



ISOLASI 24-ETIL-5-KOLESTEN-3 β -OL DARI DAGING BUAH JERUK KESTURI (*Citrus mitis Blanco*)

Fauzan

Akademi Kesehatan John Paul II Pekanbaru

Email: fauzanocu@gmail.com

ABSTRAK

Pada pemeriksaan pendahuluan diketahui bahwa ekstrak sari buah jeruk kesturi (*Citrus mitis Blanco*) mengandung steroid. Atas dasar pertimbangan ini maka dicoba mengisolasi dan mengkarakterisasi jenis dan struktur steroid dari sari buah jeruk tersebut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang jenis steroid yang terdapat dalam sari buah jeruk kesturi serta melengkapi data tentang kandungan kimia jeruk kesturi (*Citrus mitis Blanco*). Ekstraksi dan maserasi menggunakan pelarut etil asetat yang diikuti trituras dengan pelarut heksana. Fraksi positif terhadap uji steroid dengan kandungan yang relatif tinggi adalah fraksi heksana. Komponen-komponen kimia steroid kasar dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silika gel dan fasa gerak berbagai macam campuran pelarut. Senyawa hasil isolasi berbentuk kristal jarum tak berwarna. Untuk penentuan struktur molekul senyawa hasil isolasi digunakan spektrometer ultraviolet, infra merah, RMI proton, RMI karbon, dan spektrum masa. Spektrum IR hasil isolasi memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 3407 cm, 1050 cm, 2935, 1618, 4 cm, 1472, 2 cm. Spektrum RMI proton memberikan puncak dengan pergeseran kimia 5,35 : 3,55 : 2,3 : 0,70 : dan 0,68 ppm. Spektrum C-13 memberikan pergeseran kimia pada 11,840 11,960 12,240 18,775; 19,008; 19,381; 19,804; 21,061; 21,198; 23,039; 24,286; 26,024; 28,232; 29,114; 29,122; 31,631; 31,879; 33,916; 36,133; 36,480; 37,228; 39,746; 42,273; 45,804, 50,110; 51,219; 56,023; 56,743; 71,801; 121,719 dan 140,729 ppm. Spektrum masa memberikan kelimpahan isotop dengan m/z pada 414 (100%), 396(80%), 381(45%), 329(42%), 255(52%), dan 231(22%). Berdasarkan data dan informasi dari identifikasi yang dilakukan, maka senyawa hasil isolasi dari daging buah jeruk kesturi (*Citrus mitis Blanco*) adalah steroid sebanyak 18,54 mg jarum tak berwarna dengan titik leleh 162,3; 164,2 °C. Jenis steroid tersebut di perkirakan 24-etil-5 kolesten3-beta-ol (β sitosterol).

Kata kunci: *Citrus mitis Blanco*, Jeruk kesturi, steroid, isolasi

ABSTRACT

A preliminary examination revealed that calamondin (*Citrus mitis Blanco*) extraction contains steroid. In regard to this consideration, the researcher tried to isolate and characterize steroid types and structure of calamondin (*Citrus mitis Blanco*) extraction. The results of this research is expected to give information about the types of steroid in calamondin extraction and complete the data on chemical composition of calamondin (*Citrus mitis Blanco*). Extraction and maceration using ethyl acetate solvent. The next step was trituration with hexane solvent. Positive fraction to steroid test with relatively high concentration was the hexane fraction. The chemical components of crude steroid were separated by column chromatography using stationary phase of silica gel and mobile phase of various solvent mixtures. Compound resulting from isolation was in the form of needle-shaped colorless crystal. Ultraviolet spectrometer, infrared, RMI proton, RMI carbon, and mass spectrum were employed to determine molecule structures of chemical compounds resulting from isolation. IR spectrum resulting from isolation dispensed maximum absorbance in wavelength of 3407 cm, 1050 cm, 2935, 1618, 4 cm, 1472, 2 cm. RMI proton spectrum presented the peaks with chemical friction 5.35 : 3.55 : 2.3 : 0.70 : dan 0.68 ppm. C-13 spectrum presented chemical friction at 11.840 11.960 12.240 18.775; 19.008; 19.381; 19.804; 21.061; 21.198; 23.039; 24.286; 26.024; 28.232; 29.114; 29.122; 31.631; 31.879; 33.916; 36.133; 36.480; 37.228; 39.746; 42.273; 45.804, 50.110; 51.219; 56.023; 56.743; 71.801; 121.719 dan 140.729 ppm. Mass spectrum presented excessive isotope with m/z at 414 (100%), 396(80%), 381(45%), 329(42%), 255(52%), and 231(22%). Based on data and information from identification carried out, compounds resulting from isolation of calamondin flesh (*Citrus mitis Blanco*) were 18.54 mg needle-shaped colorless steroid with melting point 162.3 164.2 °C. The type of steroid is estimated as 24-ethyl-5 cholesten-3-beta-ol (β -sitosterol).

