



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK METANOL EMPAT SPESIES
TIMUN LAUT DARI KEPULAUAN SERIBU DENGAN
METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN KIMIA DARI FRAKSI
TERAKTIF**

SKRIPSI

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

**WAHYU ASTUTI
0606071033**

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

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Wahyu Astuti

NPM : 0606071033

Tanda Tangan :

Tanggal : Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Wahyu Astuti
NPM : 0606071033
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Empat Spesies Timun Laut dari Kepulauan Seribu dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Identifikasi Golongan Kimia dari Fraksi Teraktif

Telah berhasil dipertahankan di hadapan 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, Apt., M.Si ()
Pembimbing : Dr. rer. nat. Yasman, S.Si., M.Sc. ()
Penguji : Dr. Katrin, M.S. ()
Penguji : Dr. Nelly D. Leswara, Apt., M.Sc. ()
Penguji : Dr. Herman Suryadi, M.S. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2010

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah rabbil'alamin, segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya yang tiada terbatas sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini disusun sebagai 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. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, Apt., M.S., selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Riset Berbasis Laboratorium Tahun 2009.
3. Ibu Dr. Berna Elya, Apt., M.Si., selaku pembimbing I, serta Bapak Dr. rer. nat. Yasman, S.Si, M.Sc. selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan memberikan begitu banyak ilmu, bimbingan, pengarahan, saran, perhatian, kesabaran dan bantuan-bantuan yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Bapak Drs. Hayun, M.Si., selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Program Sarjana Reguler Farmasi FMIPA UI.
5. Ibu Dr. Katrin, M.S., Ibu Dr. Nelly D. Leswara, Apt., M.Sc., dan Bapak Dr. Herman Suryadi, M.S. atas masukan, saran, dan perbaikan-perbaikan yang sangat bermanfaat demi kesempurnaan dalam penyusunan skripsi.
6. Seluruh staf pengajar, Mba Ulfa, Mas Agus, Mba Yayuk, Bapak Rustam, Bapak Ma'ruf, Bapak Suroto dan seluruh karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama

penulis menempuh pendidikan khususnya selama penelitian berlangsung.

7. Bapak dan Mama tercinta serta Mas, yang senantiasa melimpahkan kasih sayang, dukungan, harapan, semangat, dan doa.
8. Ani, Chiro, Dira, Nisa, Yani, terima kasih yang teristimewa untuk persahabatan dan motivasi yang telah diberikan terutama selama penelitian.
9. Teman-teman Lab. Penelitian lantai 2: Ari, Dede, Eka, Uni, Mega, Ajeng, Atang, Yoyon, Ka Tia, Ka Dwit, terima kasih untuk ilmu yang telah dibagi, dukungan, dan semangat.
10. Teman-teman Biologi grup timun laut: Suriy, Erna, Fuji, Bun, Anjar, Jeroen, terima kasih atas bantuan dan diskusi yang menyenangkan.
11. Teman-teman Rainbow United farmasi 2006, terima kasih untuk kehangatan, kekompakan, dan kebersamaannya selama ini.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis
2010

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

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

Nama : Wahyu Astuti

NPM : 0606071033

Program Studi : Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis Karya : Skripsi

demi 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 Metanol Empat Spesies Timun Laut dari Kepulauan Seribu dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Identifikasi Golongan Kimia dari Fraksi Teraktif.

beserta 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

(Wahyu Astuti)

ABSTRAK

Nama : Wahyu Astuti
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Empat Spesies Timun Laut dari Kepulauan Seribu dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Identifikasi Golongan Kimia dari Fraksi Teraktif

Telah dilakukan uji toksisitas ekstrak metanol empat spesies timun laut dari Kepulauan Seribu yaitu *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. Timun laut diekstraksi dengan metanol kemudian ekstrak dari spesies dengan aktivitas tertinggi difraksinasi cair-cair dengan n-heksan, etil asetat, dan air. Fraksi yang paling toksik selanjutnya difraksinasi kembali menggunakan kromatografi kolom normal. Pengujian dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Actinopyga lecanora* memiliki toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} 227,094 $\mu\text{g/ml}$ sementara fraksi paling aktif adalah etil asetat dengan LC_{50} 158,276 $\mu\text{g/ml}$. Hasil pengujian pada fraksi hasil kolom memberikan nilai LC_{50} sebesar 84,202 $\mu\text{g/ml}$ sebagai fraksi teraktif. Identifikasi dengan berbagai pereaksi kimia menunjukkan bahwa fraksi paling aktif tersebut diduga mengandung senyawa golongan flavonoid dan steroid/triterpenoid.

