



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK DAUN *Garcinia porrecta* Wall var.
schizogyna Boerl DENGAN METODE *BRINE SHRIMP*
LETHALITY TEST (BSLT) DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA KIMIA DARI EKSTRAK DAN FRAKSI YANG
AKTIF**

SKRIPSI

**SYATIANI ARUM SYARIE
0305050604**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK DAUN *Garcinia porrecta* Wall var.
schizogyna Boerl DENGAN METODE *BRINE SHRIMP*
LETHALITY TEST (BSLT) DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA KIMIA DARI EKSTRAK DAN FRAKSI YANG
AKTIF**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**SYATIANI ARUM SYARIE
0305050604**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Syatiani Arum Syarie

NPM : 0305050604

Tanda Tangan :

Tanggal : Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tugas Akhir ini diajukan oleh :
Nama : Syatiani Arum Syarie
NPM : 0305050604
Program Studi : Farmasi
Judul Tugas Akhir : Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Ekstrak dan Fraksi yang Aktif

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Berna Elya, M.Si, Apt. ()
Pembimbing : Dr. Katrin B., M.S., Apt. ()
Penguji : Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S. ()
Penguji : Dra. Maryati K., M.Si ()
Penguji : Sutriyo, M.Si ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2010

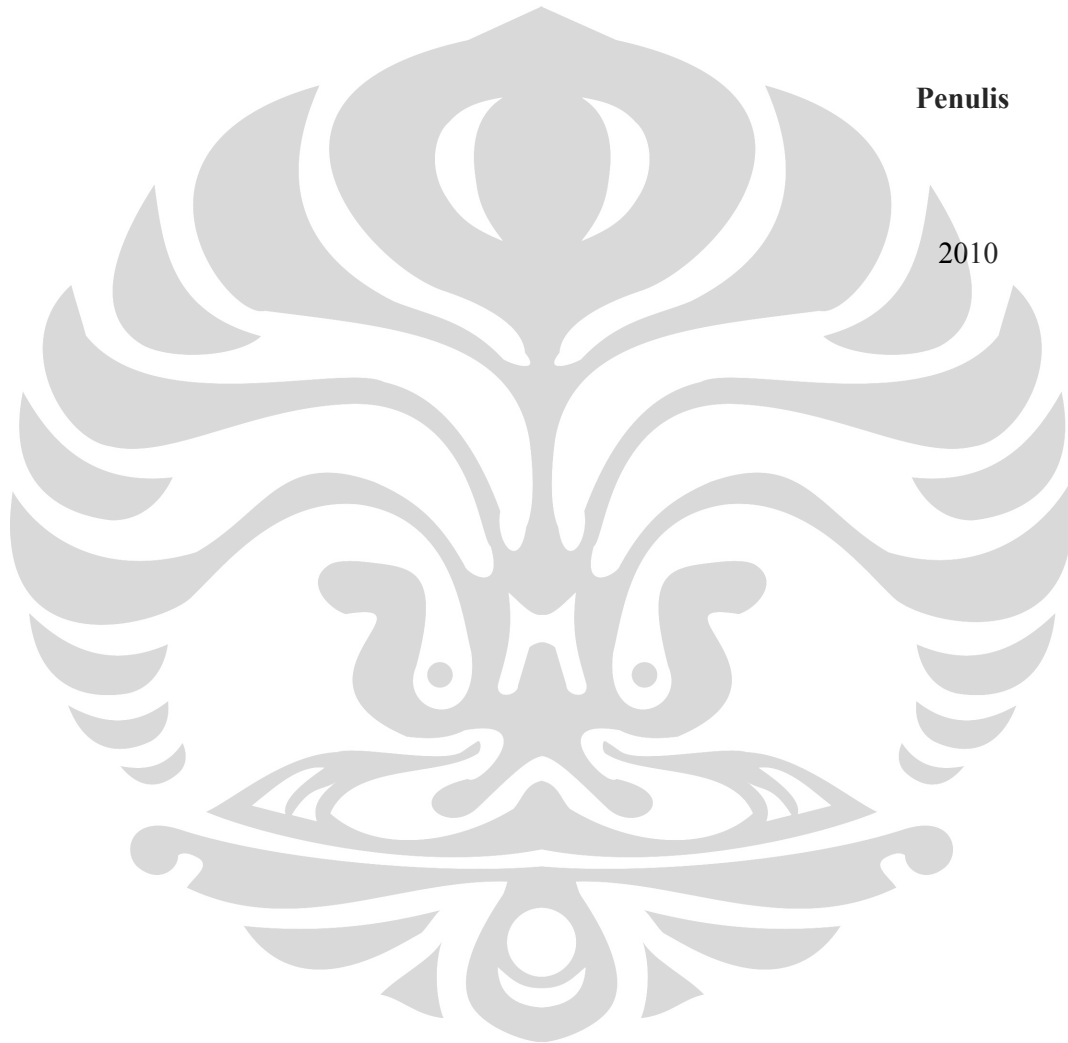
KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanahu wa ta'ala, karena atas segala nikmat yang diberikanNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt., selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (2) Dr. Berna Elya, M.Si, Apt. dan Dr. Katrin B, M.S., Apt., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, dan ilmu yang sangat bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
- (3) Dra Retnosari Andrajati Ms, Phd., Apt., selaku pembimbing akademik yang telah dengan sabar memberikan banyak bimbingan dan bantuan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Program Sarjana Reguler Farmasi FMIPA UI.
- (4) Seluruh staf pengajar, karyawan dan laboran Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan terutama selama penelitian berlangsung.
- (5) Orangtua dan kakak-kakak tercinta, yang selalu mencurahkan kasih sayang dan terus menyemangati serta mendoakan penulis, juga atas bantuannya yang sangat membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Reguler Farmasi.
- (6) Teman-teman Farmasi angkatan 2005, atas semangat, bantuan dan doa yang tak hentinya diberikan pada penulis.

- (7) Semua rekan di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi UI, dan rekan-rekan Farmasi 2006 lainnya atas bantuan dan semangat yang diberikan selama masa penelitian.
- (8) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam proses penelitan dan penyusunan skripsi.



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Syatiani Arum Syarie
NPM : 0305050604
Program Studi : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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 :

Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyne* Boerl dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Ekstrak dan Fraksi yang Aktif

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal: Juli 2010

Yang menyatakan

(Syatiani Arum Syarie)

ABSTRAK

Nama : Syatiani Arum Syarie
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari ekstrak dan Fraksi yang Aktif

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan mengetahui senyawa kimia dari fraksi yang aktif. Daun *G. porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl diekstraksi dengan pelarut n-heksana, aseton, dan metanol. Hasil uji BSLT pada ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki sifat toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 564,424 ppm, sedangkan ekstrak n-heksana dan aseton tidak bersifat toksik karena nilai LC_{50} lebih dari 1000 ppm. Fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol secara kromatografi cair vakum diperoleh 10 fraksi M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, dan M10. Fraksi M3 merupakan fraksi yang paling toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 75,366 ppm. Fraksi M3 difraksinasi kembali dengan kromatografi kolom dan diperoleh 5 fraksi gabungan yaitu fraksi M3₁, M3₂, M3₃, M3₄, dan M3₅. Fraksi yang memiliki toksisitas tertinggi adalah fraksi M3₁ dengan nilai LC_{50} sebesar 9,568 ppm. Identifikasi golongan senyawa dari fraksi M3₁ menunjukkan bahwa fraksi tersebut mengandung senyawa golongan flavonoid.

Kata Kunci : toksisitas, *Brine Shrimp Lethality Test*, *Garcinia porrecta* var. *schizogyna*, identifikasi, pemisahan.
xii + 76 halaman : 10 gambar; 5 tabel; 4 lampiran
Daftar acuan : 30 (1979-2009)

ABSTRACT

Name : Syatiani Arum Syarie
Program Study : Pharmacy
Title : Toxicity Evaluation of *Garcinia porrecta* Wall var.
schizogyna Boerl Leaves Extract using Brine Shrimp
Lethality Test (BSLT) Method and Chemical Compounds
Group Identification from Active Extract and Fraction

This research has been done to know toxicity of *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl leaves using *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) and determine chemical compounds from active fraction. *G. porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl leaves extracted with n-hexane, acetone, and methanol. BSLT results in extracts showed that the methanolic extracts had toxicity with LC₅₀ values at 564.424 ppm, while n-hexane extract and acetone extract considered not toxic for LC₅₀ values of each were more than 1000 ppm. Fraction separation by vacuum liquid chromatography of methanolic extracts obtained 10 fractions M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, and M10. Fraction M3 was the most toxic fraction with LC₅₀ value at 75.366 ppm. Fraction M3 were re-fractionated by column chromatography and obtained five combined fractions, i.e. M3₁, M3₂, M3₃, M3₄, dan M3₅. Fraction with the highest toxicity was the fraction M3₁ with LC₅₀ value at 9,568 ppm. Identification of compounds group in fraction M3₁ indicated that this fraction contain flavonoids.

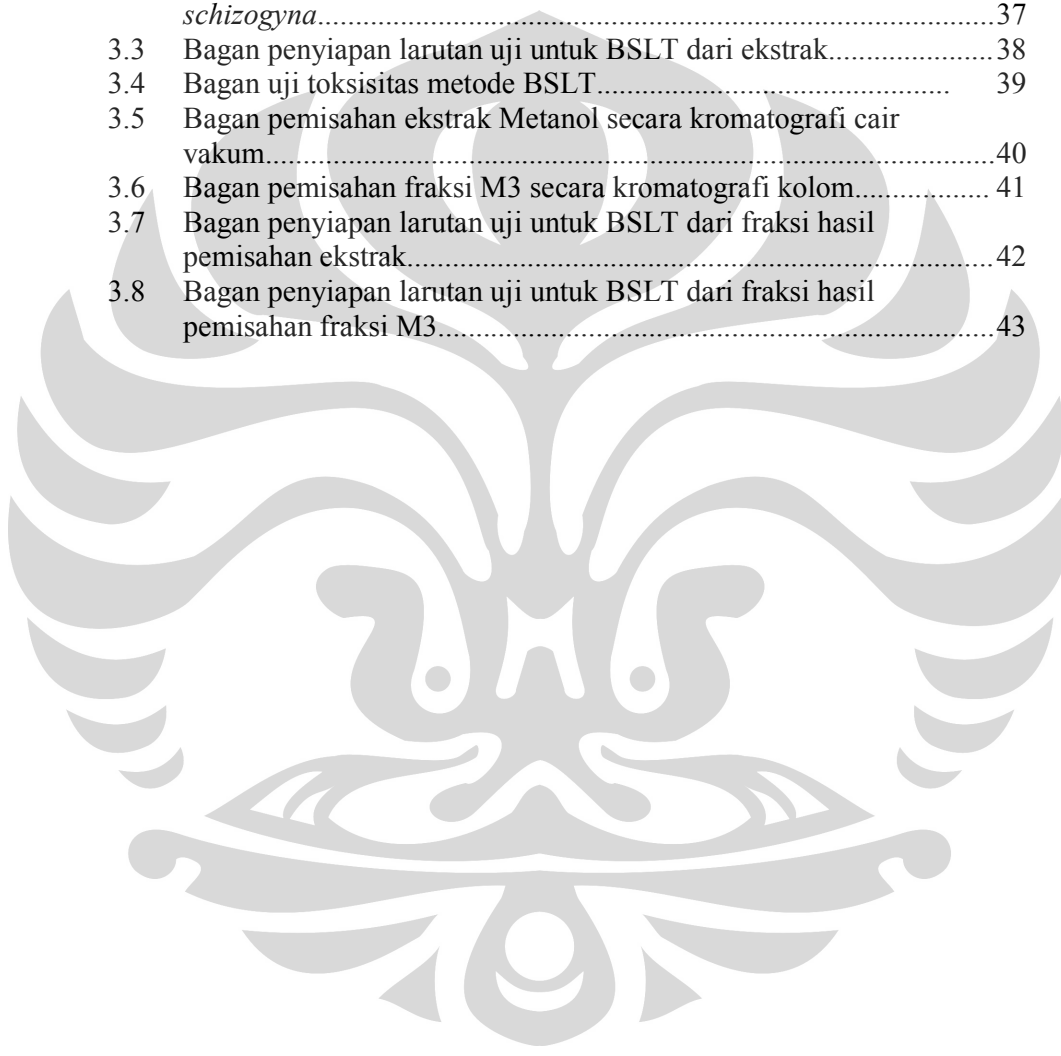
Keyword : toxicity, Brine Shrimp Lethality Test, *Garcinia porrecta* var.
schizogyna, identification, fractionation.
xii + 76 pages : 10 figures; 5 tables; 4 appendices
Bibliography : 30 (1979-2009)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Marga <i>Garcinia</i>	3
2.2 <i>Garcinia porrecta</i> Wall var. <i>schizogyna</i> Boerl.....	3
2.3 Ekstraksi.....	4
2.4 Metabolit Sekunder.....	6
2.5 Metode Pemisahan.....	10
2.6 Uji Toksisitas Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	15
BAB 3 METODE PENELITIAN	18
3.1 Lokasi.....	18
3.2 Bahan.....	18
3.3 Alat.....	18
3.4 Cara Kerja.....	19
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Penyediaan Simplisia.....	24
4.2 Ekstraksi.....	24
4.3 Identifikasi Kandungan kimia Serbuk dan Ekstrak.....	25
4.4 Uji BSLT Ekstrak.....	26
4.5 Pemisahan Ekstrak Metanol secara Kromatografi Cair Vakum.....	28
4.6 Uji BSLT Fraksi.....	29
4.7 Pemisahan Fraksi M3 secara Kromatografi Kolom.....	29
4.8 Uji BSLT Hasil Pemisahan Fraksi M3.....	29
4.9 Identifikasi Kandungan Kimia Fraksi Aktif.....	30
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
DAFTAR ACUAN	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tumbuhan <i>Garcinia porrecta</i> Wall var. <i>schizogyna</i> Boerl.....	35
2.2 Daun <i>Garcinia porrecta</i> Wall var. <i>schizogyna</i> Boerl.....	35
2.3 Larva udang (<i>nauplii</i>) <i>Artemia salina</i>	36
3.2 Bagan ekstraksi simplisia daun <i>Garcinia porrecta</i> var. <i>schizogyna</i>	37
3.3 Bagan penyiapan larutan uji untuk BSLT dari ekstrak.....	38
3.4 Bagan uji toksisitas metode BSLT.....	39
3.5 Bagan pemisahan ekstrak Metanol secara kromatografi cair vakum.....	40
3.6 Bagan pemisahan fraksi M3 secara kromatografi kolom.....	41
3.7 Bagan penyiapan larutan uji untuk BSLT dari fraksi hasil pemisahan ekstrak.....	42
3.8 Bagan penyiapan larutan uji untuk BSLT dari fraksi hasil pemisahan fraksi M3.....	43



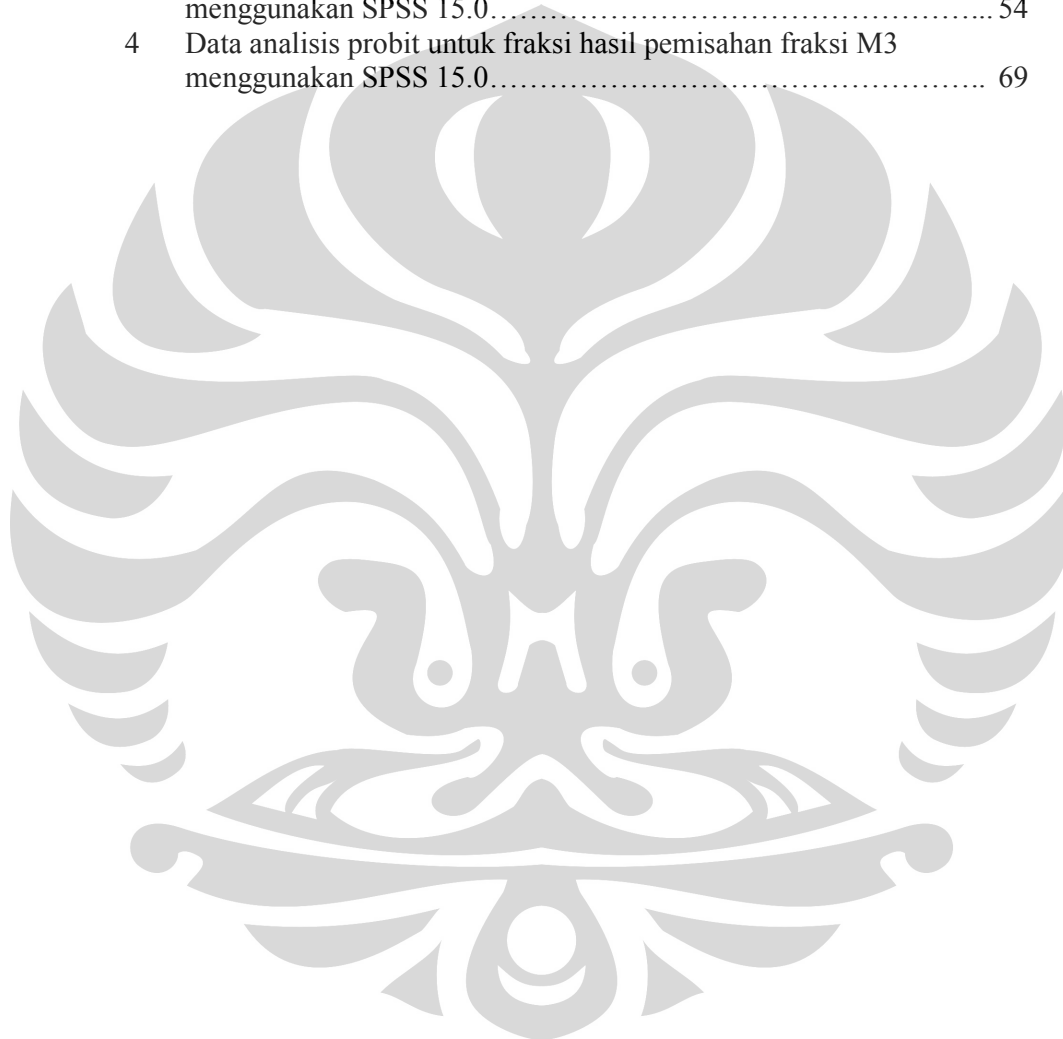
DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Rendemen ekstrak daun <i>G. porrecta</i> var. <i>schizogyna</i>	44
4.2	Hasil identifikasi kandungan kimia.....	44
4.3	Hasil uji BSLT dan nilai LC ₅₀ ekstrak metanol daun <i>G. porrecta</i> var. <i>schizogyna</i>	45
4.4	Hasil uji BSLT dan nilai LC ₅₀ hasil fraksinasi ekstrak metanol.....	45
4.5	Hasil uji BSLT dan nilai LC ₅₀ hasil pemisahan fraksi M3.....	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Hasil determinasi daun <i>Garcinia porrecta</i> Wall var. <i>schizogyna</i> Boerl.....	47
2	Data analisis probit untuk ekstrak daun <i>G. porrecta</i> var. <i>schizogyna</i> menggunakan SPSS 15.0.....	48
3	Data analisis probit untuk fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol menggunakan SPSS 15.0.....	54
4	Data analisis probit untuk fraksi hasil pemisahan fraksi M3 menggunakan SPSS 15.0.....	69



BAB 1 PENDAHULUAN

1. 1 Latar belakang

Dewasa ini penelitian dan pengembangan tumbuhan obat baik di dalam maupun di luar negeri berkembang pesat sehubungan dengan tingginya kebutuhan masyarakat dunia akan obat tradisional yang terbuat dari bahan alam. Berdasarkan data WHO (2008), di beberapa negara asia dan afrika, 80% dari populasinya bergantung pada obat tradisional untuk merawat kesehatan. Di Indonesia terdapat lebih dari 30.000 jenis tumbuhan, dan lebih dari 1000 jenis tumbuhan obat yang dimanfaatkan dalam industri obat tradisional (Hariyati, 2005). Hingga saat ini Indonesia merupakan salah satu lahan penelitian obat tradisional di dunia, mengingat keanekaragaman nabati di negara tersebut belum sepenuhnya tersentuh (Wahyuono & Rahman, 1995).