Keywords: *Citrus mitis Blanco*, Kesturi, steroid, isolation.

PENDAHULUAN

Isolasi bahan alam berupa hasil metabolisme sekunder dari tumbuh-tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia baik yang merupakan tumbuhan hutan maupun tumbuhan yang telah dibudidayakan cukup potensial dikembangkan untuk keperluan industri terutama industri obat-obatan maupun untuk keperluan pengembangan dunia ilmu pengetahuan khususnya analisa struktur molekul dan konformer. Indonesia mempunyai sumber daya alam hayati sangat berlimpah meliputi berbagai jenis tumbuhan dari tingkat tinggi sampai tingkat rendah yang merupakan gudang persenyawaan kimia yang tak ternilai harganya (Arbain, 1997). Salah satu tumbuhan yang ada di Indonesia dan banyak di budidayakan secara luas adalah tanaman dari jenis jeruk-jerukan (*citrus*).

Penelitian kandungan kimia berbagai jenis jeruk yang telah dilakukan oleh para peneliti diantaranya seperti Baldi (1995) telah mengidentifikasi adanya senyawa limonoid, kumarin, polifenol, flavon, dan biflavon dalam kulit lemon (*lemon peel*). Selanjutnya Moodley (1995) telah menemukan limonoid glikosida dalam *citrus nobilis*. McCould (1994) telah mengisolasi suatu senyawa fototoksik dalam daun *citrus jambiri* dan juga Wu (1994) telah mengisolasi dua senyawa

barukumarin yaitu buntasin B dan buntasin C bersama-sama dengan sepuluh senyawa yang telah diketahui yakni 6-dehidro-simetilherniarin, honiumine, limonin, buntanin, tamnosmonin, giebalansinin, pubesinol asetonid, cis-isokelakton, buntasin A, dan ulopterol dari *citrus grandis*.

Penelitian tentang jeruk kesturi (*citrus mitis* Blanco) yang telah dilaporkan hanyalah penentuan kandungan senyawa pemberi bau/rasa, senyawa gula, dan asam askorbat (Carriedo *et al.*, 1992). Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa steroid dari salah satu jenis jeruk-jerukan yakni jeruk kesturi (*citrus mitis* Blanco).

TINJAUAN TEORITIS

Jeruk Kesturi (*citrus mitis* Blanco)

Tanaman jeruk kesturi (*citrus mitis* Blanco) yang banyak dibudidayakan orang tergolong salah satu suku jeruk-jerukan (*rutaceae*) yang beranggotakan tak kurang dari 1300 jenis. Dalam ilmu botani semua golongan suku ini dikelompokkan dalam 7 sub famili dan 130 genus (marga). Tanaman jeruk adalah sub famili *Aurantioideae*, yang terdiri dari 133 genus (Sarwono, 1991). Ciri umum dari botani *Rutaceae* adalah pohon perdu yang aromantis, jarang herba, kadang-kadang memanjat, dan kadang-kadang berduri.

Umumnya menghasilkan substansi triterpenoid yang pahit, alkaloid, steroid, dan berbagai macam komponen fenolik (Dasuki, 1991). Jeruk merupakan tumbuhan yang banyak dibudidayakan secara luas dan banyak digunakan sebagai bahan pengobatan tradisional di Asia Tenggara dan Asia Barat (Masuda *et al.*, 1992).