Kata Kunci : BSLT, flavonoid, Kepulauan Seribu, steroid/triterpenoid, timun laut, toksisitas
xiv+79 halaman: 11 gambar; 14 tabel; 11 lampiran
Daftar Acuan : 33 (1979-2009)

ABSTRACT

Name : Wahyu Astuti
Program Study : Pharmacy
Title : Toxicity Test of Four Sea Cucumber Species' Methanol Extracts from Kepulauan Seribu Using *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) and Identification of Compounds Group of The Most Active Fraction

Toxicity study of four sea cucumber species' methanol extracts from Kepulauan Seribu, those are *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, and *Stichopus* sp. were investigated. The sea cucumbers were extracted with methanol and then the most active extract was separated with n-hexane, ethyl acetate, and water. The most toxic was fractionated again using normal column chromatography. Samples were tested by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). The result of research showed that *Actinopyga lecanora* is the most active species with value of LC_{50} is 227,094 $\mu\text{g/ml}$ for crude extract, 158,276 $\mu\text{g/ml}$ for the most active fraction from first fractionation, and 84,202 $\mu\text{g/ml}$ for the most active fraction from normal column chromatography. Chemical analysis indicated that the toxic compound in the sea cucumber was predicted flavonoid and steroid/triterpenoid groups.

Keywords : BSLT, flavonoid , Kepulauan Seribu, sea cucumber, steroid/triterpenoid, toxicity
xiv+79 pages : 11 figures; 14 tables; 11 appendices
Bibliography : 33(1979-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Timun Laut (Holothuroidea).....	4
2.1.1 Karakteristik dan Habitat.....	4
2.1.2 Kandungan Kimia.....	5
2.2 <i>Holothuria coluber</i>	5
2.3 <i>Holothuria edulis</i>	6
2.4 <i>Actinopyga lecanora</i>	7
2.5 <i>Stichopus</i> sp.....	7
2.6 Ekstraksi.....	8
2.6.1 Cara Dingin.....	8
2.6.1.1 Maserasi.....	8
2.6.1.2 Perkolasi.....	9
2.6.2 Cara Panas.....	10
2.6.2.1 Soxhlet.....	10
2.6.2.2 Refluks.....	10
2.6.2.3 Infus.....	10
2.6.2.4 Dekok.....	10
2.6.2.5 Digesti.....	11
2.7 Kromatografi.....	11
2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	12
2.7.2 Kromatografi Kolom.....	12
2.7.2.1 Kromatografi Kolom Adsorpsi.....	12
2.7.2.2 Kromatografi Kolom Partisi.....	13
2.8 <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	14
2.9 <i>Artemia salina</i>	14
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Lokasi dan Waktu.....	17
3.2 Bahan.....	17

3.2.1	Bahan Uji.....	17
3.2.2	Bahan Kimia.....	17
3.3	Alat.....	18
3.4	Cara Kerja.....	18
3.4.1	Penyediaan Simplisia.....	18
3.4.2	Pembuatan Ekstrak.....	19
3.4.3	Penetasan Telur <i>Artemia salina</i>	19
3.4.4	Uji Toksisitas Ekstrak Metanol.....	20
3.4.5	Fraksinasi Ekstrak Paling Aktif.....	21
3.4.5.1	Fraksinasi dengan n-Heksan.....	21
3.4.5.2	Fraksinasi dengan Etil Asetat.....	21
3.4.5.3	Memperoleh Fraksi Air.....	21
3.4.6	Uji Toksisitas Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air.....	22
3.4.7	Kromatografi Lapis Tipis.....	22
3.4.8	Pemisahan Fraksi Paling Aktif dengan Kromatografi Kolom Normal.....	23
3.4.9	Uji Toksisitas Fraksi-Fraksi Hasil Kolom.....	23
3.4.10	Identifikasi Golongan Kimia Fraksi Paling Aktif.....	24
3.4.10.1	Identifikasi Alkaloid.....	24
3.4.10.2	Identifikasi Flavonoid.....	24
3.4.10.3	Identifikasi Glikosida.....	25
3.4.10.4	Identifikasi Saponin.....	26
3.4.10.5	Identifikasi Steroid/Triterpenoid.....	26
3.4.10.6	Identifikasi Tanin.....	26
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1	Penyediaan Bahan.....	27
4.2	Pembuatan Ekstrak <i>Holothuria coluber</i> , <i>Holothuria edulis</i> , <i>Actinopyga lecanora</i> , dan <i>Stichopus</i> sp.....	27
4.3	Penetasan Telur <i>Artemia salina</i>	29
4.4	Uji Toksisitas Ekstrak Metanol <i>Holothuria coluber</i> , <i>Holothuria edulis</i> , <i>Actinopyga lecanora</i> , dan <i>Stichopus</i> sp. dengan Metode BSLT.....	29
4.5	Fraksinasi Ekstrak <i>Actinopyga lecanora</i> dengan n-Heksan, Etil Asetat, dan Air.....	31
4.6	Uji Toksisitas Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air dengan Metode BSLT.....	31
4.7	Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom Normal.....	32
4.8	Uji Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Normal.....	33
4.9	Uji Toksisitas Fraksi I-III dengan Metode BSLT.....	34
4.10	Identifikasi Golongan Kimia dalam Fraksi I.....	34
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	35
5.1	Kesimpulan.....	35
5.2	Saran.....	35
DAFTAR ACUAN.....		36