Garcinia adalah salah satu marga tumbuhan buah Guttiferae yang memiliki jumlah jenis yang sangat banyak dan masih banyak di antaranya yang belum diteliti lebih lanjut (Jansen, 1991). Berdasarkan penelitian terdahulu, pada genus *Garcinia* banyak ditemukan senyawa xanton, benzofenon, dan triterpen yang memiliki aktivitas sitotoksik, antioksidan, antiplasmodium, antiinflamasi, dan anti-HIV (Elya, 2003; Kardono *et al.*, 2006; Kisangau *et al.*, 2007; Kosela *et al.*, 2000; Syamsudin *et al.*, 2007). Tumbuhan *Garcinia* yang telah diteliti antara lain *G. dulcis*, *G. subelliptica*, *G. nervosa*, *G. forbessi*, *G. livingstonei*, *G. kola*, *G. porrecta*, *G. huillensis*, *G. latissima*, *G. mangostana*, *G. lateriflora*, *G. cowa*, *G. assigu* dan *G. parvifolia* (Elya, 2003).

Aktivitas sitotoksik dalam suatu senyawa dapat diuji baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Beberapa diantara uji *in vitro* untuk mengetahui aktivitas sitotoksik adalah uji secara selular menggunakan sel kanker manusia yang diinduksi pada sel hewan. Cara tersebut cukup sulit dilakukan karena membutuhkan tempat dan peralatan tertentu serta perlu dilakukan oleh orang yang cukup terlatih. Karena itu, diperlukan uji awal yang lebih mudah dan sederhana yaitu dengan uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang spesies *Artemia salina* dalam pelaksanaannya. Penggunaan metode BSLT untuk mengetahui bioaktivitas secara umum dalam

ekstrak tumbuhan mulai diperkenalkan tahun 1982 dan kemudian pada 1991 metode ini dimodifikasi sebagai uji pendahuluan untuk sitotoksisitas. Pada penelitian terdahulu ditemukan adanya korelasi positif antara toksisitas brine shrimp dengan sitotoksisitas 9KB (karsinoma nasofaring pada manusia). Kegunaan BSLT sebagai uji pendahuluan untuk aktivitas antitumor dipertegas dengan uji sitotoksisitas *in vitro* dan aktivitas 3PS (sel murine leukemia P388 *in vivo*) secara *blind comparison*. Uji BSLT telah digunakan dalam 20 tahun terakhir dan telah menuntun ditemukannya efek sitotoksik dari berbagai bahan alam. Kelebihan metode tersebut ialah cepat (24 jam), murah, dan sederhana (McLaughlin et al., 1998; Rafaela et al., 2006; Peng et al., 2009; Tawaha, 2004).

Garcinia porrecta merupakan salah satu tumbuhan marga *Garcinia* yang belum banyak diteliti. Dari penelusuran literatur yang diperoleh diketahui bahwa penelitian terhadap *G. porrecta* baru dilakukan pada kulit batang dan dari penelitian tersebut telah berhasil ditemukan beberapa senyawa xanton yang memiliki aktivitas sitotoksik. Karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kimia dan toksisitas dari ekstrak maupun fraksi yang diperoleh dari daun *G. porrecta* var. *schizogyna*.

1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Mengetahui toksisitas ekstrak dan fraksi yang diperoleh dari daun *Garcinia porrecta* var. *schizogyna* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*.
- 1.2.2 Mengidentifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang terpilih yang diperoleh dari ekstrak daun *Garcinia porrecta* var. *schizogyna*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Marga *Garcinia*

Garcinia termasuk dalam suku Clusiaceae, merupakan marga yang besar, terutama tumbuh di daerah tropik. Satu-dua jenis yang buahnya dapat dimakan telah dibudidayakan secara lokal. Tumbuhan *garcinia* banyak terdapat di wilayah Asia Tenggara dan India. Bagiannya yang dapat dimakan adalah arilus pembungkus biji yang mengandung banyak sari buah. Umumnya *Garcinia* merupakan tumbuhan yang tidak terlalu besar dan menurut Jansen marga ini menempati pohon lapisan kedua berdasarkan tingginya. *Garcinia* sering kali ditemukan di bawah naungan pohon-pohon yang lebih besar. Buah yang berkualitas tinggi rasanya manis, sedangkan buah-buah dari jenis minor seringkali asam rasanya. Buah-buah yang asam rasanya kadang dimanfaatkan sebagai pengganti asam, dan sebagai pelekat zat pewarna. Kayu *Garcinia* biasanya keras, tetapi hanya beberapa jenis yang menghasilkan kayu yang berharga. Kadang-kadang bijinya mengandung minyak yang dapat dimakan (Jansen, 1991; Sari & Hanan, 2000).

2.2 *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl

2.2.1 Taksonomi

Taksonomi dari tumbuhan *G. porrecta* var. *schizogyna* (Index Seminum, 2007) adalah sebagai berikut:

Dunia	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Sub kelas	: Archichlamydeae
Bangsa	: Guttiferae
Suku	: Clusiaceae
Marga	: <i>Garcinia</i>
Jenis	: <i>Garcinia porrecta</i> Wall var. <i>schizogyna</i> Boerl

2.2.2 Morfologi

Garcinia porrecta merupakan pohon besar yang memiliki akar yang menonjol (Gambar 2.1). Tajuk dari *G. porrecta* dan *G. porrecta* var. *schizogyna* berbentuk lurus. Percabangannya tersusun dalam pasangan berselang-seling, daun-daunnya berhadapan silang (Gambar 2.2), buah merupakan buah buni berbiji 4-5 butir yang terbungkus arilus dengan rasa yang asam, dan getah daunnya berwarna kuning. Perbedaan antara *G. porrecta* dan *G. porrecta* var. *schizogyna* terletak pada buahnya. Buah *G. porrecta* berbentuk bulat lonjong, diameter 2-3 cm, warna ungu gelap kehitaman. Sedangkan Buah *G. porrecta* var. *schizogyna* berbentuk lonjong, diameter 4-5 cm, warna coklat tua hingga ungu kehitaman (Sari & Hanan, 2000).

2.2.3 Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari *Garcinia porrecta* var. *schizogyna* belum banyak diteliti. Sedangkan pada tumbuhan *Garcinia porrecta* diketahui memiliki senyawa kimia xanton dan norlanosterol (Kardono et. al., 2006). Tumbuhan *Garcinia* lainnya yang sudah diteliti diketahui memiliki senyawa kimia seperti xanton, asam hidroksisitat, triterpen, benzofenon, dan flavonoid (Adegbehingbe et. al., 2008; de Haar, 2005; Elya, 2003).

2.2.4 Kegunaan

Berdasarkan senyawa kimia yang terdapat pada *Garcinia porrecta*, salah satunya yaitu xanton, tumbuhan ini memiliki banyak kegunaan. Xanton diketahui memiliki aktivitas sitotoksik, antioksidan, antimalaria, antibakteri, juga anti-HIV (Elya, 2003). Namun sejauh ini belum banyak bagian dari tumbuhan, baik *G. Porrecta* maupun *G. porrecta* var. *schizogyna*, yang dimanfaatkan secara langsung untuk mengobati suatu penyakit pada manusia.

2.3 Ekstraksi (Sarker et. al., 2006; Parameter Standar, 2000)

Sejumlah metode menggunakan pelarut organik atau pelarut yang mengandung air diterapkan dalam ekstraksi bahan alam. Pada ekstraksi cair-padat bahan tumbuhan mengalami kontak dengan pelarut. Proses keseluruhannya

bersifat dinamis dan dapat disederhanakan kedalam beberapa tahap. Pada tahap pertama misalnya pelarut harus berdifusi ke dalam sel, pada tahap selanjutnya pelarut harus dapat melarutkan metabolit tumbuhan, dan akhirnya harus berdifusi keluar sel meningkatkan jumlah metabolit yang terekstraksi. Beberapa metode yang sering digunakan dalam ekstraksi bahan alam antara lain:

2.3.1 Cara Dingin

2.3.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Metode ini sederhana, tetapi masih secara luas digunakan, prosedurnya dilakukan dengan merendam bahan tumbuhan (simplisia) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun untuk jumlah besar. Pengadukan sesekali ataupun secara konstan (dengan menggunakan alat pengocok mekanik untuk menjamin kehomogenan) dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan terus-menerus (kontinu). Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh dapat dilakukan remaserasi, yaitu pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

Keuntungan penggunaan metode maserasi adalah tidak menyebabkan terjadinya degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas karena maserasi dilakukan pada suhu kamar. Kelemahan yang utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit.

2.3.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada suhu kamar. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak). Pada perkolasi, serbuk tumbuhan direndam dalam pelarut pada sebuah alat perkolator. Seperti

pada maserasi, untuk mengekstrak secara menyeluruh dilakukan dengan penambahan pelarut yang baru (*fresh solvent*) dan semua ekstrak dikumpulkan.

2.3.2 Cara Panas

2.3.2.1 Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2.3.2.2 Refluks

Ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kekurangan yang utama dari metode ini adalah terdegradasinya komponen yang tidak tahan panas.

2.3.2.3 Digesti

Adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

2.3.2.4 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur (96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.3.2.5 Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air.

2.4 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder pada tumbuhan merupakan berbagai macam kelompok senyawa yang terlibat dalam adaptasi suatu tumbuhan terhadap lingkungannya namun tidak berpengaruh terhadap reproduksi dan pertumbuhan sel (Makkar, Siddhuraju, & Becker, 2007). Metabolit sekunder banyak menarik perhatian peneliti karena efek biologisnya terhadap organisme lain (Hanson, 2003). Diantara kelompok senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam

tumbuhan ialah alkaloid, flavonoid, saponin, glikosida, tanin, steroid, dan terpenoid.

2.4.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar, mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid seringkali beracun bagi manusia dan banyak yang mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol, sehingga digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid biasanya tidak berwarna, seringkali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar. Uji sederhana, tetapi yang sama sekali tidak sempurna, untuk alkaloid dalam daun atau buah segar adalah rasa pahitnya di lidah. Pada umumnya alkaloid tidak ditemukan atau tidak sering terdapat dalam gymnospermae, paku-pakuan, lumut, dan tumbuhan rendah (Harborne, 1987).

2.4.2 Flavonoid (Harborne, 1987)

Semua flavonoid, menurut strukturnya, merupakan turunan senyawa induk flavon yang terdapat berupa tepung putih pada tumbuhan *Primula*, dan semuanya mempunyai sejumlah sifat yang sama. Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Mereka dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan petroleum eter. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amonia. Flavonoid mengandung sistem aromatik terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV-Vis. Umumnya flavonoid terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mana pun mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida.

2.4.3 Saponin (Harborne, 1987)

Saponin merupakan kelompok senyawa yang mengandung triterpenoid atau steroid sebagai aglikon (sapogenin) terikat pada satu atau lebih oligosakarida

dengan suatu ikatan glikosida. Adanya kelompok polar (gula) dan nonpolar (steroid atau triterpen) menyebabkan saponin memiliki sifat surfaktan yang kuat. Efek biologi utama dari saponin adalah kemampuannya berinteraksi dengan komponen sel dan membran. Contoh, saponin menghemolisis sel darah merah melalui interaksi nonspesifik dengan protein membran, fosfolipid, dan kolesterol dari eritrosit. Saponin dikarakterisasi berdasarkan aktivitas hemolitik dan sifat membentuk busanya.

Pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau waktu memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti yang terpercaya akan adanya saponin. Bila dalam tumbuhan terdapat banyak saponin, maka sukar untuk memekatkan ekstrak alkohol-air dengan baik, walaupun digunakan penguap putar. Karena itu, uji sederhana untuk saponin ialah mengocok ekstrak alkohol-air dari tumbuhan dalam tabung reaksi dan diperhatikan apakah terbentuk busa yang stabil atau tahan lama pada permukaan cairan. Saponin jauh lebih polar daripada sapogenin karena ikatan glikosidanya dan lebih mudah dipisahkan dengan KKT atau dengan KLT pada selulosa.

2.4.4 Glikosida

Glikosida merupakan senyawa yang terdiri atas gabungan dua bagian senyawa yaitu gula dan bukan gula. Keduanya dihubungkan oleh suatu bentuk ikatan berupa jembatan oksigen (o – glikosida, dioscin), jembatan nitrogen (N-glikosida, adenosine), jembatan sulfur (S-glikosida, sinigrin), maupun jembatan karbon (c-glikosida, barbaloin). Bagian gula biasa disebut glikon, sedangkan bagian bukan gula disebut aglikon atau genin. Aglikon dari glikosida terdiri dari banyak jenis senyawa kimiawi, meliputi senyawa-senyawa alkoholik, dan fenolik, isotiosianat, nitril sianogenetik, turunan antrasen atau antrakinon, flavonoid, dan steroid (Gunawan & Mulyani, 2004).

2.4.5 Tanin (Harborne, 1987)

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh. Menurut batasannya, tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air. Dalam industri, tanin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang

mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung-silang protein.

Di dalam tumbuhan, letak tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, tetapi bila jaringan rusak, misalnya bila hewan memakannya, maka reaksi penyamakan dapat terjadi. Reaksi ini menyebabkan protein lebih sukar dicapai oleh cairan pencernaan hewan. Pada kenyataannya, sebagian besar tumbuhan yang banyak mengandung tanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat.

Secara kimia, terdapat dua jenis utama tanin yang tersebar tidak merata dalam dunia tumbuhan. Tanin-terkondensasi hampir terdapat di seluruh paku-pakuan dan gimnospermae, serta tersebar luas dalam angiospermae, terutama pada jenis tumbuhan berkayu. Sebaliknya tanin terhidrolisis penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua.

Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (atau galokatekin) yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin-terkondensasi disebut juga proantosianidin karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin. Tanin-terhidrolisis terutama terdiri atas dua kelas, yang paling sederhana adalah depsida galoilglukosa. Pada senyawa ini, inti yang berupa glukosa dikelilingi oleh lima gugus ester galoil atau lebih. Pada jenis kedua, inti molekul berupa senyawa dimer asam galat, yaitu asam heksahidroksifenat, di sini pun berikatan dengan glukosa. Bila dihidrolisis, elagitanin ini menghasilkan asam elagat.

2.4.6 Terpenoid (Harborne, 1987)

Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), diterpen yang lebih sukar menguap (C_{20}), sampai ke senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol (C_{30}), serta pigmen karotenoid (C_{40}). Masing-masing golongan terpenoid itu penting, baik bagi pertumbuhan dan metabolisme maupun pada ekologi tumbuhan.

Secara kimia, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Kadang-kadang minyak atsiri terdapat dalam kelenjar khusus pada permukaan daun, sedangkan karotenoid terutama berhubungan dengan kloroplast di dalam daun dan dengan kromoplast di dalam daun bunga (petal). Biasanya terpenoid diekstraksi dari jaringan tumbuhan menggunakan petroleum eter, eter, atau kloroform, dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada silika gel atau alumina menggunakan pelarut di atas.

2.4.7 Steroid (Harborne, 1987)

Steroid merupakan senyawa turunan tetrasiklik triterpen dan mempunyai kerangka dasar sistem cincin siklopentana perhidrofenantren. Dahulu sterol dianggap sebagai senyawa satwa (sebagai hormon kelamin, asam empedu, dan lain-lain), tetapi sekarang makin banyak senyawa tersebut yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Senyawa sterol yang umum terdapat dalam tumbuhan yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol, ketiganya biasa disebut fitosterol. Sterol umum ini terdapat dalam bentuk bebas dan sebagai glikosida sederhana. Sterol tertentu hanya terdapat dalam tumbuhan rendah, contohnya ergosterol yang terdapat dalam khamir dan sejumlah fungus. Sterol lain terutama terdapat dalam tumbuhan rendah, tetapi terdapat juga dalam tumbuhan tinggi, misalnya fukosterol, yaitu steroid utama pada alga coklat dan juga terdeteksi pada kelapa. Untuk mengetahui adanya senyawa sterol, uji yang banyak digunakan adalah reaksi Lieberman-Burchard (anhidrida asetat- H_2SO_4 pekat) yang dengan kebanyakan triterpen dan sterol memberikan warna hijau-biru.

2.5 Metode Pemisahan

Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan terutama dilakukan dengan menggunakan salah satu atau gabungan dari empat teknik kromatografi. Keempat teknik kromatografi itu adalah: kromatografi kertas (KKt), kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi gas cair (KGC), dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Semua teknik tersebut dapat digunakan pada skala mikro maupun makro. Untuk pekerjaan penyiapan, KLT dilakukan pada lapisan penjerap yang tebal, dan KKt pada lembaran kertas saring yang tebal. Untuk isolasi pada skala

yang lebih besar dari itu, biasanya digunakan kromatografi kolom yang digabungkan dengan pengumpul fraksi otomatis. Prosedur ini akan menghasilkan senyawa murni dalam skala gram.

Pemilihan teknik kromatografi sebagian besar tergantung pada sifat kelarutan dan keatsirian senyawa yang akan dipisah. KKt dapat digunakan terutama bagi kandungan tumbuhan yang mudah larut dalam air, yaitu karbohidrat, asam amino, basa asam nukleat, asam organik, dan senyawa fenolat. KLT merupakan metode pilihan untuk pemisahan semua kandungan yang larut dalam lipid, yaitu lipid, steroid, karotenoid, kuinon sederhana, dan klorofil. Sebaliknya, KGC penggunaan utamanya adalah pada pemisahan senyawa atsiri, yaitu asam lemak, mono- dan seskuiterpena, hidrokarbon, dan senyawa belerang. Sedangkan KCKT dapat memisahkan kandungan yang keatsiriannya kecil (Harborne, 1987).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi diantara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai zat penjerap, seperti halnya penjerap alumina yang diaktifkan, silika gel, dan resin penukar ion, atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (Farmakope Indonesia edisi IV, 1995).

2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada kromatografi lapis tipis, zat penjerap merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik atau logam secara merata, umumnya digunakan lempeng kaca. Lempeng yang dilapisi dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan yang tercapai dapat didasarkan pada adsorpsi, partisi, atau kombinasi kedua efek, tergantung dari jenis zat penyangga, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan bercak dengan harga R_f yang identik dan ukuran yang hampir sama, dengan menotolkan zat uji dan baku pembanding

pada lempeng yang sama. Harga Rf diperoleh dengan mengukur jarak antara titik awal dan pusat bercak yang dihasilkan senyawa lalu dibagi jarak antara titik awal dan garis depan (Farmakope Indonesia edisi IV, 1995).

Dibandingkan dengan KKt, kelebihan khas KLT adalah keserbagunaan, kecepatan dan kepekaannya. Keserbagunaan KLT disebabkan oleh kenyataan bahwa, sebagai fase diam, di samping selulosa, sejumlah penjerap yang berbeda-beda dapat disaputkan pada pelat kaca atau penyangga lain dan digunakan untuk kromatografi. Walaupun silika gel paling banyak digunakan, lapisan dapat pula dibuat dari alumunium oksida, 'celite', kalsium hidroksida, damar penukar ion, magnesium fosfat, poliamida, 'sephadex', polivinil pirolidon, selulosa, dan campuran dua bahan di atas atau lebih. Kecepatan KLT yang lebih besar disebabkan oleh sifat penjerap yang lebih padat bila disaputkan pada pelat dan merupakan keuntungan bila kita menelaah senyawa labil. Kepekaan KLT sedemikian rupa sehingga bila diperlukan dapat memisahkan bahan yang jumlahnya lebih sedikit dari ukuran μg (Harborne, 1987).

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak (Gandjar & Rohman, 2007):

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga Rf terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c. Untuk pemisahan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai Rf. Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzen akan meningkatkan harga Rf secara signifikan.
- d. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan

tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam.

Pemisahan pada KLT yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda (Gandjar & Rohman, 2007).

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi kimia melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet (Gandjar & Rohman, 2007).

2.5.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi cair yang dilakukan di kolom besar merupakan metode kromatografi terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar (lebih dari 1 g). Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam atau bahkan tabung plastik. Pelarut atau fase gerak dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan oleh gravitasi atau didorong dengan tekanan. Pita senyawa linarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah, dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari alas kolom (Gritter, Bobbit & Schwarting, 1985).

Kromatografi klasik atau dikenal juga dengan kromatografi kolom terbuka melakukan pemisahan senyawa dengan fase gerak yang dialirkan melalui kolom berdasarkan gaya tarik bumi. Untuk kolom ini menggunakan penjerap berukuran 60-230 mesh (63-250 μ m). Kromatografi lainnya yang menggunakan pompa bertekanan untuk mendorong fase gerak adalah kromatografi kilat atau kromatografi cair vakum yang menggunakan pompa vakum untuk meningkatkan tekanan dalam sistem kolom. Pada kromatografi ini penjerap harus berukuran 40-

60 μ m (230-400 mesh), jika partikelnya lebih kecil diperlukan tekanan yang lebih besar untuk mendorong pelarut atau pengembang melalui kolom. Kromatografi cair vakum dikenal juga dengan kromatografi tekanan sedang, karena menggunakan tekanan gas yang sedang atau medium sekitar 10-15 psi (Gritter, Bobbit & Schwarting, 1985).