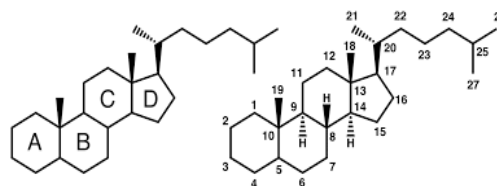
Kandungan kimia

Carriedo *et al.*,(1992) telah melaporkan kandungan kimia *citrus mitis* Blanco melalui pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Terdapat 20 komponen senyawa yang mudah menguap (volatile compounds) yang terdiri dari 5 senyawa aldehid (asetal dehid (X), dekanal (XI), nonanal, oktanal (XII), dan perrilaldehid (XIII), 2 senyawa ester, (geranil asetat, neril asetat), 5 senyawa alkohol (etanol, linalol, metanol, terpinen-4-ol (XIV), α terpineol), dan 9 senyawa hidrokarbon. (3 caren (XV), limonen, mirsen, α -pinen, β -pinen, τ terpinen, terpinolen, valencenen). Selain itu, ada 6 senyawa lain yakni sukrosa, glukosa, fruktosa, asam askorbat, asam dehidroaskorbat, asam sitrat dan asam malat.

Steroid

Marker dan kawan-kawan (1943) telah menemukan sumber sapogenin pada beberapa spesies tumbuhan dari genus

Dioscorea dan *Avage*. Penelitian selanjutnya ternyata menunjukkan bahwa ada spesies dari genus *Trigonella* juga mengandung diosgenin. Penyebaran sapogenin steroid ini dalam tumbuhan sebenarnya tidak terbatas hanya pada genus tersebut (Tarigan 1980). Stereokimia steroid telah diselidiki oleh para ahli kimia dengan menggunakan cara analisis difraksi sinar X dari struktur kristalnya atau cara-cara kimia. Percobaan-percobaan menunjukkan bahwa konfigurasi dari kerangka dasar steroid dapat dinyatakan sebagai pada Gambar 1 (Manitto, 1981).



Gambar 1. Kerangka Dasar Steroid

Bioaktivitas

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa model dari molekul berbentuk relatif planar. Atom atau gugus yang terikat pada inti molekul dapat dibedakan atas dua jenis. Jenis pertama yaitu atom atau gugus yang berada disebelah atas bidang molekul, yakni pada sisi yang sama dengan gugus metil pada C-13 dan C-10, yang disebut dengan konfigurasi β . Ikatan-ikatan yang menghubungkan atom atau gugus ini dengan inti steroid, digambarkan sebagai garis tebal. Jenis kedua atom atau gugus

yang berada disebelah bawah bidang molekul, disebut konfigurasi α dan ikatan-ikatannya digambarkan dengan garis putus-putus. (Ahmad, 1995). Kedua konfigurasi steroid tersebut diatas mempunyai satu perbedaan dimana pada konfigurasi pertama, cincin A dan cincin B terlebur sedemikian rupa sehingga hubungan antara gugus metil pada C-10 dan atom H pada C-5 adalah trans (A/B trans). Pada konfigurasi ini gugus metil pada C-10 adalah β dan atom H pada C-5 adalah α . Pada konfigurasi kedua, peleburan cincin A dan B menyebabkan hubungan antara gugus metil dan atom H itu menjadi cis (A/B cis) dan konfigurasi kedua substituen adalah β . Dengan demikian pada steroid alam konfigurasi atom C-5 dapat berubah-ubah, yakni α atau β .

Biosintesis steroid

Biosintesis senyawa steroid yang terdapat di alam berasal dari dua triterpenoid induk yakni lanosterol dan sikloartenol. Steroid yang terdapat dalam jaringan hewan berasal dari triterpenoid sikloartenol, setelah triterpenoid ini mengalami serentetan perubahan tertentu. Tahap-tahap awal dari biosintesis adalah sama bagi semua steroid alam yakni perubahan asam asetat yang diaktifkan oleh koenzim A melalui asam mevalonat dan skualen menjadi lanosterol atau

sikloartenol (Miller, 1973 dan Achmad, 1985).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan mulai Mei 1998 sampai Desember 1998 di Laboratorium Sintesis Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana maserasi, perangkat destilasi biasa dan vakum, kolom kromatografi, plat kromatografi lapis tipis, bejana kromatografi, erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, tabung reaksi, pipet, corong pisah, desikator, perangkat rotary evaporator, spektrofotometer infra-merah Pelkin Elmer B735, spektrofotometer ultraviolet-VIS Secoman 2000, spektrometer massa EI, spektrometer RMI proton dan karbon Bruker WP 500, alat ukur titik leleh Gallekamp Cat. No. MFBO. 595.010 M dan berbagai alat gelas lainnya. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, etil asetat, n-heksana, air suling, kertas saring, pereaksi Liebermann-Burchad, silika gel 60.

Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel berupa jeruk kesturi yang diambil di desa Limobalai Ampek Angkek Candung Bukittinggi pada bulan Februari 1998. Identifikasi tumbuhan dilakukan di

Herbarium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

Ekstraksi dan Fraksinasi Sampel

Sebanyak 13 kg jeruk kesturi (*Citrus mitis* Blanco) dibuang kulitnya kemudian diblender sehingga didapat juice jeruk. Komponen yang mudah menguap (*volatile*) dipisahkan dengan memanaskan diatas penangas air selama 1 jam pada suhu 80 °C (Masuda, 1992). Selanjutnya direndam dalam etil asetat sebanyak 15 L selama 3 hari. Pada saat perendaman dilakukan pengadukan selama ±30 menit per hari untuk mempercepat proses ekstraksi. Hasil ekstraksi disaring dengan bantuan saringan vakum. Ekstrak etil asetat ini dipekatkan secara *in vacuo* sampai diperoleh ekstrak kental 235,5 g. Ekstrak kental etil asetat ini diambil sebanyak 135 gram dan ditriturasi dengan n-heksana sebanyak 2×200 mL. Fraksi heksana dipekatkan *in vacuo* dan didapatkan ekstrak kental sebanyak 21,5 g (fraksi A). Fraksi yang tidak larut dalam heksana dipekatkan *in vacuo* diperoleh ekstrak pekat 10,77 g (fraksi B). Kedua fraksi tersebut diuji kandungan steroidnya dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Fraksi A ini memberikan (++++) dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan fraksi B memberikan (+) dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Oleh karena

kandungan steroid yang relatif tinggi dalam fraksi A maka dilakukan pengoloman terhadap fraksi tersebut.

Pemisahan Kimia Steroid Kasar

Komponen-komponen kimia steroid kasar dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan menggunakan fase padat silika gel 60 sebanyak 200 g. Dalam proses pemisahan diambil 5 g gum dari fraksi n-heksana dan larutkan dalam pelarutnya dan selanjutnya campurkan dengan 5 g silika gel. Campuran ini diaduk sampai homogen dan dikeringkan dengan rotari evaporator sampai menjadi bubuk dan selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi fasa padat silika gel dan dielusi dengan campuran eluen sebagai berikut:

1. n-heksana :200 mL
 2. n-heksana : etil asetat (95 : 5) :200 mL
 3. n-heksana : etil asetat (90 : 10) :200 mL
 4. n-heksana : etil asetat (85 : 15) :200 mL
 5. n-heksana : etil asetat (80 : 20) :200 mL
 6. n-heksana : etil asetat (75 : 25) :200 mL
 7. n-heksana : etil asetat (70 : 30) :200 mL
 8. n-heksana : etil asetat (65 : 35) :200 mL
 9. n-heksana : etil asetat (45 : 55) :200 mL
 10. n-heksana : etil asetat (35 : 65):200 mL
 11. n-heksana : etil asetat (10 : 90):200 mL
- Eluat yang keluar di tampung dengan vial ±10 mL. Masing-masing vial dimonitor dengan kromatografi lapisan tipis dengan fasa diam plat tipis silika gel 60 F 254 dan fasa gerak heksana : etil asetat (7 : 3).

Fraksi yang mempunyai pola kromatografi lapisan tipis sama digabung. Dari hasil monitor kromatografi lapisan tipis diperoleh fraksi 1 vial 28-38, fraksi 2 vial 42-50, fraksi 3 vial 55-78, dan fraksi 4 vial 82-109, dan fraksi 5 vial 130-186. Masing-masing fraksi diuji kandungan steroidnya dan didapatkan fraksi 1, 3, dan 4 tidak menunjukkan adanya senyawa steroid. Senyawa steroid hanya ditemui dalam fraksi 2. Sebagian pelarut yang ada pada fraksi ini diuapkan *in vacuo* dan kemudian dibiarkan semalaman dan terbentuk kristal putih. Kristal ini direkristalisasi dengan mentanol sehingga dipadatkan kristal tak berwarna. Pada kromatografi lapis tipis dengan eluen etil asetat:heksana (3:7) senyawa memperlihatkan satu noda dengan R_f 0,76.