DAFTAR GAMBAR

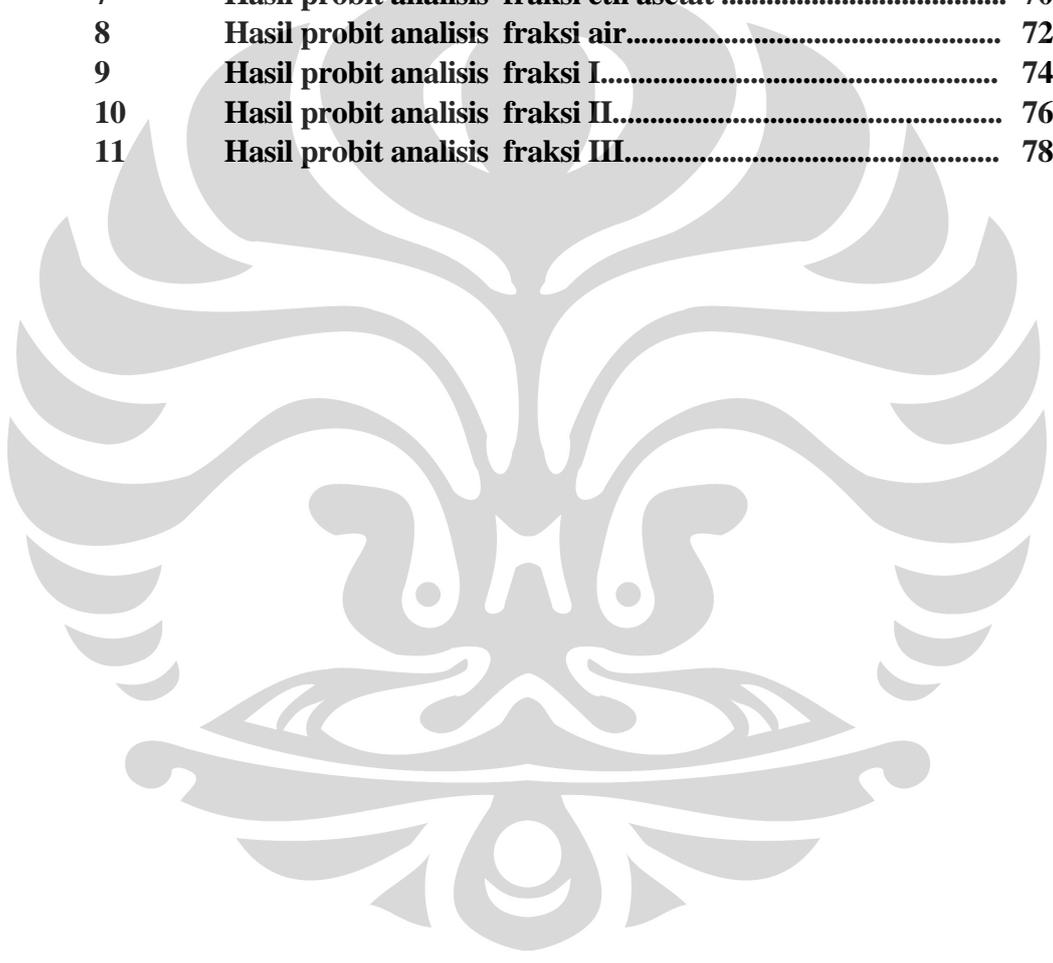
Gambar		Halaman
2.1	<i>Holothuria coluber</i>	39
2.2	<i>Holothuria edulis</i>	39
2.3	<i>Actinopyga lecanora</i>	40
2.4	<i>Stichopus</i> sp.....	40
2.5	Siklus hidup <i>Artemia salina</i>	16
2.6	Larva <i>Artemia salina</i>	41
3.1	Bagan ekstraksi <i>Holothuria coluber</i> , <i>Holothuria edulis</i> , <i>Actinopyga lecanora</i> , dan <i>Stichopus</i> sp.....	42
3.2	Bagan fraksinasi ekstrak metanol <i>Actinopyga lecanora</i>	43
4.1	Gambar profil KLT fraksi etil asetat dengan berbagai eluen.....	44
4.2	Gambar profil KLT hasil kromatografi kolom normal.....	45
4.3	Bagan pemisahan fraksi etil asetat.....	46