Metode pengelusian pada kromatografi kolom dapat dilakukan secara isokratik, landaian bertahap, atau landaian. Pada pengelusian isokratik, pelarut atau campuran pelarut yang sama dipakai untuk keseluruhan kromatografi. Pada pengelusian bertahap, susunan pelarut diubah tahap demi tahap, setiap tahap lebih polar dari tahap sebelumnya. Pengelusian landaian yang sebenarnya, susunan pelarut terus-menerus diubah dari medium yang kurang polar ke medium yang lebih polar (Gritter, Bobbit & Schwarting, 1985).

2.5.2.1 Kromatografi Kolom Adsorpsi (Farmakope Indonesia edisi IV, 1995)

Zat penjerap (misalnya aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel, tanah diatome terkalsinasi, atau tanah silika yang dimurnikan untuk kromatografi) dalam keadaan kering atau dalam campuran dengan air, dimampatkan ke dalam tabung kromatografi kaca atau kuarsa. Zat uji yang dilarutkan dalam sejumlah kecil pelarut, dituangkan ke dalam kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penjerap. Zat berkhasiat diadsorpsi dari larutan secara kuantitatif oleh bahan penjerap berupa pita sempit pada permukaan atas kolom. Dengan penambahan pelarut lebih lanjut melalui kolom, oleh gaya gravitasi atau dengan memberi tekanan, masing-masing zat bergerak turun dalam kolom dengan kecepatan tertentu, sehingga terjadi pemisahan dan diperoleh kromatogram. Laju gerakan zat dipengaruhi oleh sejumlah variabel, misalnya daya adsorpsi zat penjerap, ukuran partikel dan luas permukaan, sifat dan polaritas pelarut, tekanan yang digunakan dan suhu sistem kromatografi.

Jika senyawa yang terpisah itu berwarna atau berfluoresensi di bawah sinar UV, kolom penjerap dapat dikeluarkan dengan cara memotong melintang, lapisan yang diperlukan dapat dipisahkan.

Senyawa yang dikehendaki diekstraksi dari tiap lapisan dengan pelarut yang sesuai. Jika senyawa tidak berwarna, letaknya dapat diketahui dengan cara

memberi warna atau menyemprot kolom yang telah dikeluarkan dengan pereaksi yang dapat membentuk warna.

2.5.2.2 Kromatografi Kolom Partisi (Farmakope Indonesia edisi IV, 1995)

Pada kromatografi partisi, zat yang dipisahkan terbagi antara dua cairan yang tidak saling bercampur. Salah satu cairan, yaitu fase diam, umumnya diadsorpsikan pada penyangga padat, karena itu mempunyai area permukaan yang sangat luas terhadap pelarut yang mengalir atau fase gerak. Kontak cairan dengan cairan secara berturut-turut yang berulang kali terjadi, menghasilkan efisiensi pemisahan yang tak dapat dicapai dengan cara ekstraksi cair-cair biasa. Penyangga padat umumnya bersifat polar dan fase diam yang teradsorpsi bersifat lebih polar dari pada fase gerak.

Sampel yang dikromatografi umumnya dimasukkan ke dalam sistem kromatografi dengan menggunakan salah satu cara dari dua cara berikut: (a) larutan uji dalam sejumlah kecil fase gerak dimasukkan ke dalam kolom atau, (b) larutan uji dalam sejumlah kecil fase diam dicampur dengan penyangga padat dan dimasukkan ke dalam kolom sebagai lapisan di atas campuran fase diam dan zat penyerap.

2.6 Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Brine Shrimp Lethality Test merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini dapat digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* dari bahan alam karena mudah, cepat, murah, peka, dan dapat diulang tanpa terjadi penyimpangan (Harmita & Radji, 2008).

Penggunaan BSLT sebagai *bioassay* pertama kali dilaporkan oleh Tarpley untuk menentukan keberadaan residu insektisida seperti DDT, Parathion, Dieldrin dan lain-lain, menentukan senyawa anestetik, serta menentukan tingkat toksisitas air laut. Selanjutnya, Meyer dan kawan-kawan menggunakan BSLT dalam penapisan senyawa-senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan yang ditunjukkan sebagai toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach. Diketahui toksisitas dengan *Brine Shrimp* memiliki korelasi positif dengan efek sitotoksik

9KB (karsinoma nasofaring pada manusia). Kegunaan BSLT sebagai uji pendahuluan untuk aktivitas antitumor dipertegas dengan uji sitotoksitas *in vitro* dan aktivitas 3PS (sel murine leukemia P388 *in vivo*) secara *blind comparison*. Uji BSLT telah digunakan dalam 20 tahun terakhir dan telah menuntun ditemukannya efek sitotoksik dari berbagai bahan alam (McLaughlin et al., 1998). Toksisitas ditentukan dengan melihat harga LC_{50} yang dihitung berdasarkan analisis probit. Tumbuhan yang aktif ditentukan dengan melihat $LC_{50} \leq 1000$ ppm (Harmita & Radji, 2008). Tumbuhan yang memiliki $LC_{50} < 200$ ppm (ekstrak) dan < 5 ppm (senyawa murni) dianggap sangat aktif (Tawaha, 2004).

2.6.1 *Artemia salina*

Klasifikasinya (ITIS, n.d.) adalah sebagai berikut:

Dunia : Animalia
 Filum : Arthropoda
 Sub filum : Crustacea
 Kelas : Branchiopoda
 Sub kelas : Sarsostraca
 Bangsa : Anostraca
 Sub bangsa : Artemiina
 Suku : Artemiidae
 Marga : Artemia Leach
 Jenis : *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)

Artemia salina merupakan kelompok udang-udangan dari filum Arthropoda (Gambar 2.3). Mereka berkerabat dekat dengan zooplankton lain seperti *copepode* dan *daphnia* (kutu air). *Artemia* hidup di danau-danau garam (berair asin) yang ada di seluruh dunia seperti *Great Salt Lake*. Udang ini toleran terhadap selang salinitas yang sangat luas, mulai dari nyaris tawar hingga jenuh garam. Insangnya membantu dalam mengatasi kandungan garam yang tinggi dengan mengabsorpsi dan mengekskresikan ion-ion sesuai kebutuhan dan menghasilkan urin pekat. Secara alamiah salinitas danau dimana mereka hidup sangat bervariasi, tergantung pada jumlah hujan dan penguapan yang terjadi. Apabila kadar garam kurang dari 6 % telur *artemia* akan tenggelam sehingga telur

tidak bisa menetas, hal ini biasanya terjadi apabila air tawar banyak masuk ke dalam danau di musim penghujan. Sedangkan apabila kadar garam lebih dari 25% telur akan tetap berada kondisi tersuspensi, sehingga dapat menetas dengan normal (Purwakusuma, 2002).

Makanan *Artemia salina* biasanya terdiri dari ragi, diatom, ganggang, bakteri, dan mikroorganisme yang lain. Namun dalam pemeliharaannya makanan dapat berupa tepung beras, kedelai, atau ragi (Purwakusuma, 2002).

Artemia dewasa bisa hidup selama 3 bulan dan memproduksi *nauplii* atau kista sebanyak 300 ekor per 4 hari. Dalam tingkat salinitas rendah dan dengan pakan yang optimal, betina *Artemia* dapat menghasilkan *nauplii* sebanyak 75 ekor perhari. Selama masa hidupnya (sekitar 50 hari) mereka bisa memproduksi *nauplii* rata-rata sebanyak 10-11 kali. *Artemia* dewasa toleran terhadap selang suhu -18 hingga 40°C. Sedangkan temperatur optimal untuk penetasan kista dan pertumbuhan adalah 25-30°C (Purwakusuma, 2002; Emslie, 2003).

Variabel lain yang penting adalah pH, cahaya dan oksigen. pH dengan selang 8-9 merupakan selang yang paling baik, sedangkan pH di bawah 5 atau lebih tinggi dari 10 dapat membunuh artemia. Cahaya minimal diperlukan dalam proses penetasan dan akan sangat menguntungkan bagi pertumbuhan mereka. Kadar oksigen harus dijaga dengan baik untuk pertumbuhan *Artemia*. Dengan suplai oksigen yang baik, *Artemia* akan berwarna kuning atau merah jambu. Warnanya bisa berubah menjadi kehijauan apabila mereka banyak mengkonsumsi mikro algae (Purwakusuma, 2002).

Kista artemia dapat ditetaskan secara optimal apabila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi. Beberapa syarat tersebut yakni: Salinitas antara 20-30 ppm atau 1-2 sendok teh garam per liter air tawar; Suhu air 26-28°C; Diberikan sinar selama penetasan untuk merangsang proses; Aerasi yang cukup; dan pH 8 atau lebih, jika dibawah pH 7 dapat ditambah NaHCO_3 (Purwakusuma, 2002).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI.

3.2 BAHAN

3.2.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan adalah daun tumbuhan *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl yang telah dideterminasi oleh Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

3.2.2 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah larva *Artemia salina* L yang berumur 48 jam.

3.2.3 Bahan Kimia

Pelarut untuk maserasi: n-heksan, aseton, dan metanol teknis yang telah didestilasi; pelarut untuk kolom: N-Heksan, etil asetat dan metanol teknis yang telah didestilasi; lempeng KLT: lempeng silika gel F₂₅₄ (Merck); fase diam pada kromatografi cair vakum: serbuk silika gel 60 H (Merck 1.07736.1000); fase diam pada kromatografi kolom: serbuk silika gel 60 (Merck 1.07734.1000); pereaksi kimia: HCl P; Mayer LP; Bouchardat LP; Dragendorf LP; Molisch LP; benzena; serbuk magnesium (Merck); serbuk seng (Merck); asam borat (Merck); asam oksalat (Merck); etanol 95%; Kloroform.

3.3 ALAT

Alat-alat gelas, blender (Nasional), penguap putar vakum (Ika-dest) dan Buchi), timbangan analitik (Acis), bejana KLT, peralatan kromatografi kolom, kaca pembesar, bejana penetasan, aerator, oven vakum (Hotpack), lampu UV (Camag), waterbath (Imperial).

3.4 CARA KERJA

3.4.1 Penyiapan Simplisia

Daun tumbuhan *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl diperoleh dari Kebun Raya Bogor. Setelah dikeringkan daun tersebut diserbuk dengan mesin penggiling dan diperoleh serbuk sebanyak 965 gram.

3.4.2 Ekstraksi

Serbuk simplisia sebanyak 900 gram dimaserasi dengan pelarut n-heksan hingga filtrat hampir tidak berwarna. Caranya dengan memasukkan 10 bagian serbuk ke dalam wadah kemudian dituangi dengan 75 bagian pelarut, ditutup, dan dibiarkan selama 3 hari sambil sering diaduk (Farmakope Indonesia edisi III, 1979). Ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama hingga filtrat yang diperoleh berwarna jernih. Lalu filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dievaporasi dengan penguap putar vakum hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian ekstrak dikeringkan pada suhu kamar. Setelah itu ampas dibiarkan hingga kering dan dilakukan maserasi kembali berturut-turut dengan aseton dan metanol dengan perlakuan yang sama hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak yang diperoleh ditimbang kemudian dihitung rendemennya. Bagan ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 3.2.

3.4.3 Identifikasi Kandungan Kimia Serbuk dan Ekstrak

Serbuk dan ekstrak yang diperoleh dilakukan pengujian terhadap alkaloid, flavonoid, glikosida umum, antraknon, saponin, tanin, steroid dan terpenoid.

3.4.3.1 Alkaloid

Ditimbang 500 mg serbuk simplisia, ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, lalu dipanaskan di atas penangas air selama dua menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipindahkan pada tiga kaca arloji masing-masing tiga tetes. Pada kaca arloji pertama ditambahkan pereaksi Bouchardat, adanya alkaloid ditunjukkan dengan timbulnya endapan berwarna coklat sampai hitam. Pada kaca arloji kedua ditambahkan pereaksi Mayer, adanya alkaloid ditunjukkan dengan timbulnya endapan putih atau kuning. Pereaksi Dragendorff ditambahkan pada filtrat di kaca

arloji ketiga, adanya alkaloid ditunjukkan dengan timbulnya endapan merah bata (Materia Medika Indonesia jilid V, 1989).

3.4.3.2 Saponin

Dimasukkan 500 mg serbuk simplisia ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm – 10 cm dan dengan penambahan satu tetes HCl 2N buih tidak hilang, maka terkandung saponin (Materia Medika Indonesia jilid V, 1989).

3.4.3.3 Flavonoid

500 mg serbuk disari dengan 10 mL metanol menggunakan alat pendingin balik selama 10 menit. Disaring panas melalui kertas saring. Filtrat diencerkan dengan 10 mL air. Setelah dingin ditambahkan 5 mL petroleum eter, dikocok hati-hati, diamkan. Lapisan metanol diambil, diuapkan pada suhu 40° C di bawah tekanan. Sisa di larutkan dalam 5 mL etil asetat, saring (Materia Medika Indonesia jilid V, 1989). Diperoleh larutan percobaan.

Cara uji:

- a. 1 mL larutan percobaan diuapkan hingga kering, sisa dilarutkan dalam 1 mL sampai 2 mL etanol 95%. Ditambahkan 0,5 g serbuk seng dan 2 mL HCl 2N, didiamkan satu menit. Ditambahkan 10 tetes HCl pekat, jika dalam waktu dua sampai lima menit terjadi warna merah intensif menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).
- b. 1 mL larutan percobaan diuapkan hingga kering, sisa dilarutkan dalam 1 mL etanol 95%. Ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat, jika terjadi warna merah hingga merah ungu maka ada flavonoid, jika terjadi warna kuning hingga maka ada flavon, kalkon, auron.
- c. 1 mL larutan percobaan diuapkan hingga kering, sisa dibasahkan dengan aseton. Ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati di atas penangas air, hindari panas berlebihan. Campur sisa dengan 10 mL dietil eter, kemudian diamati dengan UV 366 nm. Jika larutan berfluoresensi kuning intensif maka ada flavonoid.

3.4.3.4 Glikosida umum

3 gram serbuk simplisia disari dengan 30 mL campuran 7 bagian volume etanol 95% dan 3 bagian volume air selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL air. Filtrat disari tiga kali masing-masing dengan 20 mL dietil eter. Lapisan dietil eter dipisahkan dan dikumpulkan. Pada kumpulan sari ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, disaring dan diuapkan. Sisa dilarutkan dalam metanol. 0,1 mL larutan percobaan Dimasukkan dalam tabung reaksi, diuapkan di atas tangas air, ditambahkan 5 tetes pereaksi Molisch. Ditambahkan hati-hati 2 mL asam sulfat pekat, terjadi cincin ungu pada batas cairan (Materia Medika Indonesia jilid V, 1989).

3.4.3.5 Antrakinon

200 mg serbuk simplisia dicampur dengan 5 mL asam sulfat 2N, dipanaskan sebentar, didinginkan. Ditambahkan 10 mL benzena, kocok, didiamkan, lalu dipisahkan lapisan benzena, dan disaring. Jika filtrat warna kuning berarti ada antrakinon (Materia Medika Indonesia jilid V, 1989).

3.4.3.6 Tanin

500 mg serbuk simplisia disari dengan aquades atau metanol, direfluks 30 menit, saring. Filtrat yang diperoleh diuji dengan tiga larutan pereaksi, gelatin 10%, NaCl-gelatin, dan FeCl_3 3% (Cuilei, 1984).

3.4.3.7 Steroid dan Terpenoid

Simplisia diekstraksi dengan eter, ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan 1-4 tetes asam sulfat pekat. Jika terjadi warna biru atau hijau, ekstrak mengandung steroid atau terpenoid (Cuilei, 1984).

3.4.4 Uji Toksisitas Ekstrak Metode BSLT

3.4.4.1 Penetasan Telur *Artemia salina* L

Telur *Artemia salina* ditetaskan dalam bejana penetasan dengan menggunakan media air laut buatan. Bejana penetasan dibagi dua bagian (gelap

dan terang) yang dipisahkan dengan sekat berlubang. Bejana penetasan dilengkapi lampu sebagai sumber cahaya dan aerator sebagai sumber oksigen.

Media penetasan telur menggunakan media air laut buatan yang terdiri dari aquadest, natrium klorida 30 g/L, dan natrium bikarbonat 0,15 g/L. Sewaktu penetasan digunakan aerator. Aerasi dihentikan ketika telur pertama mulai menetas. Dalam waktu 16-24 jam telur-telur menetas menjadi larva yang disebut *nauplii* (Harmita & Radji, 2008).

3.4.4.2 Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji disiapkan dengan melarutkan 50 mg dari masing-masing ekstrak dalam 5 mL pelarut yang sesuai sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 10.000 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan mengambil 0,5 mL dari larutan induk dan dicukupkan volumenya 5 mL (larutan induk kedua, 1000 ppm). Dari larutan induk kedua diambil 0,5 mL dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL (larutan induk ketiga, 100 ppm) (Gambar 3.3).

3.4.4.3 Pelaksanaan Uji

Dari tiap larutan induk diambil 0,5 mL lalu masing-masing dimasukkan dalam vial dan diuapkan hingga kering. Setelah itu, dimasukkan air laut sebanyak 1 ml dan ditambahkan 2-4 tetes DMSO agar ekstrak larut. Masukkan 10 ekor larva ke dalam vial dan tambahkan air laut buatan sampai 5 ml. Tiap konsentrasi larutan uji terdiri dari tiga vial. Disiapkan juga kontrol yang terdiri dari tiga vial untuk setiap seri konsentrasi. Vial kontrol hanya terdiri dari pelarut yang diuapkan sampai kering dengan volume yang sama dengan sampel. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Tingkat toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Bagan uji BSLT dapat dilihat pada Gambar 3.4. Kemudian data dianalisis dengan menggunakan program analisis regresi probit *SPSS 15.0*. Sampel menunjukkan sifat toksik bila konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian (LC_{50}) \leq 1000 ppm. Ekstrak dengan aktivitas tertinggi selanjutnya difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum.

3.4.5 Pemisahan secara Kromatografi Kolom

Ekstrak metanol yang memiliki nilai LC_{50} terendah dipisahkan secara kromatografi cair vakum dengan menggunakan fase diam silika gel 60 H dan fase gerak campuran dengan kepolaran meningkat, dimulai dari pelarut non-polar hingga pelarut polar (n-heksana – etil asetat dan etil asetat-metanol). Fraksi yang diperoleh ditampung dan diidentifikasi secara kromatografi lapis tipis. Fraksi dengan bercak yang sama digabung kemudian diuapkan dan diuji kembali dengan BSLT untuk menentukan fraksi yang paling aktif. Pada fraksi terpilih dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom menggunakan pengembang n-heksana – etil asetat dengan kepolaran yang meningkat. Fraksi yang diperoleh diperiksa kembali dengan KLT. Fraksi dengan bercak yang sama digabung dan diuji aktivitasnya dengan BSLT.

3.4.6 Uji BSLT Fraksi

Pada fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol dilakukan uji BSLT untuk menentukan fraksi yang paling aktif. Larutan uji disiapkan dengan membuat larutan induk 10.000 ppm dari tiap fraksi, kemudian dibuat pengenceran untuk membuat larutan induk kedua dan ketiga dengan konsentrasi 2000 ppm dan 1000 ppm. Dari larutan induk ketiga diencerkan dan dibuat larutan induk keempat dengan konsentrasi 100 ppm (Gambar 3.7). Selanjutnya dilakukan uji toksisitas seperti pada ekstrak dan data yang diperoleh dianalisis dengan program analisis regresi probit.

Pada fraksi-fraksi hasil pemisahan kolom dari fraksi M3 (fraksi ketiga ekstrak metanol), larutan uji disiapkan dengan membuat larutan induk 1000 ppm, kemudian diencerkan untuk membuat larutan induk kedua 100 ppm. Dari larutan induk kedua diencerkan untuk dibuat larutan induk ketiga 10 ppm (Gambar 3.8). Selanjutnya dilakukan uji toksisitas seperti pada ekstrak. Data yang diperoleh dianalisis dengan program analisis regresi probit.