Karakterisasi senyawa hasil isolasi

Pengukuran titik leleh dilakukan dengan alat melting point apparatus Galenkamp Cat. No. MFBO. 595.010 M. Sedikit kristal senyawa murni diletakkan dalam kapiler kaca sampai masuk ke bagian bawah kapiler. Kapiler tersebut dimasukkan ke dalam alat pemanas dan diatur kenaikannya 2-3°C per menit. Pengamatan dilakukan saat kristal mulai meleleh sampai meleleh seluruhnya.

Pemeriksaan Fisika Kimia dilakukan dengan spektrofotometer inframerah Pelkin Elmer B 735. Sampel

yang akan di rekam dipersiapkan dalam pellet KBr. Perekaman spektrum ultraviolet dilakukan dengan menggunakan UV-VIS Secomam 2000. Spektrum ultraviolet dibuat dalam pelarut etil asetat. Perekaman spektrum massa dengan menggunakan metode EI-MS di University of Western, Australia. Perekaman spektrum resonansi magnet inti ^1H spektrometer Bruker WP 500 dan ^{13}C spektrometer Bruker WP 125 di University of Western, Australia.

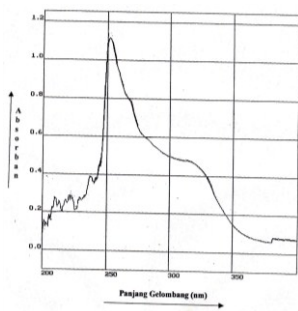
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Ekstraksi dari 13 kg daging buah segar jeruk kesturi dengan etil asetat diperoleh ekstrak pekat etil asetat 235,5 g. Triturasi ekstrak pekat etil asetat sebanyak 135 g dengan n-heksana diperoleh ekstrak pekat fraksi n-heksana 21,5 g. Penampakan noda diatas KLT pada fraksi heksana dengan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan adanya senyawa steroid. Hasil isolasi dengan kromatografi kolom berupa kristal jarum tak berwarna dengan berat 18,54 mg dan titik leleh 162,3-164,2. R_f senyawa tersebut dengan menggunakan eluen heksana:etil asetat (7 : 3) adalah 0,76.

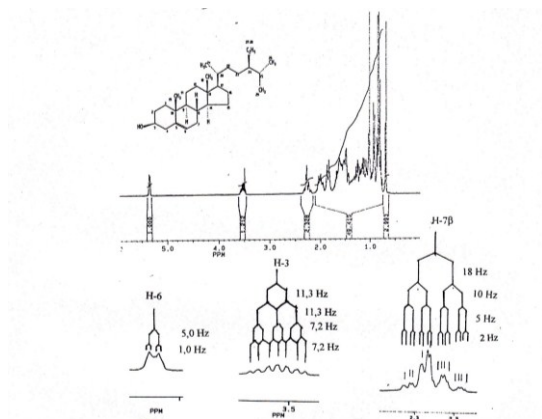
Spektrum UV menunjukkan adanya puncak serapan maksimum pada 235 nm. Gambar 2 terdapat puncak pada daerah ini diartikan bahwa senyawa tersebut

mempunyai ikatan rangkap tidak terkonyugasi (Silverstein, 1991).



Gambar 2. Spektrum UV senyawa hasil isolasi dalam pelarut etil asetat

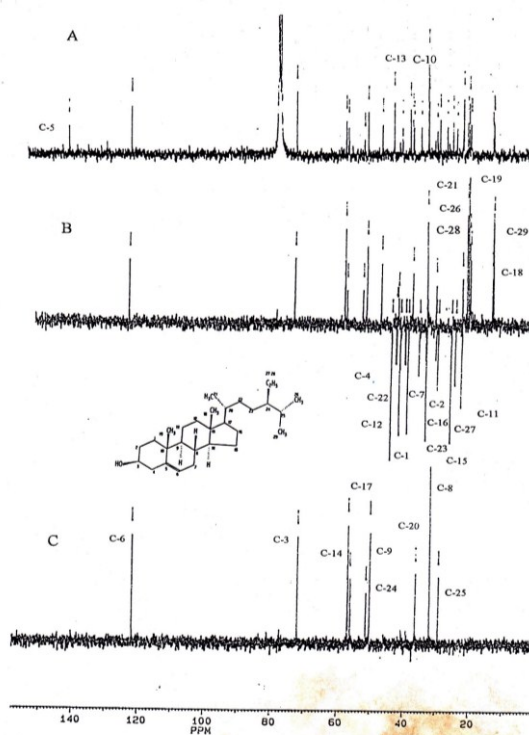
Spektrum IR hasil isolasi memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 3407 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 2935 , $1618,4\text{ cm}^{-1}$, $1472,2\text{ cm}^{-1}$. Spektrum RMI proton memberikan puncak-puncak dengan pergeseran kimia $5,35 : 3,55 ; 2,3 ; 0,70 ;$ dan 068 ppm (Gambar 3).



