansi pada menit ke					
	0	5	10	15	20	25
45,5	0,618	0,588	0,558	0,528	0,498	0,438
91	0,598	0,558	0,52	0,482	0,444	0,406
136	0,507	0,481	0,455	0,429	0,403	0,377
182	0,485	0,448	0,411	0,374	0,337	0,3
227	0,446	0,406	0,372	0,332	0,29	0,248

Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa (2)

Konsentrasi sampel	Absorbansi pada menit ke					
	0	5	10	15	20	25
45,5	0,657	0,62	0,59	0,467	0,417	0,472
91	0,59	0,57	0,55	0,546	0,502	0,472
136	0,467	0,441	0,415	0,389	0,363	0,337
182	0,417	0,365	0,318	0,263	0,215	0,165
227	0,274	0,242	0,215	0,185	0,152	0,136

Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa (3)

Konsentrasi sampel	Absorbansi pada menit ke					
	0	5	10	15	20	25
45,5	0.677	0.71	0.68	0.567	0.496	0.589
91	0.54	0.66	0.59	0.586	0.541	0.488
136	0.487	0.74	0.455	0.458	0.602	0.327
182	0.437	0.601	0.338	0.283	0.235	0.196
227	0.294	0.525	0.255	0.403	0.316	0.172

Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa (4)

Konsentrasi sampel	Absorbansi pada menit ke					
	0	5	10	15	20	25
45,5	0.718	0.7	0.65	0.537	0.466	0.62
91	0.55	0.66	0.62	0.617	0.552	0.486
136	0.527	0.521	0.475	0.458	0.413	0.347
182	0.478	0.445	0.378	0.333	0.266	0.173
227	0.334	0.322	0.276	0.255	0.202	0.146

Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa (5)

Konsentrasi sampel	Absorbansi pada menit ke					
	0	5	10	15	20	25
45,5	0.697	0.73	0.7	0.587	0.516	0.609
91	0.49	0.56	0.54	0.51	0.502	0.498
136	0.577	0.574	0.525	0.508	0.463	0.312
182	0.528	0.365	0.318	0.268	0.215	0.234
227	0.384	0.232	0.215	0.185	0.152	0.196