3.4.7 Identifikasi golongan senyawa pada fraksi

Pada fraksi yang memiliki toksisitas paling baik (nilai LC_{50} terendah), dilakukan identifikasi golongan senyawa dengan pereaksi kimia.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Simplisia

Hasil determinasi tumbuhan yang dilakukan di Pusat Konservasi Tumbuhan – Kebun Raya Bogor LIPI menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan adalah daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl. suku Clusiaceae. Hasil determinasi tercantum dalam Lampiran 1. Determinasi dilakukan untuk mengetahui serta memastikan identitas dari bagian tumbuhan yang digunakan agar sesuai dengan bahan yang hendak diteliti.

Simplisia daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl diperoleh dari Kebun Raya Bogor dalam kondisi setengah kering. Kemudian simplisia dikeringkan lebih lanjut dengan oven suhu 40° C untuk menurunkan kadar airnya sehingga simplisia tidak mudah rusak akibat pertumbuhan kapang dan bakteri. Pengaturan pada suhu tersebut untuk menghindari kerusakan senyawa kimia yang terdapat dalam simplisia terutama senyawa kimia yang tidak tahan pada suhu tinggi. Serbuk daun kemudian ditimbang dan diperoleh bobot total 965 gram.

4.2 Ekstraksi

Hasil ekstraksi daun *G. porrecta* var. *schizogyna* dengan pelarut n-heksana, aseton dan metanol berturut-turut diperoleh rendemen ekstrak sebesar 3,96%, 7,93%, dan 7,76%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Ekstraksi dilakukan secara maserasi menggunakan pelarut yang kepolarannya meningkat mulai dari n-heksan yang non polar, kemudian aseton yang semi polar dan metanol yang paling polar. Dipilih ekstraksi secara maserasi untuk menghindari kerusakan senyawa yang terkandung dalam simplisia terutama senyawa yang tidak tahan suhu tinggi atau pemanasan. Proses maserasi dilakukan dengan cara perendaman serbuk daun sebanyak 900 gram dalam pelarut dengan perbandingan 10 bagian simplisia dalam 75 bagian pelarut selama 3 hari sambil dilakukan pengocokan dan diulangi hingga filtrat yang diperoleh berwarna agak bening. Hal itu dimaksudkan agar senyawa dalam simplisia dapat terekstraksi dengan optimal. Ekstraksi dilakukan dalam wadah botol ukuran 2,5 liter sebanyak 5 botol. Pada 4 botol masing-masing dimasukkan 200 gram serbuk simplisia, dan

satu botol dimasukkan 100 gram serbuk simplisia. Pada botol yang berisi 200 gram simplisia dimasukkan pelarut sebanyak 1,5 liter, pada botol berisi 100 gram simplisia dimasukkan 750 ml pelarut. Proses maserasi untuk satu macam pelarut diulang empat kali, sehingga total pelarut yang digunakan adalah sebanyak 30 liter. Sebagian pelarut yang digunakan diperoleh dari hasil evaporasi ekstrak menggunakan penguap putar vakum. Ekstraksi yang pertama menggunakan pelarut n-heksan yang bersifat non polar untuk menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non polar seperti asam lemak, sterol, kumarin, alkaloid dan beberapa senyawa terpenoid. Kemudian digunakan aseton yang mempunyai tingkat kepolaran menengah sebagai pelarut selanjutnya agar dapat mengekstraksi senyawa dengan kepolaran yang sesuai seperti flavonoid, tanin, dan beberapa alkaloid. Yang terakhir digunakan metanol yang mempunyai sifat polar agar dapat mengekstraksi senyawa dengan kepolaran yang tinggi seperti tanin, glikosida, dan beberapa alkaloid dan flavonoid terutama yang terikat dengan glikosida. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum pada suhu sekitar 50°C untuk mempercepat proses penguapan pelarut dan untuk menghindari kerusakan senyawa akibat suhu yang terlalu tinggi, hingga diperoleh ekstrak agak kental namun masih bisa mengalir. Selanjutnya masing-masing ekstrak diuapkan kembali dengan waterbath pada suhu kurang dari 60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut ditimbang dan diperoleh ekstrak n-heksana dengan bobot 35,6235 gram, ekstrak aseton 71,3789 gram, dan ekstrak metanol sebanyak 69,8483 gram. Kemudian dihitung rendemen dari masing-masing ekstrak tersebut dengan membandingkan bobot ekstrak kental dan bobot serbuk yang diekstraksi. Rendemen tertinggi yang diperoleh yaitu ekstrak aseton dengan nilai rendemen 7,93%, artinya senyawa dalam simplisia paling banyak tersari dalam pelarut aseton dibandingkan dalam pelarut n-heksana atau metanol.

4.3 Identifikasi Kandungan Kimia Serbuk dan Ekstrak

Hasil identifikasi serbuk simplisia menggunakan pereaksi kimia menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, saponin, dan tanin. Pada ekstrak n-heksana ditemukan adanya golongan senyawa flavonoid. Pada ekstrak aseton hasil positif ditunjukkan dengan pereaksi untuk senyawa flavonoid, dan

tanin. Sedangkan pada ekstrak metanol ditemukan adanya golongan senyawa flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

4.4 Uji BSLT Ekstrak

Data hasil uji toksisitas dengan BSLT pada masing-masing ekstrak n-heksana, aseton, dan metanol dimasukkan ke dalam program analisis regresi probit SPSS 15.0. (Lampiran 2) dan diperoleh nilai LC_{50} masing-masing ekstrak berturut-turut sebesar 1165,847 ppm; 1083,619 ppm; dan 564,424 ppm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Uji BSLT dimulai dengan penetasan telur *Artemia salina* pada air laut buatan. Digunakan air laut buatan karena lebih mudah diperoleh (bahan-bahan terdapat di laboratorium) dibandingkan air laut asli dan lebih mudah menyesuaikan kondisi media sesuai kondisi optimum penetasan larva *Artemia salina*. Sebelum penetasan telur untuk uji dilakukan optimasi media penetasan dengan cara menetasakan telur *Artemia salina* dalam media air laut buatan dengan komposisi tertentu dan dibiarkan selama seminggu. Media yang digunakan adalah media dimana larva *Artemia salina* dapat bertahan hidup selama 5 hari. Media air laut buatan dibuat dengan melarutkan 30 g/L NaCl dan 0,15 g/L $NaHCO_3$ dalam Aquadest. Pemilihan media berdasarkan lingkungan hidup *Artemia salina* yang mampu bertahan hidup pada salinitas antara 20-30‰ sehingga telur dalam kondisi tersuspensi dalam air laut dan bisa menetas dengan normal. pH air laut juga harus dipertahankan di atas 7, karena itu pada media ditambahkan sedikit $NaHCO_3$ untuk menjaga pH pada kisaran 8 hingga 9. Penetasan dilakukan pada kondisi suhu di atas 25° C atau sesuai suhu ruang, diberikan aerasi dengan aerator untuk menjaga kadar oksigen pada media dan disinari dengan lampu untuk merangsang proses penetasan. Telur *Artemia salina* tersebut menetas pada waktu 16 hingga 24 jam. Setelah telur menetas proses aerasi dihentikan. Larva *A.salina* yang digunakan adalah yang berumur 48 jam dimulai dari penetasan, atau 24 jam setelah larva menetas, karena pada umur itu larva *A. salina* masih peka terhadap zat-zat toksik sehingga baik untuk percobaan.

Penyiapan larutan uji untuk ekstrak dibuat dengan menimbang sebanyak 50 mg dari masing-masing ekstrak dan masing-masing dilarutkan dalam pelarut

yang sesuai sebanyak 5 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm. Untuk ekstrak n-heksana dan aseton dilarutkan dalam pelarut aseton karena pelarut aseton dapat melarutkan ekstrak dan mudah menguap. Untuk membantu pelarutan ekstrak n-heksana dalam aseton dilakukan pengocokan dengan ultrasonik bronson. Untuk ekstrak metanol dilarutkan dalam pelarut metanol. Setelah larutan induk pertama (10.000 ppm) selesai dibuat, dilakukan pengenceran untuk membuat larutan induk kedua (1000 ppm) dengan mengambil sebanyak 0,5 mL larutan induk pertama dan ditambahkan pelarut hingga 5 mL. Dari larutan induk kedua dilakukan pengenceran kembali dengan mengambil 0,5 mL larutan induk kedua dan ditambahkan pelarut hingga 5 mL, sehingga diperoleh larutan induk ketiga dengan konsentrasi 100 ppm.

Larutan uji yang dibuat untuk uji BSLT adalah larutan uji dengan konsentrasi 1000, 100, dan 10 ppm dalam total media, yaitu air laut buatan, sebanyak 5 mL. Karena itu, dari masing-masing larutan induk diambil 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam vial uji lalu diuapkan hingga kering. Pelarut dalam sampel harus benar-benar kering agar tidak mempengaruhi uji toksisitas dengan BSLT. Masing-masing konsentrasi dibuat dalam tiga vial. Dibuat juga tiga vial kontrol yang hanya berisi pelarut sejumlah pelarut dalam sampel yang dimasukkan ke vial uji (0,5 mL) dan diuapkan hingga kering.

Setelah larutan uji dalam vial kering, pada masing-masing vial ditambahkan sedikit air laut buatan hingga sampel tercampur atau larut. Sampel yang sukar larut seperti sampel dari ekstrak n-heksana dan ekstrak aseton, untuk melarutkannya dibantu dengan DMSO 1- 2 tetes sebelum ditambahkan sedikit air laut buatan, karena diketahui DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar dan mempunyai toksisitas rendah sehingga penambahannya yang sedikit bisa membantu kelarutan namun tidak mempengaruhi uji BSLT. Kemudian pada masing-masing vial dimasukkan larva udang sebanyak 10 ekor dengan menggunakan pipet. Untuk membantu penghitungan larva udang yang dimasukkan dalam vial digunakan lampu sehingga larva lebih terlihat. Setelah larva dimasukkan, volume larutan dicukupkan sebanyak 5 mL dengan media air laut buatan.

Hasil uji toksisitas diamati setelah 24 jam dengan mengamati jumlah larva yang mati dalam vial. Larva yang mati terlihat dari tidak adanya pergerakan dari larva yang berada di dasar vial, atau bisa juga dengan menghitung jumlah larva yang hidup dan larva yang mati dihitung dari jumlah total larva yang dimasukkan dikurangi jumlah larva yang hidup. Jumlah kematian larva masing-masing vial dicatat dan dilakukan perhitungan untuk mengetahui nilai LC_{50} -nya. Penghitungan LC_{50} dengan metode analisis probit menggunakan program komputer SPSS 15.0. Dari perhitungan menggunakan program SPSS 15.0 diperoleh ekstrak yang memiliki sifat toksik adalah ekstrak metanol dengan nilai LC_{50} sebesar 564,424 ppm, sedangkan ekstrak n-heksan dan aseton dinilai tidak toksik karena nilai LC_{50} -nya lebih besar dari 1000 ppm (Harmita & Radji, 2008).

4.5 Pemisahan Ekstrak Metanol secara Kromatografi Cair Vakum

Pemisahan ekstrak metanol secara kromatografi cair vakum menggunakan fase diam silika gel 60 H dan fase gerak campuran n-heksana – etil asetat dan etil asetat – metanol dengan kepolaran meningkat. Diperoleh fraksi sebanyak 33 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut diperiksa dengan KLT, diperoleh 10 fraksi hasil penggabungan yaitu fraksi M1 (1-5), M2 (6-7), M3 (8), M4 (9-11), M5 (12-14), M6 (15-16), M7 (17-19), M8 (20-21), M9 (22-26), dan M10 (27-33).

Kromatografi cair vakum dikemas dengan cara kering dan dipadatkan menggunakan pompa vakum. Pompa vakum memberikan tekanan sedang yang dapat mempercepat proses elusi. Metode ini dipilih karena dinilai efisien untuk pemisahan awal ekstrak karena dapat menghasilkan pemisahan yang baik dalam waktu yang relatif cepat. Pemisahan dilakukan terhadap 20 g ekstrak metanol dengan pengelusian landaian bertahap menggunakan fase gerak campuran n-heksan-etil asetat (100:0, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100) dan etil asetat – metanol (95:05, 90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 0:100). Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian diperiksa dengan kromatografi lapis tipis, bercak yang sama dari fraksi-fraksi tersebut kemudian digabung sehingga diperoleh 10 fraksi (fraksi M1-M10).

4.6 Uji BSLT Fraksi

Pada masing-masing fraksi hasil pemisahan ekstrak dilakukan uji BSLT untuk mengetahui toksisitas dari masing-masing fraksi, diperoleh semua fraksi memberikan nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm dengan kisaran nilai antara 75 hingga 423 ppm, artinya semua fraksi memiliki sifat toksik. Fraksi yang paling aktif (nilai LC_{50} terendah) adalah fraksi M3 dengan nilai LC_{50} sebesar 75,366 ppm. Hasil uji BSLT tiap fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.4.

4.7 Pemisahan Fraksi M3 dengan Kromatografi Kolom

Fraksi M3 yang memiliki toksisitas tertinggi dilakukan pemisahan untuk pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom. Fraksi M3 merupakan fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol menggunakan fase gerak campuran n-heksana dan etil asetat yang cenderung bersifat nonpolar sehingga dapat disimpulkan fraksi M3 merupakan fraksi dengan kepolaran menengah atau semi polar. Fase diam yang digunakan untuk pemisahan menggunakan kromatografi kolom terbuka ini adalah silika gel 60 dengan fase gerak yang kepolarannya meningkat yang terdiri campuran n-heksan – etil asetat dengan perbandingan 100:3, 100:5, 99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 88:12, 85:15, 82:18, 80:20, 78:22, 75: 25, dan 70:30. Kepolaran dinaikkan secara perlahan agar diperoleh pemisahan senyawa yang baik. Fraksi yang diperoleh sebanyak 38 fraksi. Pada seluruh fraksi dilakukan KLT dan fraksi dengan pola bercak yang sama digabungkan sehingga diperoleh fraksi gabungan sebanyak 5 fraksi, yaitu fraksi M3₁ (1-15), M3₂ (16-27), M3₃ (28-31), M3₄ (32-34), dan M3₅ (35-38). Di antara fraksi-fraksi hasil pemisahan belum diperoleh fraksi dengan bercak tunggal, karena itu belum didapatkan senyawa murni dari hasil pemisahan.

4.8 Uji BSLT Hasil Pemisahan Fraksi M3

Pada fraksi M3₁-M3₅ dilakukan uji BSLT untuk mengetahui fraksi yang paling aktif. Hasil uji menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki aktivitas dengan kisaran nilai LC_{50} antara 9 hingga 43 ppm. Dari seluruh fraksi, fraksi M3₁ memiliki sifat toksik yang tertinggi ($LC_{50} = 9,568$ ppm). Hasil uji BSLT fraksi M3₁-M3₅ dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.9 Identifikasi Kandungan Kimia Fraksi Aktif

Berdasarkan hasil identifikasi fraksi yang aktif dari pemisahan fraksi M3, yaitu fraksi M3₁ menggunakan pereaksi kimia disimpulkan bahwa pada fraksi M3₁ terkandung senyawa flavonoid. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian terhadap daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Ekstrak metanol memiliki sifat toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} sebesar 564,424 ppm. Sedangkan ekstrak n-heksana dan aseton tidak memiliki sifat toksik karena nilai LC_{50} -nya lebih dari 1000 ppm.
- b. Fraksi M3 yang diperoleh dari fraksinasi ekstrak metanol memiliki toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 75,366 ppm. Fraksinasi selanjutnya dari fraksi M3 diperoleh fraksi M3₁ yang memiliki toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 9,568 ppm. Fraksi M3₁ mengandung golongan senyawa flavonoid.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi senyawa murni dari ekstrak daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl dan identifikasi senyawa murni isolat. Juga perlu dilakukan uji sitotoksik lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker.

DAFTAR ACUAN

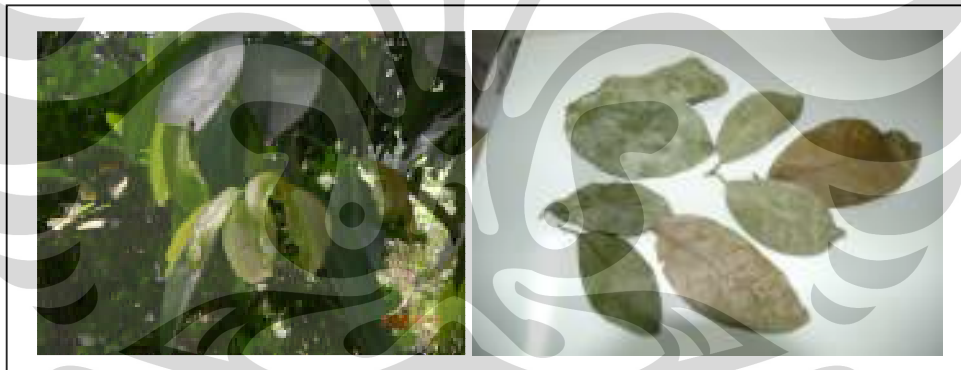
- Cuilei, J. (1984). *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs*. Bucharest, Rumania: Faculty of Pharmacy.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Emslie, S. (2003). "*Artemia salina*" (On-line), *Animal Diversity Web*. 25 August 2009.
http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia_salina.html.
- Elya, B. (2003). "Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Kimia dari ekstrak n-Heksan Kulit Batang *Garcinia rigida*". *Makara, Sains*, 7(2), 45-50.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.E. (1985). *Pengantar Kromatografi* (Padmawinata K., Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Gunawan, D. dan Mulyani, S.. (2004). *Ilmu Obat alam (Farmakognosi) Jilid I*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Padmawinata K., Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Hariyati, Sri. (2005, Juli). Standardisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia. *InfoPOM*, 6(4), 1-5.

- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita, dan Radji, Maksum. (2008). *Buku Ajar Analisis Hayati*. (Ed. ke-3). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Indonesian Institute of Sciences, Bogor Botanical Gardens. (2007). *Index Seminum Botanical Gardens of Indonesia 2007-2009*. Bogor: Indonesian Institute of Sciences.
- ITIS. (n.d.). *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). 18 Juli 2010. <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/>
- Jansen, PCM. (1991). *Garcinia L.* In *PROSEA (Plant Resources of South East Asia) No.2: Edible Fruits and Nuts*. Bogor.
- Kardono, L. B. S., Hanafi, M., Sherley, G., Kosela, S, and Harrison, L. J. (2006). "Bioactive Constituents of *G. porrecta* and *G. parvifolia* grown in Indonesia"., *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(3), 483-486.
- Kisangau, D. P., Lyaruul, H. V. M., Hosea, K. M., Joseph, C. C. (2007). "Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district". *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(29).
- Kosela, S, Hu LH, Rachmatiah T, Hanafi M, Sim KY. (2000). Dulxanthones F-H, Three New Pyranoxanthones from *Garcinia dulcis*. *J. Nat. Prod.* 63: 406-407.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L., and Anderson, J. E. (1998). "The Use of Biological Assays to Evaluate Botanical". *Drug Information Jurnal*, 32, 513-524.
- Peng Bo, Hu Qin, Liu Xinmin, Liwei Wang, Chang Qi, Li Jianrong, Tang Jintian, Wang Ning, and Wang Yuqi. (2009). "Duchesnea Phenolic Fraction Inhibits In Vitro and In Vivo Growth of Cervical Cancer Through Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest". *Society for Experimental Biology and medicine*, 74-83.
- Purwakusuma, W. (2002). *Artemia salina (Brine Shrimp)*. 25 Agustus 2009. www.o-fish.com/PakanIkan/artemia.htm.