Gambar 3. Spektrum RMI Proton senyawa hasil isolasi dan ekspansinya (500 MHz, CDCl_3)

Spektrum C-13 memberikan pergeseran kimia pada $11,840$ $11,960$, $12,240$, $18,775$; $19,008$; $9,381$; $19,804$; $21,061$; $21,198$, $23,039$; $24,286$; $26,024$, $28,232$, $29,114$,

$29,112$; $31,631$; $31,879$; $33,916$; $36,133$; $36,480$, $37,228$; $39,746$; $42,273$; $45,804$, $50,110$; $51,219$; $56,023$; $56,743$; $71,801$; $121,719$; dan $140,729\text{ ppm}$. Spektrum massa memberikan kelimpahan isotop dengan m/z pada 414 (100%), 396 (80%), 381 (45%), 329 (42%), 255 (52%), dan 231 (22%)



Gambar 4. Spektrum RMI Senyawa Hasil Isolasi (500 MHz, CDCl_3) (A. Spektrum ^{13}C RMI, B. Spektrum ^{13}C RMI DEPT 135, C. Spektrum ^{13}C RMI DEPT 90)

Pembahasan

Isolasi steroid ekstrak segar jeruk kesturi (*citrus mitis* Blanco) menggunakan sampel segar untuk mendapatkan ekstrak yang bebas dari senyawa-senyawa organik makromolekul yang terdapat dalam juice buah jeruk kesturi (*citrus mitis* Blanco).

Pemblenderan sampel dimaksudkan untuk memecahkan kantung-kantung buah sehingga memudahkan penetrasi pelarut kedalam membran sel dan akhirnya mempermudah proses ekstraksi oleh pelarut.

Pemanasan pada suhu 80 °C selama 1 jam dimaksudkan untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang mudah menguap (Masuda, *et al*, 1992) dan diekstraksi dengan etil asetat untuk mendapatkan fraksi semi polar. Sedangkan untuk mendapatkan fraksi nonpolar ditriturasi dengan pelarut nonpolar yakni heksana. Fraksi yang larut dalam n-heksana dipekatkan *in vacuo* untuk mendapatkan ekstrak pekat fraksi n-heksana. Komponen yang tidak larut dalam n-heksana tinggal sebagai gum dan dipekatkan *in vacuo* untuk menghilangkan dari kemungkinan adanya sisa-sisa n-heksana yang tertinggal. Kedua fraksi diuji dengan pereaksi Liebermann-Buchard, dalam hal ini didapatkan fraksi n-heksana memberikan tanda uji (+++) sedangkan fraksi etil asetat memberikan tanda uji (+).

Pemisahan dan pemurnian fraksi n-heksana dilakukan dengan teknik kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 sebanyak 200 g dengan fasa gerak campuran heksana-etil asetat dengan berbagai perbandingan. Senyawa hasil isolasi setelah dikristalisasi dengan metanol didapatkan berupa

senyawa golongan steroid sebanyak 18,54 mg. Pendeteksian pada plat kromatografi lapis tipis yang menggunakan pengembang berbagai kombinasi eluen tidak menampakkan noda dibawah lampu UV 254 nm. Senyawa tersebut diperkirakan tidak mempunyai ikatan rangkap berkonyugasi dan pengujian dengan reagen Liebermann-Buchard memperlihatkan satu noda yang berwarna biru pekat.

Identifikasi senyawa dengan spektroskopi ultraviolet menunjukkan adanya puncak serapan pada 255 nm. Dengan keterangan ini diduga adanya ikatan rangkap yang terisolasi pada senyawa tersebut. Pada kebanyakan senyawa steroid terutama golongan sterol, ikatan rangkap ditemukan dalam keadaan terisolasi baik pada kerangka dasar maupun rantai samping, dengan demikian identifikasi secara spektroskopi ultraviolet hampir tidak memberikan informasi yang berarti tentang struktur steroid.