- Rafaela, TA, Elisa VA, de Jesus PHJ, Aurelio LL, Antonio QRM, Veronica OM and Rodolfo VL. (2006). "Toxic Activity of Different Extracts and Fractions on Brine Shrimp, *Artemia salina*". *Pharmacologyonline*, 3, 824-829.
- Sari, R. dan Hanan, A. (2000). "*Garcinia* (Clusiaceae) di Kebun Raya Bogor: Fisiognomi, Keragaman, dan Potensi". Prosiding Seminar Sehari : Menggali Potensi dan Meningkatkan Prospek Tanaman Hortikultura Menuju Ketahanan Pangan, 65-75.
- Sarker, D.S, Latif, Z, dan Gray, I, A. (Ed.). (2006). *Natural Product Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Syamsudin, Tjokrosonto, S., Wahyuono, S., Mustofa. (2007). "Aktivitas Antiplasmodium dari Dua Fraksi Ekstrak N-heksana Kulit Batang Asam Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq)". *Majalah Farmasi Indonesia*, 18(4), 210 – 215.
- Tawaha, K. A. (2004). "Cytotoxicity Evaluation of Jordanian Wild Plants using Brine Shrimp Lethality Test". *J. J. Appl. Sci.*, 8(1), 12-17.
- Wahyuono, S dan Rahman A. (1995). Uji Toksisitas Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia dengan Brine Shrimp Lethal Test (BST). *Majalah Farmasi Indonesia*. 6(4), 108-114.
- WHO (2008, December). Traditional Medicine. *WHO Media Centre Fact Sheet*, 134. April 2, 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>



Gambar 2.1. Tumbuhan *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl

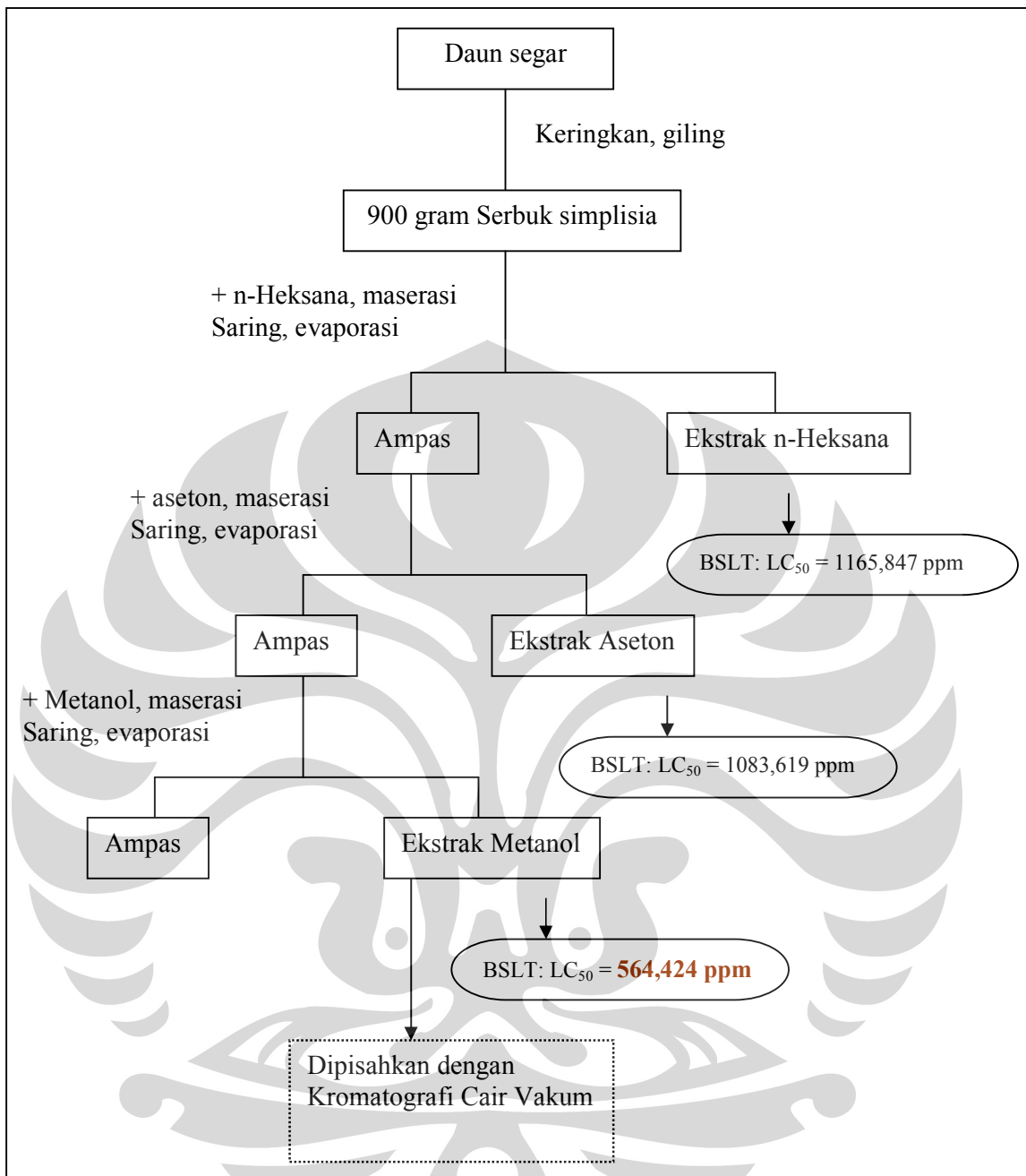


Gambar 2.2. Daun *Garcinia porrecta* Wall var. *schizogyna* Boerl

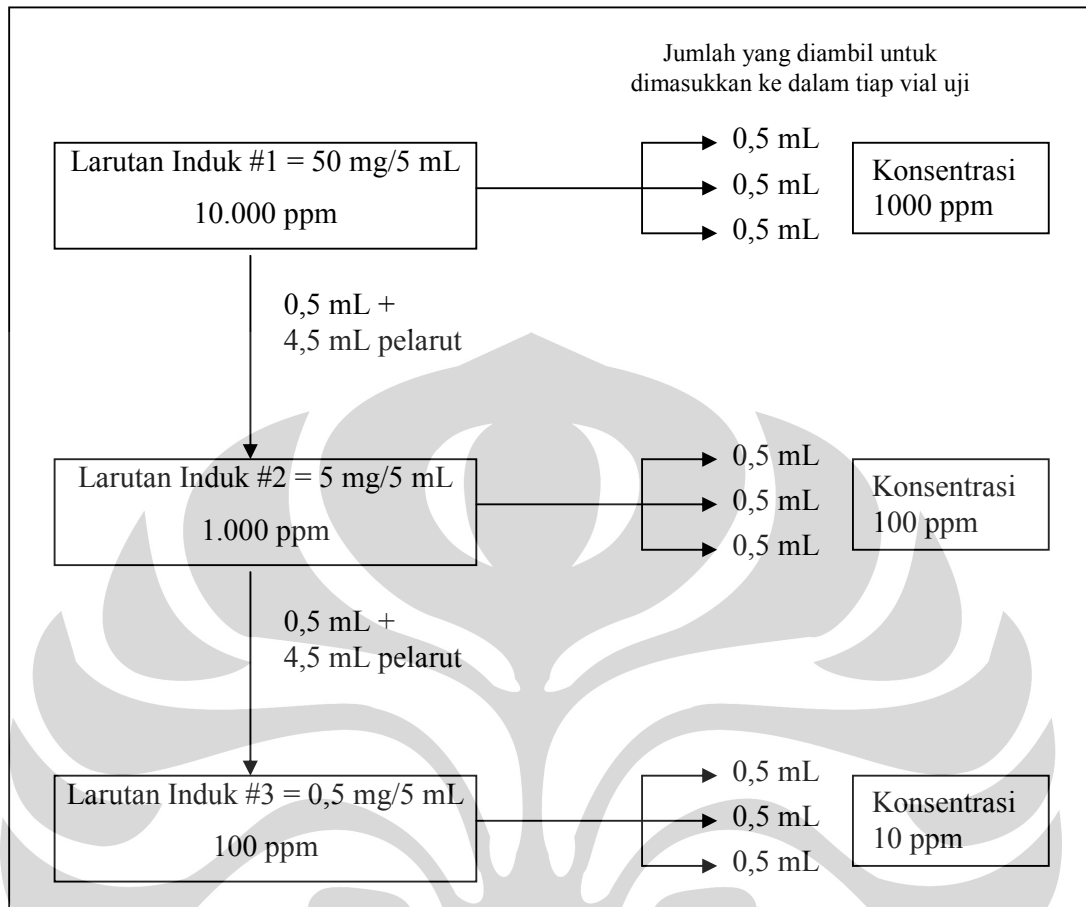


[Sumber: Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center - Ghent University, Belgium]

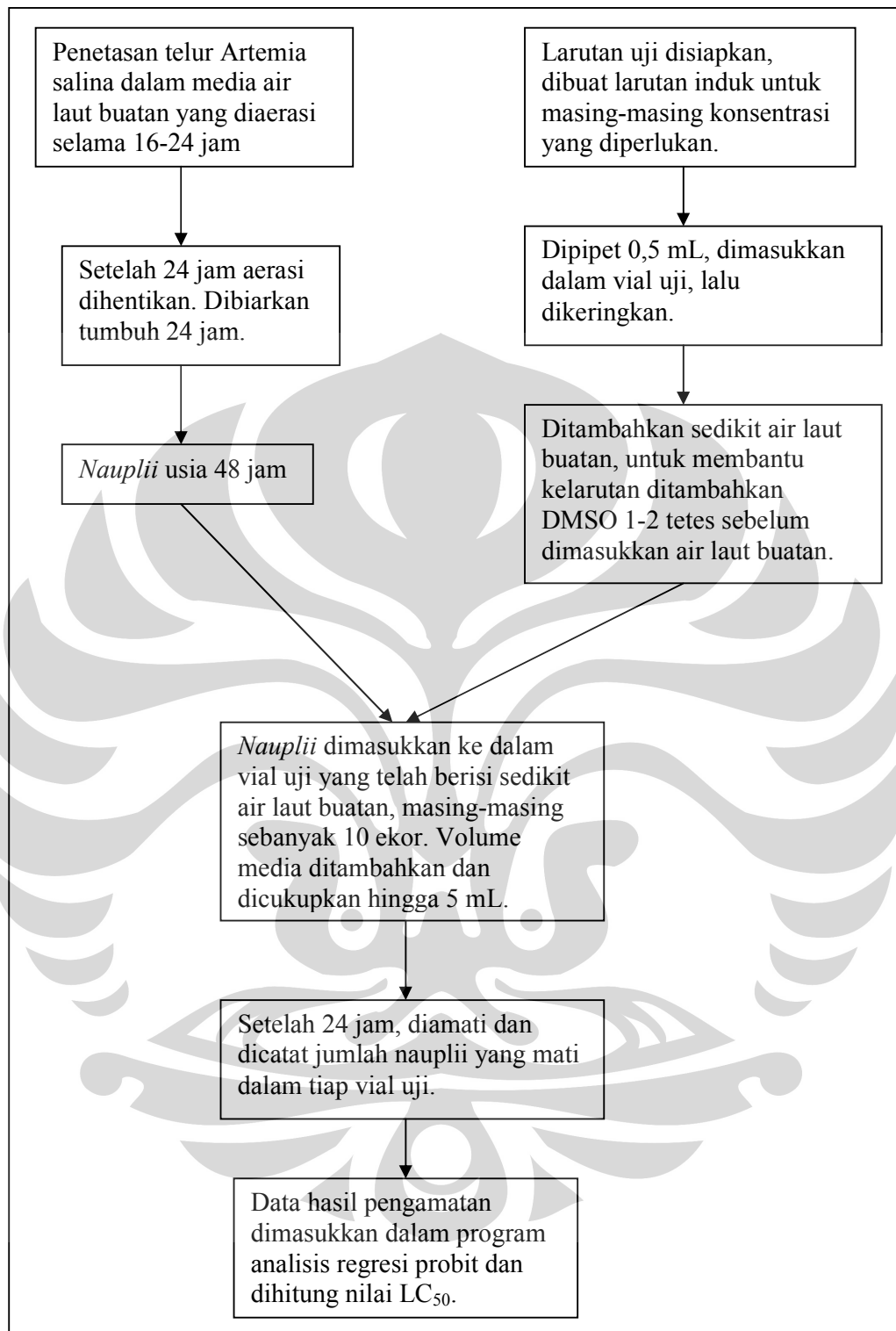
Gambar 2.3. Larva udang (*nauplii*) *Artemia salina*.



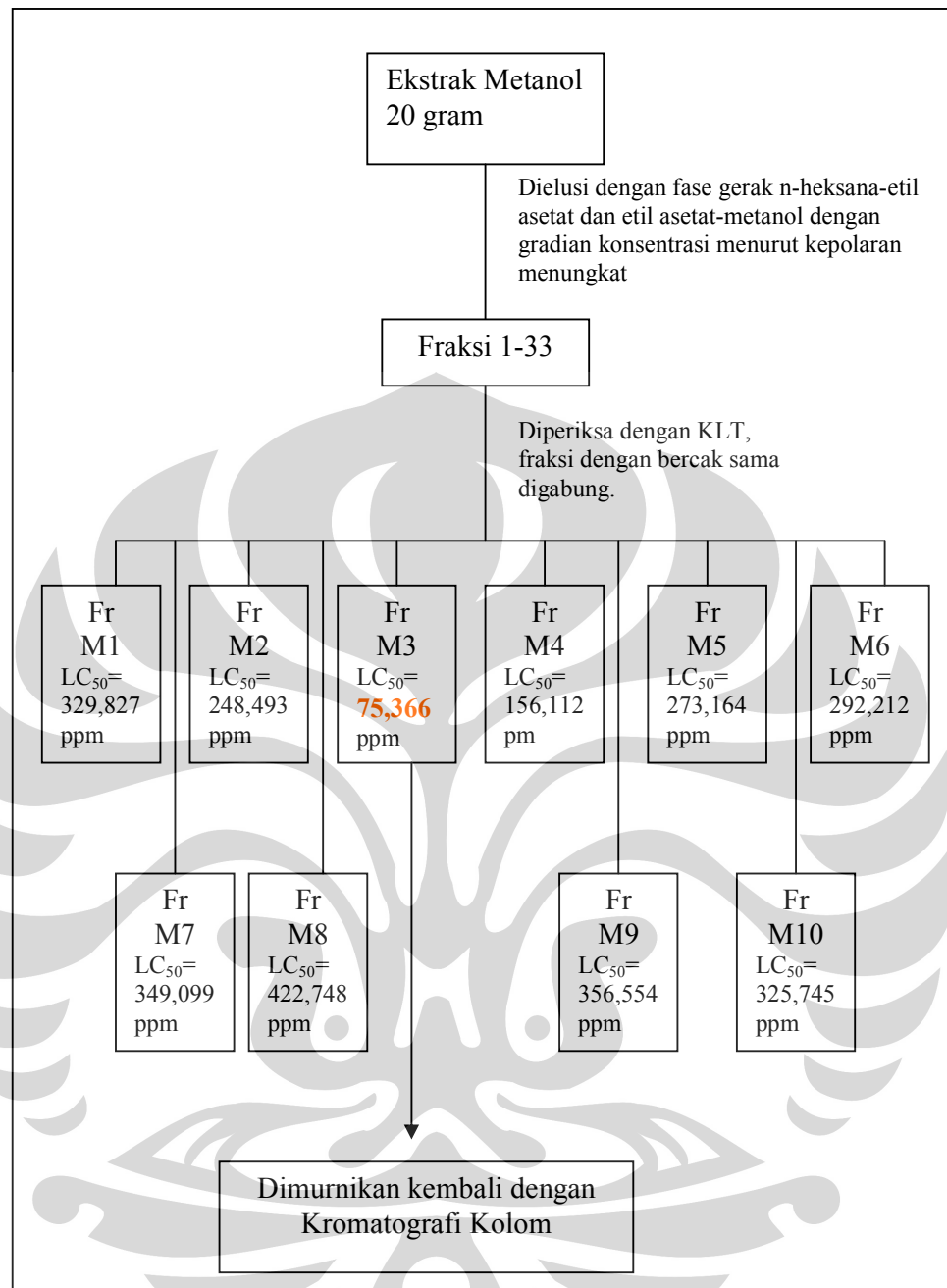
Gambar 3.2. Bagan ekstraksi simplisia daun *Garcinia porrecta* var. *schizogyna*



Gambar 3.3. Bagan Penyiapan Larutan Uji untuk BSLT dari Ekstrak



Gambar 3.4. Bagan uji toksisitas metode BSLT

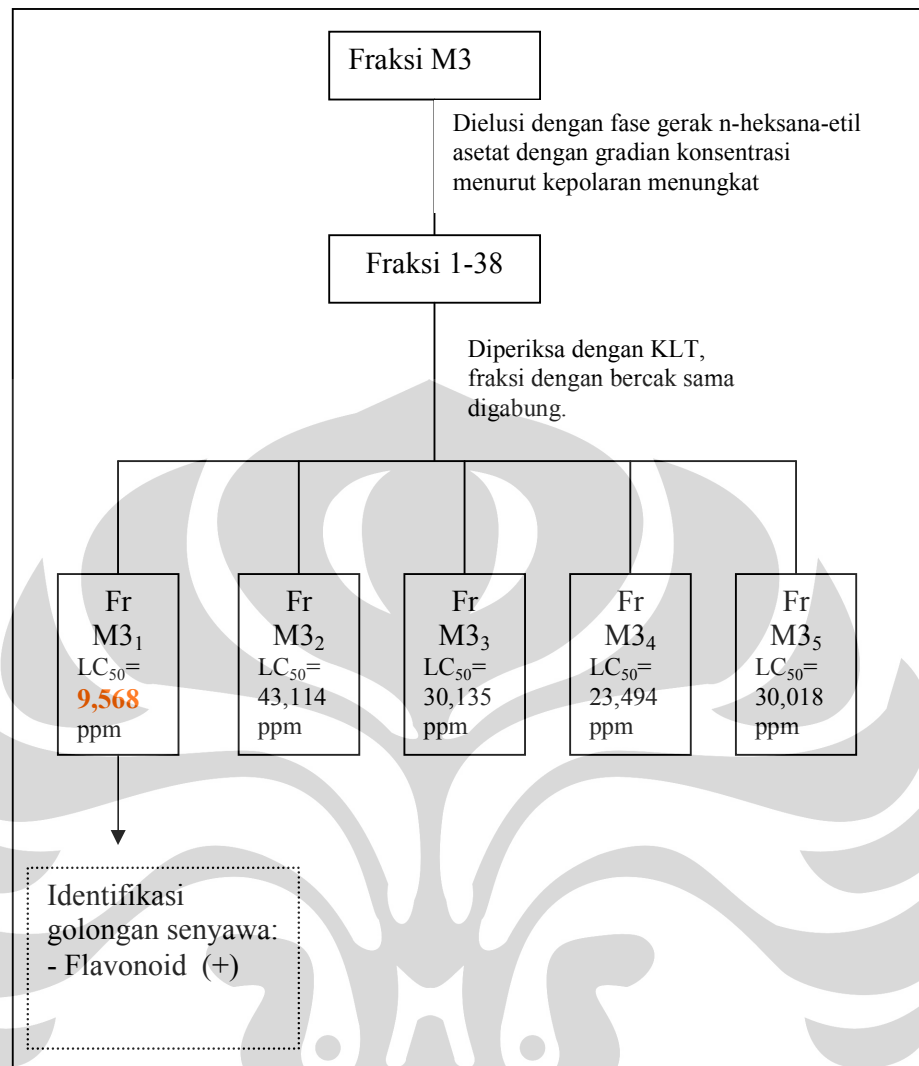


Keterangan:

M1 = Fraksi kesatu ekstrak metanol
 M2 = Fraksi kedua ekstrak metanol
 M3 = Fraksi ketiga ekstrak metanol
 M4 = Fraksi keempat ekstrak metanol
 M5 = Fraksi kelima ekstrak metanol

M6 = Fraksi keenam ekstrak metanol
 M7 = Fraksi ketujuh ekstrak metanol
 M8 = Fraksi kedelapan ekstrak metanol
 M9 = Fraksi kesembilan ekstrak metanol
 M10 = Fraksi kesepuluh ekstrak metanol

Gambar 3.5. Bagan Pemisahan Ekstrak Metanol secara Kromatografi Cair Vakum



Keterangan:

M3₁ = Fraksi kesatu dari pemisahan fraksi M3

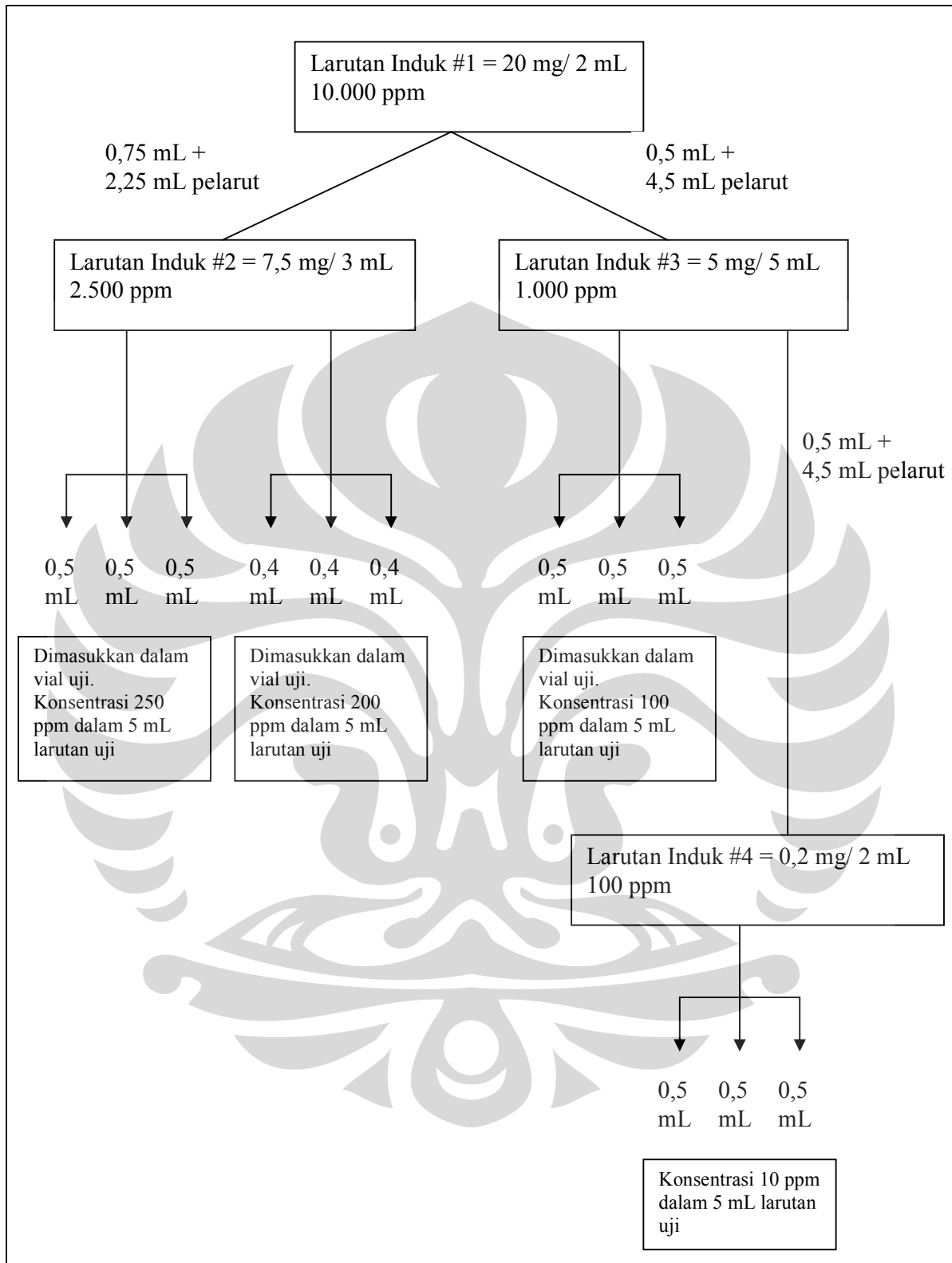
M3₂ = Fraksi kedua dari pemisahan fraksi M3

M3₃ = Fraksi ketiga dari pemisahan fraksi M3

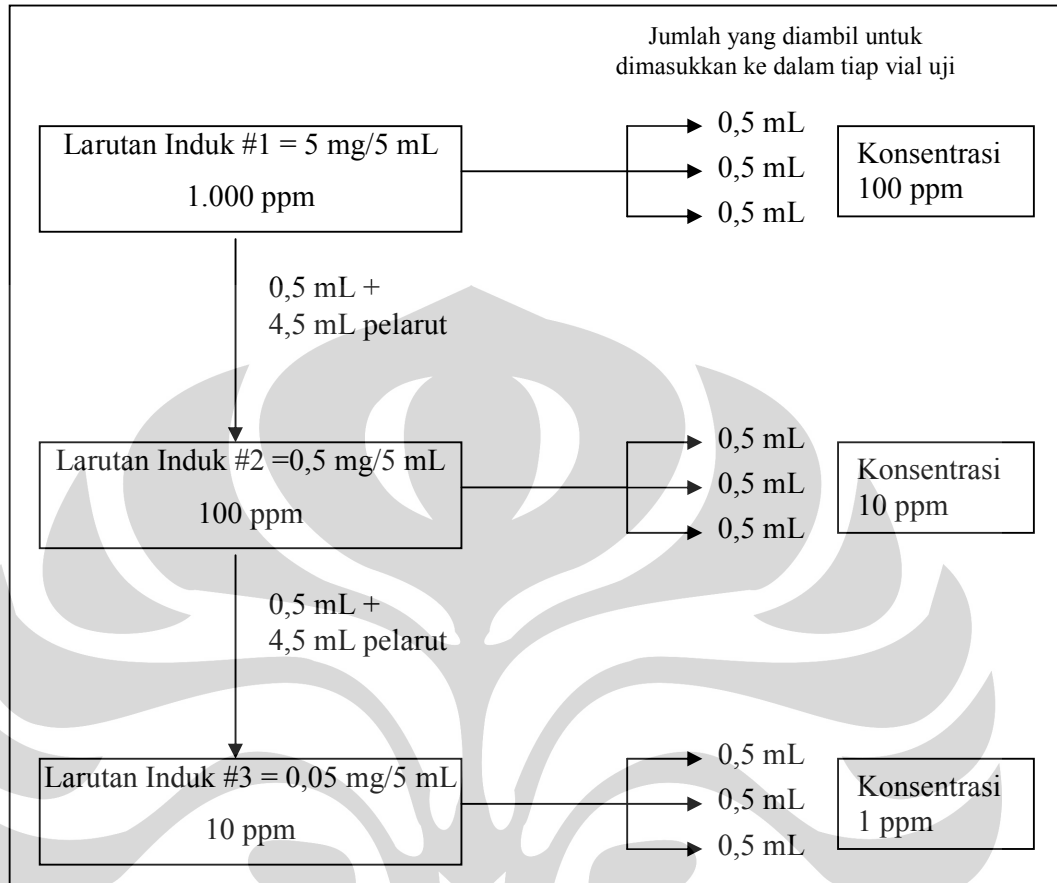
M3₄ = Fraksi keempat dari pemisahan fraksi M3

M3₅ = Fraksi kelima dari pemisahan fraksi M3

Gambar 3.6. Bagan Pemisahan Fraksi M3 secara kromatografi kolom



Gambar 3.7. Bagan penyiapan larutan uji untuk BSLT dari fraksi hasil pemisahan ekstrak



Gambar 3.8. Bagan Penyiapan Larutan Uji untuk BSLT dari fraksi hasil pemisahan fraksi M3

Tabel 4.1: Rendemen Ekstrak Daun *G. porrecta* var. *schizogyna*

Ekstrak	Bobot Simplisia (g)	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen Ekstrak (%)
n-Heksana	900	35,6235	3,96
Aseton	900	71,3789	7,93
Metanol	900	69,8483	7,76

Tabel 4.2: Hasil Pengamatan Identifikasi Serbuk dan Ekstrak

Kandungan Kimia	Serbuk Simplisia	Ekstrak n-Heksana	Ekstrak Aseton	Ekstrak Metanol	Fraksi M3₁
Alkaloid	-	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+	+
Saponin	+	-	-	+	-
Terpenoid/steroid	-	-	-	-	-
Tanin	+	-	+	+	-
Glikosida	-	-	-	-	-
Antrakinin	-	-	-	-	-

Tabel 4.3: Hasil Uji BSLT dan nilai LC₅₀ Ekstrak Daun *G. porrecta* var. *schizogyna*

Ekstrak	Respon (Jumlah Larva Udang yang Mati)												LC ₅₀ (ppm)
	Kontrol			10 ppm			100 ppm			1000 ppm			
n-Heksana	0	0	0	0	2	0	0	2	3	1	2	4	1165,847
Aseton	0	0	0	1	0	0	1	3	1	6	1	4	1083,619
Metanol	0	0	0	0	1	1	3	2	0	9	10	10	564,424

Tabel 4.4: Hasil Uji BSLT dan nilai LC₅₀ Hasil Fraksinasi Ekstrak Metanol

Fraksi	Respon (Jumlah Larva Udang yang Mati)															LC ₅₀ (ppm)
	Kontrol			10 ppm			100 ppm			200 ppm			250 ppm			
M1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	4	3	3	329,827
M2	0	0	0	1	1	1	3	3	4	2	3	4	4	2	3	248,493
M3	0	0	0	2	2	1	5	6	7	7	8	9	10	10	10	75,366
M4	0	0	0	2	1	2	4	4	4	8	5	5	7	8	6	156,112
M5	0	0	0	0	0	0	2	2	1	3	2	4	3	7	3	273,164
M6	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3	2	4	3	4	4	292,212
M7	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	0	3	1	2	349,099
M8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	422,748
M9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	1	3	356,554
M10	0	0	0	0	0	0	2	1	0	3	1	1	2	4	3	325,745

Keterangan:

M1 = Fraksi kesatu ekstrak metanol
 M2 = Fraksi kedua ekstrak metanol
 M3 = Fraksi ketiga ekstrak metanol
 M4 = Fraksi keempat ekstrak metanol
 M5 = Fraksi kelima ekstrak metanol

M6 = Fraksi keenam ekstrak metanol
 M7 = Fraksi ketujuh ekstrak metanol
 M8 = Fraksi kedelapan ekstrak metanol
 M9 = Fraksi kesembilan ekstrak metanol
 M10 = Fraksi kesepuluh ekstrak metanol

Tabel 4.5: Hasil Uji BSLT dan nilai LC₅₀ Hasil Pemisahan Fraksi M3

Fraksi	Respon (Jumlah Larva Udang yang Mati)												LC ₅₀ (ppm)
	Kontrol			1 ppm			10 ppm			100 ppm			
M3 ₁	0	0	0	4	5	4	7	7	3	10	8	7	9,568
M3 ₂	0	0	0	1	3	2	3	5	3	9	8	8	43,114
M3 ₃	0	0	0	1	1	2	6	6	6	8	8	9	30,135
M3 ₄	0	0	0	4	4	4	5	7	5	7	7	7	23,494
M3 ₅	0	0	0	1	5	3	6	4	3	9	8	8	30,018

Keterangan:

M3₁ = Fraksi kesatu dari pemisahan fraksi M3

M3₂ = Fraksi kedua dari pemisahan fraksi M3

M3₃ = Fraksi ketiga dari pemisahan fraksi M3

M3₄ = Fraksi keempat dari pemisahan fraksi M3

M3₅ = Fraksi kelima dari pemisahan fraksi M3

Lampiran 1



Lampiran 2

Data analisis probit untuk ekstrak daun *G. porrecta* var. *Schizogyna* menggunakan SPSS 15.0

Probit Analysis**Notes**

Output Created		30-MAY-2010 15:01:44
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT Kematan OF Total BY Ekstrak(1 3) WITH Konsentrasi /LOG NONE /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI RMP /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1) .
Resources	Elapsed Time	0:00:01.15
	Processor Time	0:00:00.58

[DataSet0]

Data Information

		N of Cases
Valid		27
Rejected	Out of Range(a)	0
	Missing	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0
Ekstrak	1	9
	2	9
	3	9

a Cases rejected because of out of range group values.

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	16	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT(a) Konsentrasi	.001	.000	7.196	.000	.001	.002
Intercept (b) 1	-1.708	.205	-8.346	.000	-1.912	-1.503
2	-1.587	.201	-7.896	.000	-1.788	-1.386
3	-.827	.170	-4.870	.000	-.997	-.657

a PROBIT model: $PROBIT(p) = Intercept + BX$
 b Corresponds to the grouping variable Ekstrak.

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df(a)	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	57.762	23	.000(b)

a Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.
 b Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

No	Ekstrak	Konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1	n-heksana	10.000	10	0	.452	-.452	.045
2	n-heksana	10.000	10	2	.452	1.548	.045
3	n-heksana	10.000	10	0	.452	-.452	.045
4	n-heksana	100.000	10	0	.592	-.592	.059
5	n-heksana	100.000	10	2	.592	1.408	.059
6	n-heksana	100.000	10	3	.592	2.408	.059
7	n-heksana	1000.000	10	1	4.040	-3.040	.404
8	n-heksana	1000.000	10	2	4.040	-2.040	.404
9	n-heksana	1000.000	10	4	4.040	-.040	.404
10	aseton	10.000	10	1	.579	.421	.058
11	aseton	10.000	10	0	.579	-.579	.058
12	aseton	10.000	10	0	.579	-.579	.058
13	aseton	100.000	10	1	.748	.252	.075
14	aseton	100.000	10	3	.748	2.252	.075
15	aseton	100.000	10	1	.748	.252	.075

(lanjutan)

50

16	aseton	1000.000	10	6	4.513	1.487	.451
17	aseton	1000.000	10	1	4.513	-3.513	.451
18	aseton	1000.000	10	4	4.513	-.513	.451
19	metanol	10.000	10	0	2.084	-2.084	.208
20	metanol	10.000	10	1	2.084	-1.084	.208
21	metanol	10.000	10	1	2.084	-1.084	.208
22	metanol	100.000	10	3	2.482	.518	.248
23	metanol	100.000	10	2	2.482	-.482	.248
24	metanol	100.000	10	0	2.482	-2.482	.248
25	metanol	1000.000	10	9	7.383	1.617	.738
26	metanol	1000.000	10	10	7.383	2.617	.738
27	metanol	1000.000	10	10	7.383	2.617	.738

Confidence Limits

Ekstrak	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT (a)	1	.010	-422.389	-1386.112	28.501
		.020	-236.281	-1069.485	181.579
		.030	-118.202	-872.882	282.989
		.040	-29.375	-727.827	362.117
		.050	42.878	-611.996	428.642
		.060	104.377	-515.166	487.026
		.070	158.300	-431.759	539.711
		.080	206.581	-358.380	588.186
		.090	250.491	-292.800	633.427
		.100	290.911	-233.472	676.110
		.150	458.257	.410	864.583
		.200	591.258	171.499	1029.166
		.250	705.362	307.498	1181.145
		.300	807.830	421.566	1325.691
		.350	902.783	521.106	1465.794
		.400	992.883	610.753	1603.546
		.450	1080.056	693.646	1740.663
		.500	1165.847	772.082	1878.750
		.550	1251.638	847.877	2019.476
		.600	1338.812	922.616	2164.748
	.650	1428.912	997.841	2316.922	
	.700	1523.864	1075.260	2479.147	
	.750	1626.333	1157.035	2655.984	
	.800	1740.436	1246.322	2854.675	
	.850	1873.438	1348.493	3088.178	
	.900	2040.784	1474.760	3384.264	
	.910	2081.203	1504.943	3456.092	
	.920	2125.113	1537.612	3534.245	
	.930	2173.394	1573.398	3620.313	
	.940	2227.317	1613.210	3716.594	
	.950	2288.816	1658.430	3826.586	

(lanjutan)

51

	.960	2361.070	1711.330	3956.043
	.970	2449.896	1776.058	4115.498
	.980	2567.976	1861.645	4327.923
	.990	2754.084	1995.649	4663.625
2	.010	-504.618	-1520.031	-43.370
	.020	-318.510	-1199.866	106.170
	.030	-200.430	-1000.331	204.648
	.040	-111.604	-852.623	281.123
	.050	-39.350	-734.307	345.163
	.060	22.149	-635.108	401.177
	.070	76.072	-549.419	451.581
	.080	124.353	-473.832	497.847
	.090	168.263	-406.108	540.945
	.100	208.682	-344.696	581.544
	.150	376.028	-101.230	760.432
	.200	509.030	78.061	916.815
	.250	623.133	220.901	1061.953
	.300	725.602	340.567	1200.900
	.350	820.554	444.642	1336.468
	.400	910.655	537.950	1470.559
	.450	997.828	623.806	1604.713
	.500	1083.619	704.653	1740.388
	.550	1169.410	782.425	1879.138
	.600	1256.583	858.799	2022.775
	.650	1346.684	935.389	2173.583
	.700	1441.636	1013.960	2334.656
	.750	1544.104	1096.718	2510.510
	.800	1658.208	1186.855	2708.352
	.850	1791.209	1289.772	2941.108
	.900	1958.555	1416.714	3236.520
	.910	1998.975	1447.026	3308.219
	.920	2042.885	1479.823	3386.244
	.930	2091.166	1515.737	3472.184
	.940	2145.089	1555.677	3568.336
	.950	2206.588	1601.027	3678.199
	.960	2278.841	1654.059	3807.523
	.970	2367.668	1718.926	3966.839
	.980	2485.747	1804.663	4179.115
	.990	2671.855	1938.840	4514.644
3	.010	-1023.812	-2279.284	-500.389
	.020	-837.704	-1949.114	-360.855
	.030	-719.625	-1741.299	-270.657
	.040	-630.798	-1586.063	-201.709
	.050	-558.545	-1460.628	-144.788
	.060	-497.045	-1354.555	-95.648
	.070	-443.123	-1262.147	-51.964
	.080	-394.841	-1179.941	-12.315
	.090	-350.931	-1105.667	24.232
	.100	-310.512	-1037.752	58.328

(lanjutan)

52

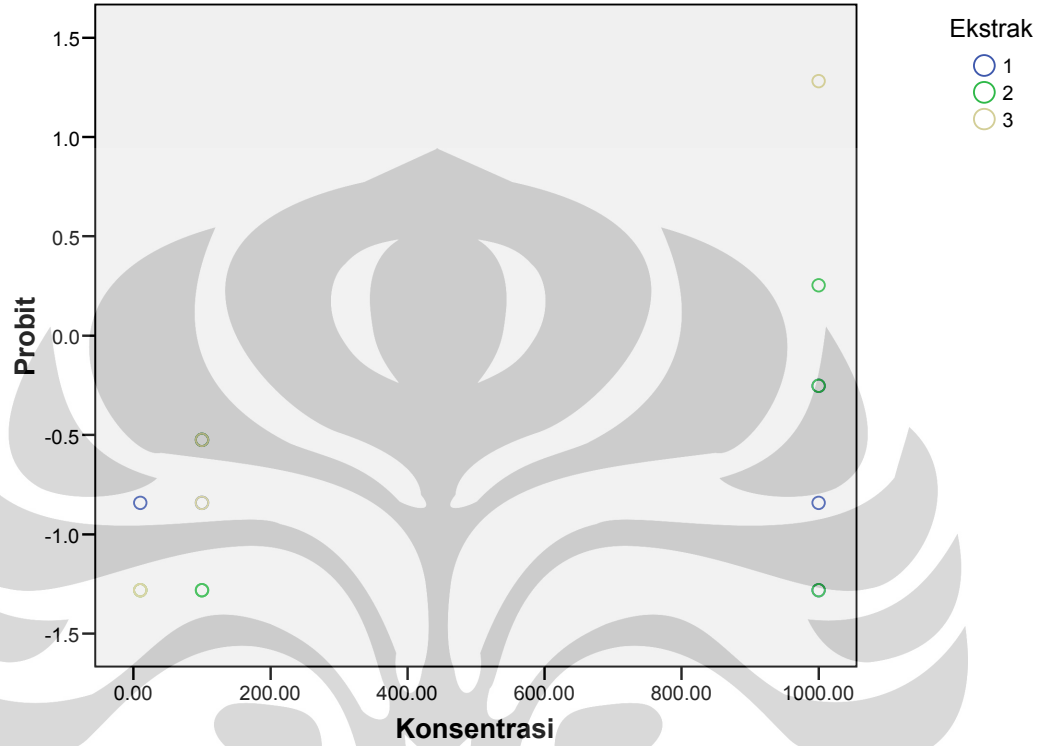
.150	-143.166	-762.186	205.115
.200	-10.164	-551.521	330.124
.250	103.939	-378.627	445.208
.300	206.407	-230.946	556.140
.350	301.360	-101.452	666.290
.400	391.460	14.368	777.868
.450	478.633	119.769	892.477
.500	564.424	217.327	1011.441
.550	650.215	309.240	1136.051
.600	737.389	397.505	1267.796
.650	827.489	484.076	1408.624
.700	922.441	571.034	1561.309
.750	1024.910	660.874	1730.083
.800	1139.013	757.037	1921.898
.850	1272.015	865.152	2149.456
.900	1439.361	996.684	2440.277
.910	1479.780	1027.864	2511.109
.920	1523.690	1061.519	2588.276
.930	1571.972	1098.284	2673.365
.940	1625.894	1139.073	2768.667
.950	1687.393	1185.279	2877.675
.960	1759.647	1239.184	3006.126
.970	1848.474	1304.956	3164.537
.980	1966.553	1391.668	3375.838
.990	2152.661	1526.982	3710.228

a A heterogeneity factor is used.