Spektrum IR hasil isolasi memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 3407 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus OH dan didukung oleh serapan 1050 cm^{-1} yang merupakan *bending* C-O alkoholik (Silverstein, 1991). Informasi dengan spektroskopi IR ini memperjelas salah satu ciri khusus untuk senyawa steroida, dimana substituen -OH biasanya terikat pada atom C nomor 3.

Selanjutnya pita serapan pada 2935 cm^{-1} menunjukkan regang C-H (sp^2) dari suatu alkena, data ini diperkuat dengan regang C=C pada daerah 1618 cm^{-1} , sehingga dapat dikatakan bahwa pada kerangka steroid tersebut terdapat ikatan rangkap (C=C) (Creswell, 1982 dan Silverstein, 1991).

Hasil pemeriksaan ^1H RMI memberikan informasi tentang banyaknya atom hidrogen yang ada pada suatu senyawa murni, yaitu dengan cara menghitung perbandingan integrasi luas sinyal yang ada. Dari analisis spektrum ^1H -RMI diperkirakan ada 56 buah atom hidrogen. Tetapi jika dilihat dari perbandingan integrasi luas sinyal spektrum ^1H -RMI sampel ditemui adanya beberapa perbandingan luas yang tidak layak untuk jumlah atom hidrogen. Ini menunjukkan bahwa senyawa yang didapat masih terkontaminasi senyawa lain dengan harga R_f yang sama. Dari puncak spektrum ^1H -RMI proton sampel yang memberikan puncak doublet-doublet pada pergeseran kimia 5,35 ppm (1H, dd $J_{6-7\alpha} = 5,0$ Hz; $J_{6-7\beta} = 1,0$ Hz) berasal dari proton C-6 yang terkopling oleh 2 proton C.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian biofungisida dosis 16

cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap berat testis, diameter tubulus seminiferus, tebal epitel germinal tubulus seminiferus, diameter sel leydig. Dosis 24 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap jumlah sel leydig. Dosis 36 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap indeks spermatogenesis. Dosis 54 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap jumlah sel sertoli.

Saran

Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah pemberian biofungisida dengan dosis yang lebih rendah dan dalam jangka waktu yang lebih lama dapat mempengaruhi testis dan proses spermatogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, U.R., M. Mishra. 2003. Lead Acetat Induced Cytotoxicity in Male Germinal Cells of Swiss Mice. *Industrial Health* 41: 291-294.
(http://www.nih.go.jp/jp/indu_hel?2003/pdf/ih_41_3_21.pdf) diakses 02 Mei 2006.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. 1993. *Molecular Biology of Cell*. 3rd ed. Garland Pbl., Inc., New York.
- Amelar, R. D., Dubin, L., and Walsh, P.C. 1977. *Male Infertility*. Saunders, Philadelphia.

- Arsyad, K.M. 1980. Prociding Seminar Spermatogenesis. Pengurus Besar Perkumpulan Andrologi (PANDI). Surabaya.
- Bardin, C.W, Cheng, C.Y, Musto, N.E and Gonsalves. 1988. The Sertoli Cell. In Knobil, E and Neil, J(Editor). The Physiology of Reproduction. Raven Press,Ltd.New York
- Bramono, K. 2005. Peranan Jamur Pada Infertilitas. Buku Kumpulan Makalah/Abstrak Kongres PANDI IX dan Kongres PERSANDI I. P 168-169. Jakarta. April 19-22.2005.
- Brinkwoth,M.H. and D.J. Handelsman. 2000. Environment Influence on Male Reproductive Health. In Neischlog,E and H.M. Behne (Editor). Andrology (2nd Edition). Springer, Berlin.
- Bronson, F.H., C.P Dagg and G.D Snell. 1988. Reproduction. In E.L. Green (Editor) Biology of the Laboratory Mouse. Mcgraww-Hill Book Company, New York, USA. P 933-974.
- Carlson, B.M. 1984. Pattern's Foundation of Embriology. 4th Edition. TMH Edition Tata. McGraw-Hill Publishing Company. Ltd. New Delhi.
- De Kretser, D.M.1988. Evaluation of Male Gonadal Function. In PJ. Rowe and E.M. Vikhlyeva (eds). Diagnosis and Treatement of Infertility. Hans Huber Publisher. Toronto. p: 93-97.
- Du Pan, M.R. and Campana. 1993. Physiopathology of Spermatogenic Arrest. Fertil Steril. 60(6): 937-951.
- Faix, S. 2003. Effect of Per Os Administration of Mercuric Chloride on Peroxidation Processes in Japanese Quail. Acta Vet. Brno, 72:23-26. (http://www.vfu.cz/acta-vet/vol72/pdf/72_023.pdf).
- Fujii. 2003. Cooperative Function of Antioxidant and Redox System Against Oxidative Stress in Male Reproductive Tissue. Asian Journal of Andrology, Sep;5;231-242. (<http://www.asiaandro.com/1008-628x/5/231.htm>) diakses 02 Mei 2006.
- Jalius, 1994. Pengaruh Antispermatogenik Ekstrak Etanil Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L) Pada Tikus. Maj. Kedokt. Indon. 44(1):9-13.
- Johnson, M.H. and B.J. Everit. 1988. Essential Reproduction (3th edition) Butler and Tanner Ltd.
- Junquera, L.C., Carneiro, J., and Kelley,R.O.1995. Basic Histology (8th. Edition) Prentice- Hall International,London.
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar Azas Organ Sasaran dan Penilaian Resiko. Diterjemahkan oleh Nugroho. Edisi kedua. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Mackawa, K., & Abe, S.O. 1995 Proliferation of New Spermatogonia by Mammalian FSH via Sertoli Cell Invivo. Journal Experiment. Zoology,272 (5) : 516-520.
- Mangkoewidjojo & S Smith, J.B..1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan

- Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Raven Press, Ltd, New York, USA. P.753 – 836.
- Nalbandov, A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi Mamalia dan Burung. Terjemahan Sunaryo Keman. UI Press. Jakarta.
- Orr, J.G, V. Leel, G.A. Cameron, C.J. Marek, E.L. Haughton, L.J. Elrick, J.E. Trim, G.M. Hawksworth, A.P. Halestrap, M.C. Wright. 2004. Mechanism Of Action of Antifibrinolytic Compound Gliotoxin in Rat Liver Cells. *Hepatology* 40: 232-42. (<http://www.caspases.org/showabstract.php?pmid=93044400>) diakses 30 September 2006.
- Rhamalingan, V & V. Vimaladelfi. 2002. Effect of Mercuric Chloride on Membrane-Bound Enzymes in Rat Testis. *Asian Journal Andrology*. December; 4: 309-311.
- Robins, S.L., Ramsis & Vinay, K. 1984. *Pathologic Basis of Disease* 3rd.ed. W.B. Saunders Co. Ontario.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse: Its Reproduction and Development*. 1st ed. Burgess Publishing. Co, Mineapolis.
- Setchell, B.P & D.E, Brooks. 1988. Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of The Male Reproductive Tract. In E. Knobil and J.D. Neill (Editors). *The Physiology of Reproduction*, Vol 1. Raven Press, Ltd, New York, USA. P.753 – 836.
- Stephan J.P., Syed,V., and Jegon, B. 1997. Regulation of Sertoli Cell Interleukin-1 and Interleukin-6 Production Invitro. *Moll.Cell. Endocrinol.* 134 (2): 109-118.
- Steinberger.E., and Steinberger, A . 1975. Spermatogenik Function of the Testis. In Greep.R.O. Astwood, E.B., Hamilton, D.W., and Geiger,S.R.(eds) *Handbook of Physiology*, section Endocrinology vol.V.Waverly Press,Inc., Baltimore.
- Suryono. 2006. *Pestisida Biologis*. (<http://www.tanindo.com/abdi8/hal4201.htm>.) diakses 02 Mei 2006.
- Suwahyono, Untung, Wahyudi, Priyo. 2001. *Biofungisida Trichoderma harzianum*, Pestida Ramah Lingkungan. Seminar Teknologi Untuk Negeri. Jakarta.
- Vander , A, Sherman , J, Luciana, D. 2001. *Male Reproductive Physiology, Human Phisiology* (8th), Mc Graw Hill Inc. New York, USA.
- Working, P.K and.Chellman, G.J. 1993. The Testis, Spermatogenesis. And The Excurrent Duct, In Zinaman, MJ dan Seiali,AR(Editor). *Reproductive Toxicology and infertility*. p.39.