Relative Median Potency Estimates

	(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	95% Confidence Limits		
			Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	1	2	82.228	-496.322	705.593
		3	601.423	77.154	1536.564
	2	1	-82.228	-705.593	496.322
		3	519.194	7.774	1396.673
	3	2	-519.194	-1396.673	-7.774
		1	-601.423	-1536.564	-77.154

Probit Transformed Responses



Lampiran 3

Data analisis probit untuk fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol menggunakan SPSS 15.0

Probit Analysis

Notes

Output Created		20-MAY-2010 10:11:13
Comments		
Input	Data	C:\Documents and Settings\T I A\Desktop\tia.sav
	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	150
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		<pre> PROBIT Kematian OF Total BY Fraksi(1 10) WITH Konsentrasi /LOG NONE /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI RMP /CRITERIA P(.15) ITERATE(30) STEPLIMIT(.1) . </pre>
Resources	Elapsed Time	0:00:00.90
	Processor Time	0:00:00.65

[DataSet0] C:\Documents and Settings\T I A\Desktop\tia.sav

Data Information

		N of Cases
Valid		120
Rejected	Out of Range(a)	0
	Missing	30
	Number of Responses > Number of Subjects	0

(lanjutan)

Control Group		0
Fraksi	1	12
	2	12
	3	12
	4	12
	5	12
	6	12
	7	12
	8	12
	9	12
	10	12

a Cases rejected because of out of range group values.

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	26	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error		Z	Sig.	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
PROBIT (a) Konsentrasi	.007	.001		11.512	.000	.006	.008
Intercept (b) 1	-2.275	.196		-11.634	.000	-2.471	-2.080
2	-1.714	.163		-10.525	.000	-1.877	-1.551
3	-.520	.149		-3.489	.000	-.669	-.371
4	-1.077	.151		-7.135	.000	-1.228	-.926
5	-1.884	.175		-10.795	.000	-2.059	-1.709
6	-2.015	.180		-11.211	.000	-2.195	-1.836
7	-2.408	.199		-12.107	.000	-2.607	-2.209
8	-2.916	.247		-11.803	.000	-3.163	-2.669
9	-2.459	.207		-11.894	.000	-2.666	-2.252
10	-2.247	.191		-11.751	.000	-2.438	-2.055

a PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$

b Corresponds to the grouping variable Fraksi.

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df(a)	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	77.517	109	.990(b)

a Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	No	Fraksi	Konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	1	10.000	10	0	.137	-.137	.014
	2	1	10.000	10	0	.137	-.137	.014
	3	1	10.000	10	0	.137	-.137	.014
	4	1	100.000	10	0	.564	-.564	.056
	5	1	100.000	10	0	.564	-.564	.056
	6	1	100.000	10	0	.564	-.564	.056
	7	1	200.000	10	1	1.852	-.852	.185
	8	1	200.000	10	2	1.852	.148	.185
	9	1	200.000	10	4	1.852	2.148	.185
	10	1	250.000	10	4	2.909	1.091	.291
	11	1	250.000	10	3	2.909	.091	.291
	12	1	250.000	10	3	2.909	.091	.291
	13	2	10.000	10	1	.500	.500	.050
	14	2	10.000	10	1	.500	.500	.050
	15	2	10.000	10	1	.500	.500	.050
	16	2	100.000	10	3	1.529	1.471	.153
	17	2	100.000	10	3	1.529	1.471	.153
	18	2	100.000	10	4	1.529	2.471	.153
	19	2	200.000	10	2	3.690	-1.690	.369
	20	2	200.000	10	3	3.690	-.690	.369
	21	2	200.000	10	4	3.690	.310	.369
	22	2	250.000	10	4	5.041	-1.041	.504
	23	2	250.000	10	2	5.041	-3.041	.504
	24	2	250.000	10	3	5.041	-2.041	.504
	25	3	10.000	10	2	3.261	-1.261	.326
	26	3	10.000	10	2	3.261	-1.261	.326
	27	3	10.000	10	1	3.261	-2.261	.326
	28	3	100.000	10	5	5.675	-.675	.567
	29	3	100.000	10	6	5.675	.325	.567
	30	3	100.000	10	7	5.675	1.325	.567
	31	3	200.000	10	7	8.050	-1.050	.805
	32	3	200.000	10	8	8.050	-.050	.805
	33	3	200.000	10	9	8.050	.950	.805
	34	3	250.000	10	10	8.858	1.142	.886
	35	3	250.000	10	10	8.858	1.142	.886

(lanjutan)

57

36	3	250.000	10	10	8.858	1.142	.886
37	4	10.000	10	2	1.568	.432	.157
38	4	10.000	10	1	1.568	-.568	.157
39	4	10.000	10	2	1.568	.432	.157
40	4	100.000	10	4	3.494	.506	.349
41	4	100.000	10	4	3.494	.506	.349
42	4	100.000	10	4	3.494	.506	.349
43	4	200.000	10	8	6.189	1.811	.619
44	4	200.000	10	5	6.189	-1.189	.619
45	4	200.000	10	5	6.189	-1.189	.619
46	4	250.000	10	7	7.414	-.414	.741
47	4	250.000	10	8	7.414	.586	.741
48	4	250.000	10	6	7.414	-1.414	.741
49	5	10.000	10	0	.348	-.348	.035
50	5	10.000	10	0	.348	-.348	.035
51	5	10.000	10	0	.348	-.348	.035
52	5	100.000	10	2	1.162	.838	.116
53	5	100.000	10	2	1.162	.838	.116
54	5	100.000	10	1	1.162	-.162	.116
55	5	200.000	10	3	3.069	-.069	.307
56	5	200.000	10	2	3.069	-1.069	.307
57	5	200.000	10	4	3.069	.931	.307
58	5	250.000	10	3	4.365	-1.365	.437
59	5	250.000	10	7	4.365	2.635	.437
60	5	250.000	10	3	4.365	-1.365	.437
61	6	10.000	10	0	.258	-.258	.026
62	6	10.000	10	1	.258	.742	.026
63	6	10.000	10	0	.258	-.258	.026
64	6	100.000	10	1	.925	.075	.092
65	6	100.000	10	0	.925	-.925	.092
66	6	100.000	10	1	.925	.075	.092
67	6	200.000	10	3	2.624	.376	.262
68	6	200.000	10	2	2.624	-.624	.262
69	6	200.000	10	4	2.624	1.376	.262
70	6	250.000	10	3	3.855	-.855	.385
71	6	250.000	10	4	3.855	.145	.385
72	6	250.000	10	4	3.855	.145	.385
73	7	10.000	10	0	.097	-.097	.010
74	7	10.000	10	0	.097	-.097	.010
75	7	10.000	10	0	.097	-.097	.010
76	7	100.000	10	2	.429	1.571	.043
77	7	100.000	10	1	.429	.571	.043
78	7	100.000	10	1	.429	.571	.043
79	7	200.000	10	1	1.519	-.519	.152
80	7	200.000	10	2	1.519	.481	.152
81	7	200.000	10	0	1.519	-1.519	.152
82	7	250.000	10	3	2.471	.529	.247
83	7	250.000	10	1	2.471	-1.471	.247
84	7	250.000	10	2	2.471	-.471	.247

(lanjutan)

58

85	8	10.000	10	0	.022	-.022	.002
86	8	10.000	10	0	.022	-.022	.002
87	8	10.000	10	0	.022	-.022	.002
88	8	100.000	10	0	.130	-.130	.013
89	8	100.000	10	0	.130	-.130	.013
90	8	100.000	10	0	.130	-.130	.013
91	8	200.000	10	0	.622	-.622	.062
92	8	200.000	10	1	.622	.378	.062
93	8	200.000	10	1	.622	.378	.062
94	8	250.000	10	2	1.167	.833	.117
95	8	250.000	10	1	1.167	-.167	.117
96	8	250.000	10	1	1.167	-.167	.117
97	9	10.000	10	0	.084	-.084	.008
98	9	10.000	10	0	.084	-.084	.008
99	9	10.000	10	0	.084	-.084	.008
100	9	100.000	10	0	.384	-.384	.038
101	9	100.000	10	0	.384	-.384	.038
102	9	100.000	10	0	.384	-.384	.038
103	9	200.000	10	1	1.401	-.401	.140
104	9	200.000	10	2	1.401	.599	.140
105	9	200.000	10	2	1.401	.599	.140
106	9	250.000	10	4	2.312	1.688	.231
107	9	250.000	10	1	2.312	-1.312	.231
108	9	250.000	10	3	2.312	.688	.231
109	10	10.000	10	0	.147	-.147	.015
110	10	10.000	10	0	.147	-.147	.015
111	10	10.000	10	0	.147	-.147	.015
112	10	100.000	10	2	.597	1.403	.060
113	10	100.000	10	1	.597	.403	.060
114	10	100.000	10	0	.597	-.597	.060
115	10	200.000	10	3	1.929	1.071	.193
116	10	200.000	10	1	1.929	-.929	.193
117	10	200.000	10	1	1.929	-.929	.193
118	10	250.000	10	2	3.007	-1.007	.301
119	10	250.000	10	4	3.007	.993	.301
120	10	250.000	10	3	3.007	-.007	.301

Confidence Limits

Fraksi	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	1	.010	-7.425	-70.963	44.022
	.020		32.099	-26.257	80.724
	.030		57.176	1.783	104.335
	.040		76.040	22.685	122.288
	.050		91.385	39.554	137.024
	.060		104.446	53.812	149.667
	.070		115.897	66.233	160.833

(lanjutan)

59

.080	126.151	77.289	170.896
.090	135.476	87.288	180.104
.100	144.060	96.444	188.629
.150	179.600	133.840	224.434
.200	207.846	162.956	253.497
.250	232.078	187.504	278.860
.300	253.840	209.220	301.966
.350	274.005	229.076	323.644
.400	293.140	247.694	344.439
.450	311.653	265.513	364.751
.500	329.872	282.878	384.913
.550	348.092	300.086	405.232
.600	366.605	317.423	426.026
.650	385.740	335.202	447.660
.700	405.905	353.798	470.598
.750	427.667	373.723	495.495
.800	451.899	395.755	523.375
.850	480.145	421.258	556.050
.900	515.685	453.117	597.392
.910	524.269	460.778	607.411
.920	533.594	469.088	618.309
.930	543.848	478.210	630.306
.940	555.299	488.380	643.723
.950	568.360	499.957	659.047
.960	583.705	513.532	677.078
.970	602.569	530.184	699.281
.980	627.646	552.262	728.853
.990	667.170	586.947	775.576
2 .010	-88.804	-154.542	-38.283
.020	-49.280	-108.696	-2.721
.030	-24.203	-79.833	20.067
.040	-5.339	-58.260	37.348
.050	10.006	-40.813	51.507
.060	23.067	-26.043	63.638
.070	34.518	-13.158	74.340
.080	44.772	-1.678	83.979
.090	54.097	8.714	92.795
.100	62.681	18.236	100.954
.150	98.221	57.164	135.227
.200	126.467	87.467	163.101
.250	150.699	112.968	187.512
.300	172.461	135.460	209.842
.350	192.626	155.954	230.882
.400	211.761	175.097	251.151
.450	230.274	193.350	271.031
.500	248.493	211.070	290.837
.550	266.713	228.568	310.866
.600	285.226	246.141	331.425
.650	304.361	264.107	352.871

(lanjutan)

60

	.700	324.526	282.848	375.664
	.750	346.288	302.879	400.455
	.800	370.520	324.982	428.264
	.850	398.766	350.518	460.906
	.900	434.306	382.366	502.259
	.910	442.890	390.018	512.287
	.920	452.215	398.316	523.197
	.930	462.469	407.422	535.210
	.940	473.920	417.572	548.647
	.950	486.981	429.124	563.996
	.960	502.326	442.666	582.059
	.970	521.190	459.274	604.306
	.980	546.267	481.291	633.940
	.990	585.791	515.874	680.765
3	.010	-261.932	-350.496	-196.322
	.020	-222.408	-303.811	-161.599
	.030	-197.331	-274.285	-139.474
	.040	-178.467	-252.132	-122.773
	.050	-163.122	-234.153	-109.147
	.060	-150.061	-218.883	-97.516
	.070	-138.609	-205.520	-87.291
	.080	-128.356	-193.579	-78.113
	.090	-119.031	-182.740	-69.745
	.100	-110.447	-172.780	-62.024
	.150	-74.907	-131.756	-29.847
	.200	-46.661	-99.441	-3.985
	.250	-22.429	-71.966	18.453
	.300	-.667	-47.525	38.833
	.350	19.498	-25.102	57.944
	.400	38.633	-4.049	76.304
	.450	57.146	16.089	94.298
	.500	75.366	35.667	112.246
	.550	93.585	54.992	130.448
	.600	112.099	74.357	149.216
	.650	131.233	94.077	168.907
	.700	151.399	114.535	189.984
	.750	173.160	136.248	213.093
	.800	197.392	160.006	239.246
	.850	225.638	187.192	270.239
	.900	261.178	220.726	309.906
	.910	269.762	228.728	319.584
	.920	279.087	237.383	330.136
	.930	289.341	246.857	341.781
	.940	300.792	257.388	354.838
	.950	313.853	269.339	369.788
	.960	329.198	283.307	387.425
	.970	348.062	300.380	409.207
	.980	373.139	322.932	438.306
	.990	412.663	358.198	484.448

(lanjutan)

61

4	.010	-181.185	-258.568	-123.425
	.020	-141.661	-212.060	-88.525
	.030	-116.584	-182.680	-66.254
	.040	-97.720	-160.658	-49.422
	.050	-82.375	-142.802	-35.672
	.060	-69.314	-127.651	-23.922
	.070	-57.863	-114.404	-13.582
	.080	-47.609	-102.576	-4.290
	.090	-38.284	-91.849	4.189
	.100	-29.700	-82.001	12.022
	.150	5.840	-41.536	44.758
	.200	34.086	-9.799	71.199
	.250	58.318	17.065	94.247
	.300	80.080	40.858	115.276
	.350	100.245	62.593	135.075
	.400	119.380	82.916	154.164
	.450	137.893	102.285	172.927
	.500	156.112	121.056	191.682
	.550	174.332	139.540	210.726
	.600	192.845	158.033	230.364
	.650	211.980	176.857	250.952
	.700	232.145	196.397	272.947
	.750	253.907	217.173	296.993
	.800	278.139	239.975	324.103
	.850	306.385	266.175	356.081
	.900	341.925	298.670	396.787
	.910	350.509	306.452	406.685
	.920	359.834	314.882	417.462
	.930	370.088	324.122	429.342
	.940	381.539	334.409	442.641
	.950	394.600	346.104	457.848
	.960	409.945	359.795	475.762
	.970	428.809	376.564	497.848
	.980	453.886	398.763	527.300
	.990	493.410	433.571	573.900
5	.010	-64.133	-129.651	-13.130
	.020	-24.609	-84.086	22.713
	.030	.468	-55.427	45.705
	.040	19.332	-34.022	63.154
	.050	34.677	-16.721	77.458
	.060	47.738	-2.080	89.719
	.070	59.189	10.686	100.540
	.080	69.443	22.058	110.287
	.090	78.768	32.349	119.204
	.100	87.352	41.776	127.457
	.150	122.892	80.303	162.131
	.200	151.138	110.293	190.319
	.250	175.370	135.543	214.980
	.300	197.131	157.832	237.514

(lanjutan)

62

.350	217.297	178.163	258.717
.400	236.431	197.175	279.117
.450	254.945	215.325	299.099
.500	273.164	232.966	318.985
.550	291.384	250.405	339.073
.600	309.897	267.936	359.674
.650	329.032	285.874	381.147
.700	349.197	304.602	403.954
.750	370.959	324.631	428.747
.800	395.191	346.744	456.545
.850	423.437	372.304	489.164
.900	458.977	404.191	530.477
.910	467.561	411.854	540.494
.920	476.886	420.164	551.392
.930	487.139	429.284	563.392
.940	498.591	439.449	576.813
.950	511.652	451.019	592.145
.960	526.996	464.582	610.187
.970	545.861	481.216	632.408
.980	570.938	503.267	662.008
.990	610.462	537.900	708.783
6 .010	-45.086	-109.194	5.443
.020	-5.562	-63.904	41.560
.030	19.515	-35.448	64.756
.040	38.380	-14.213	82.375
.050	53.724	2.941	96.827
.060	66.785	17.448	109.221
.070	78.237	30.092	120.164
.080	88.490	41.350	130.026
.090	97.815	51.534	139.048
.100	106.399	60.861	147.402
.150	141.939	98.957	182.507
.200	170.185	128.597	211.045
.250	194.417	153.554	236.000
.300	216.179	175.595	258.781
.350	236.344	195.713	280.198
.400	255.479	214.543	300.779
.450	273.992	232.535	320.919
.500	292.212	250.040	340.941
.550	310.431	267.360	361.148
.600	328.945	284.788	381.851
.650	348.079	302.637	403.414
.700	368.245	321.286	426.300
.750	390.006	341.248	451.160
.800	414.238	363.301	479.018
.850	442.484	388.810	511.688
.900	478.024	420.653	553.046
.910	486.608	428.308	563.071
.920	495.933	436.610	573.976

(lanjutan)

63

	.930	506.187	445.722	585.983
	.940	517.639	455.881	599.412
	.950	530.699	467.444	614.750
	.960	546.044	481.001	632.799
	.970	564.908	497.629	655.025
	.980	589.985	519.675	684.630
	.990	629.509	554.307	731.406
7	.010	11.802	-49.985	62.933
	.020	51.326	-5.755	100.111
	.030	76.403	21.945	124.061
	.040	95.267	42.573	142.288
	.050	110.612	59.209	157.257
	.060	123.673	73.263	170.105
	.070	135.124	85.501	181.454
	.080	145.378	96.391	191.683
	.090	154.703	106.237	201.044
	.100	163.287	115.252	209.710
	.150	198.827	152.067	246.096
	.200	227.073	180.739	275.602
	.250	251.305	204.933	301.319
	.300	273.067	226.357	324.718
	.350	293.232	245.967	346.642
	.400	312.367	264.375	367.646
	.450	330.880	282.013	388.139
	.500	349.099	299.219	408.460
	.550	367.319	316.287	428.919
	.600	385.832	333.501	449.837
	.650	404.967	351.169	471.581
	.700	425.132	369.665	494.620
	.750	446.894	389.498	519.609
	.800	471.126	411.446	547.572
	.850	499.372	436.871	580.325
	.900	534.912	468.655	621.742
	.910	543.496	476.301	631.776
	.920	552.821	484.596	642.688
	.930	563.075	493.703	654.701
	.940	574.526	503.858	668.133
	.950	587.587	515.420	683.472
	.960	602.932	528.980	701.518
	.970	621.796	545.615	723.738
	.980	646.873	567.676	753.327
	.990	686.397	602.342	800.070
8	.010	85.450	16.655	146.789
	.020	124.975	59.353	185.499
	.030	150.051	86.075	210.427
	.040	168.916	105.979	229.379
	.050	184.260	122.040	244.923
	.060	197.321	135.619	258.245
	.070	208.773	147.454	269.997

(lanjutan)

64

.080	219.026	157.996	280.575
.090	228.352	167.537	290.241
.100	236.936	176.281	299.177
.150	272.475	212.098	336.561
.200	300.721	240.132	366.705
.250	324.953	263.893	392.856
.300	346.715	285.015	416.556
.350	366.880	304.416	438.689
.400	386.015	322.683	459.835
.450	404.528	340.230	480.418
.500	422.748	357.388	500.788
.550	440.967	374.442	521.261
.600	459.481	391.671	542.164
.650	478.615	409.381	563.866
.700	498.781	427.946	586.835
.750	520.542	447.875	611.728
.800	544.775	469.951	639.564
.850	573.020	495.543	672.149
.900	608.560	527.556	713.338
.910	617.144	535.260	723.314
.920	626.469	543.617	734.164
.930	636.723	552.793	746.108
.940	648.175	563.025	759.462
.950	661.235	574.676	774.713
.960	676.580	588.339	792.655
.970	695.444	605.101	814.748
.980	720.521	627.328	844.172
.990	760.045	662.248	890.660
9 .010	19.256	-44.153	71.878
.020	58.781	.026	109.107
.030	83.857	27.701	133.083
.040	102.722	48.315	151.323
.050	118.066	64.945	166.298
.060	131.127	78.996	179.148
.070	142.579	91.236	190.496
.080	152.832	102.128	200.723
.090	162.158	111.980	210.079
.100	170.742	121.000	218.738
.150	206.281	157.858	255.082
.200	234.527	186.583	284.535
.250	258.760	210.834	310.196
.300	280.521	232.315	333.536
.350	300.686	251.984	355.402
.400	319.821	270.450	376.347
.450	338.334	288.146	396.783
.500	356.554	305.410	417.047
.550	374.774	322.534	437.449
.600	393.287	339.805	458.310
.650	412.422	357.530	479.997

(lanjutan)

65

	.700	432.587	376.084	502.977
	.750	454.348	395.978	527.906
	.800	478.581	417.990	555.806
	.850	506.827	443.483	588.490
	.900	542.366	475.347	629.827
	.910	550.950	483.012	639.843
	.920	560.275	491.326	650.736
	.930	570.529	500.453	662.728
	.940	581.981	510.630	676.138
	.950	595.041	522.216	691.453
	.960	610.386	535.803	709.472
	.970	629.250	552.470	731.660
	.980	654.327	574.571	761.209
	.990	693.851	609.294	807.895
10	.010	-11.552	-74.218	39.111
	.020	27.972	-29.483	75.784
	.030	53.049	-1.429	99.381
	.040	71.913	19.482	117.325
	.050	87.258	36.356	132.056
	.060	100.319	50.617	144.697
	.070	111.770	63.039	155.861
	.080	122.024	74.094	165.925
	.090	131.349	84.092	175.135
	.100	139.933	93.245	183.662
	.150	175.473	130.621	219.488
	.200	203.719	159.708	248.579
	.250	227.951	184.224	273.974
	.300	249.713	205.906	297.114
	.350	269.878	225.727	318.827
	.400	289.013	244.310	339.656
	.450	307.526	262.095	360.004
	.500	325.745	279.424	380.201
	.550	343.965	296.597	400.555
	.600	362.478	313.900	421.383
	.650	381.613	331.644	443.052
	.700	401.778	350.205	466.025
	.750	423.540	370.093	490.960
	.800	447.772	392.087	518.877
	.850	476.018	417.548	551.593
	.900	511.558	449.360	592.983
	.910	520.142	457.011	603.013
	.920	529.467	465.309	613.921
	.930	539.721	474.419	625.931
	.940	551.172	484.576	639.361
	.950	564.233	496.139	654.699
	.960	579.578	509.699	672.745
	.970	598.442	526.332	694.967
	.980	623.519	548.388	724.561
	.990	663.043	583.040	771.317

Relative Median Potency Estimates

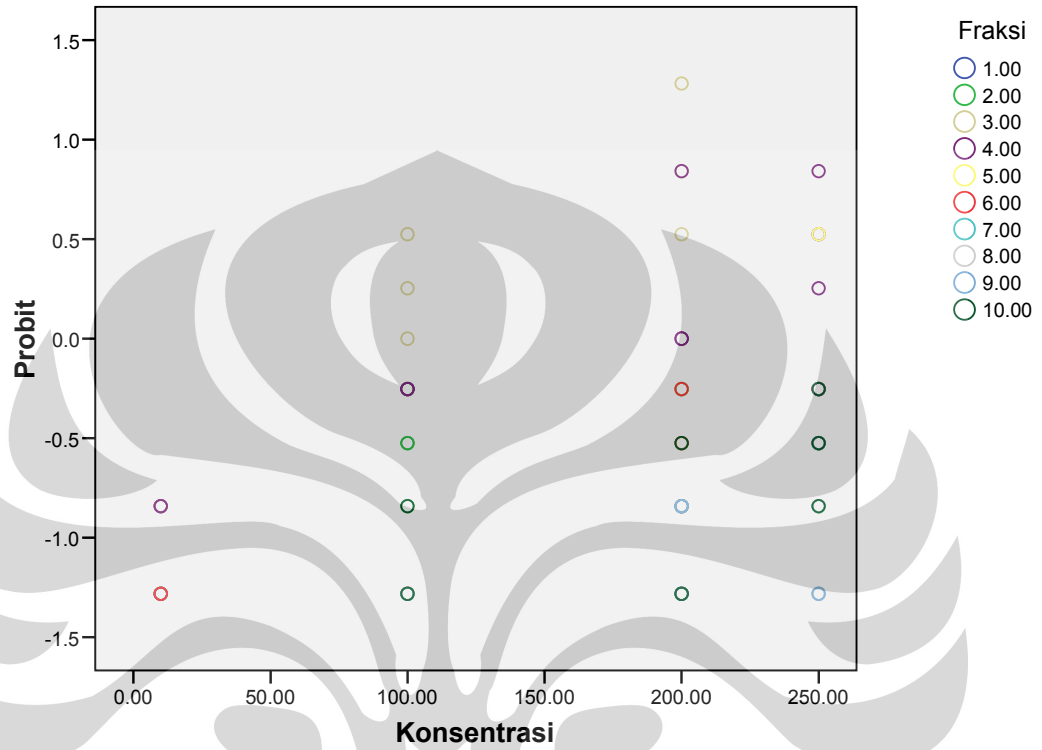
	(I) Fraksi	(J) Fraksi	95% Confidence Limits		
			Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	1	2	81.379	23.022	146.327
		3	254.507	182.232	346.306
		4	173.760	111.118	249.617
		5	56.708	-2.637	120.401
		6	37.661	-22.620	100.950
		7	-19.227	-84.918	45.603
		8	-92.875	-174.576	-17.631
		9	-26.681	-94.233	38.987
		10	4.127	-58.951	67.786
			2	1	-81.379
3	173.128			114.615	244.574
4	92.381			40.874	150.512
5	-24.671			-80.588	29.002
6	-43.718			-101.968	10.948
7	-100.606			-168.121	-40.543
8	-174.254			-262.043	-99.512
9	-108.060			-178.352	-46.243
10	-77.252			-140.769	-19.745
	3			2	-173.128
		1	-254.507	-346.306	-182.232
		4	-80.747	-138.543	-29.260
		5	-197.799	-275.826	-134.949
		6	-216.846	-298.897	-151.311
		7	-273.734	-368.722	-199.131
		8	-347.382	-465.126	-255.618
		9	-281.188	-379.713	-204.072
		10	-250.380	-340.233	-179.470
			4	2	-92.381
1	-173.760			-249.617	-111.118
3	80.747			29.260	138.543
5	-117.052			-180.648	-62.323
6	-136.099			-203.156	-79.250
7	-192.987			-271.872	-128.179
8	-266.635			-367.773	-185.168
9	-200.441			-282.642	-133.339
10	-169.633			-243.698	-108.202
	5			2	24.671
		1	-56.708	-120.401	2.637
		3	197.799	134.949	275.826
		4	117.052	62.323	180.648
		6	-19.047	-77.054	37.620
		7	-75.935	-141.937	-15.141
		8	-149.584	-234.595	-75.375
		9	-83.390	-151.880	-21.130
		10	-52.581	-115.026	6.098

(lanjutan)

67

6	2	43.718	-10.948	101.968
	1	-37.661	-100.950	22.620
	3	216.846	151.311	298.897
	4	136.099	79.250	203.156
	5	19.047	-37.620	77.054
	7	-56.888	-122.322	4.677
	8	-130.536	-214.144	-56.392
	9	-64.342	-132.081	-1.495
	10	-33.534	-95.690	26.195
	7	2	100.606	40.543
1		19.227	-45.603	84.918
3		273.734	199.131	368.722
4		192.987	128.179	271.872
5		75.935	15.141	141.937
6		56.888	-4.677	122.322
8		-73.648	-155.390	2.499
9		-7.454	-75.634	59.703
10		23.354	-40.689	88.839
8		2	174.254	99.512
	1	92.875	17.631	174.576
	3	347.382	255.618	465.126
	4	266.635	185.168	367.773
	5	149.584	75.375	234.595
	6	130.536	56.392	214.144
	7	73.648	-2.499	155.390
	9	66.194	-10.869	147.829
	10	97.002	22.102	178.939
	9	2	108.060	46.243
1		26.681	-38.987	94.233
3		281.188	204.072	379.713
4		200.441	133.339	282.642
5		83.390	21.130	151.880
6		64.342	1.495	132.081
7		7.454	-59.703	75.634
8		-66.194	-147.829	10.869
10		30.809	-34.160	98.242
10		2	77.252	19.745
	1	-4.127	-67.786	58.951
	3	250.380	179.470	340.233
	4	169.633	108.202	243.698
	5	52.581	-6.098	115.026
	6	33.534	-26.195	95.690
	7	-23.354	-88.839	40.689
	8	-97.002	-178.939	-22.102
	9	-30.809	-98.242	34.160

Probit Transformed Responses



Lampiran 4

Data analisis probit untuk fraksi hasil pemisahan fraksi M3 menggunakan SPSS 15.0

Probit Analysis

Notes

Output Created		01-JUN-2010 23:16:38
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	45
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		<pre> PROBIT Kematian OF Total BY Fraksi(1 5) WITH Konsentrasi /LOG NONE /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI RMP /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1) . </pre>
Resources	Elapsed Time	0:00:51.84
	Processor Time	0:00:02.05

[DataSet0]

Data Information

		N of Cases
Valid		45
Rejected	Out of Range(a)	0
	Missing	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0
Fraksi	1	9

2	9
3	9
4	9
5	9

a Cases rejected because of out of range group values.

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	14	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error		Z	Sig.	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
PROBIT (a) Konsentrasi	.012	.001	8.367	.000	.009	.015	
Intercept (b) 1	-.118	.147	-.803	.422	-.265	.029	
2	-.531	.150	-3.535	.000	-.682	-.381	
3	-.371	.148	-2.505	.012	-.520	-.223	
4	-.290	.145	-1.990	.047	-.435	-.144	
5	-.370	.148	-2.503	.012	-.518	-.222	

a PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + \text{BX}$

b Corresponds to the grouping variable Fraksi.

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df(a)	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	40.098	39	.421(b)

a Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

No	Fraksi	Konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1	1	1.000	10	4	4.580	-.580	.458
2	1	1.000	10	5	4.580	.420	.458
3	1	1.000	10	4	4.580	-.580	.458
4	1	10.000	10	7	5.021	1.979	.502
5	1	10.000	10	7	5.021	1.979	.502
6	1	10.000	10	3	5.021	-2.021	.502

7	1	100.000	10	10	8.675	1.325	.867
8	1	100.000	10	8	8.675	-.675	.867
9	1	100.000	10	7	8.675	-1.675	.867
10	2	1.000	10	1	3.019	-2.019	.302
11	2	1.000	10	3	3.019	-.019	.302
12	2	1.000	10	2	3.019	-1.019	.302
13	2	10.000	10	3	3.416	-.416	.342
14	2	10.000	10	5	3.416	1.584	.342
15	2	10.000	10	3	3.416	-.416	.342
16	2	100.000	10	9	7.584	1.416	.758
17	2	100.000	10	8	7.584	.416	.758
18	2	100.000	10	8	7.584	.416	.758
19	3	1.000	10	1	3.598	-2.598	.360
20	3	1.000	10	1	3.598	-2.598	.360
21	3	1.000	10	2	3.598	-1.598	.360
22	3	10.000	10	6	4.020	1.980	.402
23	3	10.000	10	6	4.020	1.980	.402
24	3	10.000	10	6	4.020	1.980	.402
25	3	100.000	10	8	8.054	-.054	.805
26	3	100.000	10	8	8.054	-.054	.805
27	3	100.000	10	9	8.054	.946	.805
28	4	1.000	10	4	3.908	.092	.391
29	4	1.000	10	4	3.908	.092	.391
30	4	1.000	10	4	3.908	.092	.391
31	4	10.000	10	5	4.340	.660	.434
32	4	10.000	10	7	4.340	2.660	.434
33	4	10.000	10	5	4.340	.660	.434
34	4	100.000	10	7	8.271	-1.271	.827
35	4	100.000	10	7	8.271	-1.271	.827
36	4	100.000	10	7	8.271	-1.271	.827
37	5	1.000	10	1	3.603	-2.603	.360
38	5	1.000	10	5	3.603	1.397	.360
39	5	1.000	10	3	3.603	-.603	.360
40	5	10.000	10	6	4.026	1.974	.403
41	5	10.000	10	4	4.026	-.026	.403
42	5	10.000	10	3	4.026	-1.026	.403
43	5	100.000	10	9	8.058	.942	.806
44	5	100.000	10	8	8.058	-.058	.806
45	5	100.000	10	8	8.058	-.058	.806

Confidence Limits

	Fraksi	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
			Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	1	.010	-179.198	-247.740	-134.814
		.020	-157.079	-219.378	-116.369
		.030	-143.045	-201.442	-104.607
		.040	-132.487	-187.986	-95.722

.050	-123.900	-177.068	-88.468
.060	-116.590	-167.796	-82.273
.070	-110.182	-159.685	-76.822
.080	-104.443	-152.439	-71.925
.090	-99.224	-145.862	-67.458
.100	-94.421	-139.822	-63.333
.150	-74.531	-114.967	-46.099
.200	-58.723	-95.435	-32.180
.250	-45.162	-78.881	-20.036
.300	-32.983	-64.215	-8.931
.350	-21.698	-50.827	1.563
.400	-10.989	-38.336	11.733
.450	-.629	-26.477	21.798
.500	9.568	-15.048	31.946
.550	19.764	-3.878	42.353
.600	30.125	7.191	53.208
.650	40.834	18.333	64.728
.700	52.119	29.752	77.190
.750	64.298	41.729	90.984
.800	77.859	54.688	106.723
.850	93.667	69.369	125.493
.900	113.556	87.327	149.623
.910	118.360	91.595	155.521
.920	123.579	96.206	161.954
.930	129.317	101.247	169.056
.940	135.726	106.844	177.021
.950	143.035	113.191	186.142
.960	151.623	120.601	196.903
.970	162.180	129.653	210.192
.980	176.214	141.601	227.941
.990	198.334	160.277	256.073
2 .010	-145.652	-206.399	-105.823
.020	-123.533	-178.198	-87.217
.030	-109.499	-160.391	-75.326
.040	-98.941	-147.050	-66.326
.050	-90.354	-136.239	-58.965
.060	-83.045	-127.071	-52.666
.070	-76.636	-119.060	-47.115
.080	-70.897	-111.911	-42.120
.090	-65.679	-105.432	-37.556
.100	-60.875	-99.488	-33.334
.150	-40.985	-75.122	-15.612
.200	-25.178	-56.103	-1.180
.250	-11.616	-40.100	11.515
.300	.563	-26.027	23.214
.350	11.848	-13.277	34.345
.400	22.557	-1.465	45.193
.450	32.917	9.682	55.971
.500	43.114	20.375	66.855

.550	53.310	30.797	78.011
.600	63.671	41.120	89.612
.650	74.380	51.531	101.862
.700	85.665	62.246	115.028
.750	97.844	73.555	129.490
.800	111.405	85.887	145.856
.850	127.213	99.981	165.213
.900	147.102	117.382	189.901
.910	151.906	121.540	195.908
.920	157.125	126.041	202.451
.930	162.863	130.972	209.664
.940	169.272	136.457	217.740
.950	176.581	142.689	226.976
.960	185.169	149.981	237.856
.970	195.726	158.906	251.272
.980	209.760	170.714	269.162
.990	231.879	189.217	297.466
3 .010	-158.630	-222.289	-117.129
.020	-136.511	-194.015	-98.596
.030	-122.477	-176.149	-86.764
.040	-111.920	-162.756	-77.817
.050	-103.332	-151.896	-70.504
.060	-96.023	-142.680	-64.253
.070	-89.614	-134.624	-58.747
.080	-83.876	-127.430	-53.797
.090	-78.657	-120.907	-49.277
.100	-73.853	-114.919	-45.099
.150	-53.963	-90.332	-27.598
.200	-38.156	-71.083	-13.396
.250	-24.594	-54.836	-9.945
.300	-12.416	-40.504	10.495
.350	-1.130	-27.482	21.353
.400	9.578	-15.386	31.919
.450	19.939	-3.951	42.408
.500	30.135	7.032	53.003
.550	40.332	17.737	63.874
.600	50.693	28.334	75.202
.650	61.401	39.004	87.193
.700	72.687	49.961	100.117
.750	84.865	61.493	114.356
.800	98.427	74.029	130.518
.850	114.234	88.311	149.687
.900	134.124	105.888	174.199
.910	138.928	110.080	180.172
.920	144.146	114.616	186.680
.930	149.885	119.581	193.859
.940	156.294	125.101	201.900
.950	163.603	131.369	211.100
.960	172.191	138.697	221.943

	.970	182.748	147.662	235.319
	.980	196.782	159.513	253.166
	.990	218.901	178.070	281.416
4	.010	-165.271	-230.743	-122.795
	.020	-143.152	-202.407	-104.324
	.030	-129.118	-184.494	-92.540
	.040	-118.561	-171.059	-83.634
	.050	-109.973	-160.160	-76.360
	.060	-102.664	-150.909	-70.144
	.070	-96.255	-142.818	-64.674
	.080	-90.517	-135.591	-59.757
	.090	-85.298	-129.035	-55.270
	.100	-80.494	-123.015	-51.124
	.150	-60.604	-98.268	-33.782
	.200	-44.797	-78.857	-19.742
	.250	-31.235	-62.441	-7.460
	.300	-19.057	-47.932	3.802
	.350	-7.772	-34.723	14.474
	.400	2.937	-22.433	24.845
	.450	13.298	-10.798	35.134
	.500	23.494	.386	45.528
	.550	33.691	11.290	56.201
	.600	44.052	22.079	67.336
	.650	54.760	32.931	79.146
	.700	66.046	44.056	91.901
	.750	78.224	55.740	105.989
	.800	91.786	68.412	122.015
	.850	107.593	82.813	141.065
	.900	127.483	100.494	165.472
	.910	132.287	104.707	171.425
	.920	137.505	109.261	177.915
	.930	143.244	114.244	185.075
	.940	149.653	119.783	193.098
	.950	156.962	126.068	202.280
	.960	165.549	133.415	213.105
	.970	176.107	142.398	226.463
	.980	190.141	154.268	244.291
	.990	212.260	172.845	272.521
5	.010	-158.747	-222.342	-117.293
	.020	-136.628	-194.066	-98.762
	.030	-122.594	-176.199	-86.931
	.040	-112.037	-162.805	-77.985
	.050	-103.449	-151.944	-70.673
	.060	-96.140	-142.728	-64.422
	.070	-89.731	-134.671	-58.917
	.080	-83.993	-127.477	-53.968
	.090	-78.774	-120.954	-49.448
	.100	-73.970	-114.965	-45.270
	.150	-54.080	-90.377	-27.770

.200	-38.273	-71.127	-13.569
.250	-24.711	-54.880	-1.118
.300	-12.533	-40.549	10.322
.350	-1.247	-27.527	21.182
.400	9.461	-15.434	31.749
.450	19.822	-4.001	42.241
.500	30.018	6.978	52.839
.550	40.215	17.679	63.715
.600	50.576	28.272	75.047
.650	61.284	38.936	87.044
.700	72.570	49.888	99.973
.750	84.748	61.414	114.218
.800	98.310	73.944	130.386
.850	114.117	88.219	149.562
.900	134.007	105.789	174.080
.910	138.811	109.980	180.055
.920	144.030	114.514	186.565
.930	149.768	119.477	193.744
.940	156.177	124.996	201.788
.950	163.486	131.262	210.989
.960	172.074	138.589	221.835
.970	182.631	147.551	235.213
.980	196.665	159.400	253.062
.990	218.784	177.953	281.316

Relative Median Potency Estimates

	(I) Fraksi	(J) Fraksi	95% Confidence Limits		
			Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 1	1	2	-33.546	-69.867	-1.775
		3	-20.568	-55.008	11.097
		4	-13.927	-47.413	17.488
		5	-20.451	-54.815	11.181
		2	33.546	1.775	69.867
2	2	3	12.978	-18.966	46.698
		4	19.619	-11.817	53.535
		5	13.095	-18.800	46.809
3	3	2	-12.978	-46.698	18.966
		1	20.568	-11.097	55.008
		4	6.641	-25.171	39.157
4	4	5	.117	-32.321	32.599
		2	-19.619	-53.535	11.817
		1	13.927	-17.488	47.413
5	5	3	-6.641	-39.157	25.171
		5	-6.524	-38.976	25.267
		2	-13.095	-46.809	18.800
		1	20.451	-11.181	54.815
		3	-.117	-32.599	32.321
		4	6.524	-25.267	38.976

Probit Transformed Responses