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Rendemen ekstrak metanol timun laut.....	47
4.2	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> ekstrak metanol <i>Holothuria coluber</i>	47
4.3	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> ekstrak metanol <i>Holothuria edulis</i>	48
4.4	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> ekstrak metanol <i>Actinopyga lecanora</i>	49
4.5	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> ekstrak metanol <i>Stichopus</i> sp.....	50
4.6	Hasil fraksinasi cair-cair.....	50
4.7	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> fraksi n-heksan.....	51
4.8	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> fraksi etil asetat.....	52
4.9	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> fraksi air.....	53
4.10	Hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom.....	54
4.11	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> fraksi I.....	54
4.12	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> fraksi II.....	55
4.13	Hasil uji kematian larva <i>A. salina</i> fraksi III.....	56
4.14	Identifikasi golongan kimia fraksi I.....	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Hasil determinasi sampel timun laut.....	58
2	Hasil probit analisis ekstrak metanol <i>Holothuria coluber</i>	60
3	Hasil probit analisis ekstrak metanol <i>Holothuria edulis</i>	62
4	Hasil probit analisis ekstrak metanol <i>Actinopyga lecanora</i> ..	64
5	Hasil probit analisis ekstrak metanol <i>Stichopus</i> sp.....	66
6	Hasil probit analisis fraksi n-heksan.....	68
7	Hasil probit analisis fraksi etil asetat	70
8	Hasil probit analisis fraksi air.....	72
9	Hasil probit analisis fraksi I.....	74
10	Hasil probit analisis fraksi II.....	76
11	Hasil probit analisis fraksi III.....	78



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker masih merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia (Astuti, Alam, Hartati, Sari, dan Wahyuono, 2005). Berdasarkan data laporan tahunan *International Agency for Research on Cancer*, jumlah orang yang meninggal karena kanker di seluruh dunia mencapai 6,5 juta jiwa pada tahun 2000. Jumlah ini diperkirakan akan terus meningkat mencapai angka 13-16 juta jiwa/tahun pada 2030 (*International Agency for Research on Cancer*, 2008). Meskipun usaha pengobatan kanker secara intensif telah dilakukan, namun hingga kini belum ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan. Hal ini disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker yang telah ada. Untuk mengatasi masalah ini, pencarian sumber-sumber baru yang menghasilkan senyawa aktif antikanker terus digalakkan diantaranya dari organisme laut (Setyowati, Jenie, Sudarsono, Kardono, Rahmat, dan Meiyanto, 2007).

Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut sebagai sumber pengobatan. Akan tetapi, pemanfaatan potensi ini dalam hal pengobatan belum optimal. Padahal menurut beberapa penelitian, organisme laut merupakan sumber senyawa obat baru yang berpotensi besar. Hal ini ditandai dengan adanya kolaborasi antara peneliti dari berbagai institusi dengan farmakolog yang menghasilkan suatu kemajuan besar dalam penemuan obat-obatan dari biota laut. Sebagai gambaran, lebih dari 10000 senyawa bioaktif telah berhasil diisolasi dari biota laut dan sekitar 300 paten dari senyawa tersebut telah berhasil dipublikasi selama kurun waktu 30 tahun (1969-1999) (Rasyid, 2008). Misalnya bryostatin-1 (asam amino yang diisolasi dari spons *Bugula neritina*) yang diduga memiliki khasiat sebagai antikanker dan imunostimulan, dolastatin-10 (peptida yang diisolasi dari moluska *Dolabella auricularia*) yang diketahui sebagai agen antitumor, dan didemnin B yang

diisolasi dari tunikata *Trididemnum solidum* yang menunjukkan aktivitas sebagai antineoplastik, antivirus, dan immunosupresan (Kijjoa dan Sawangwong, 2004).

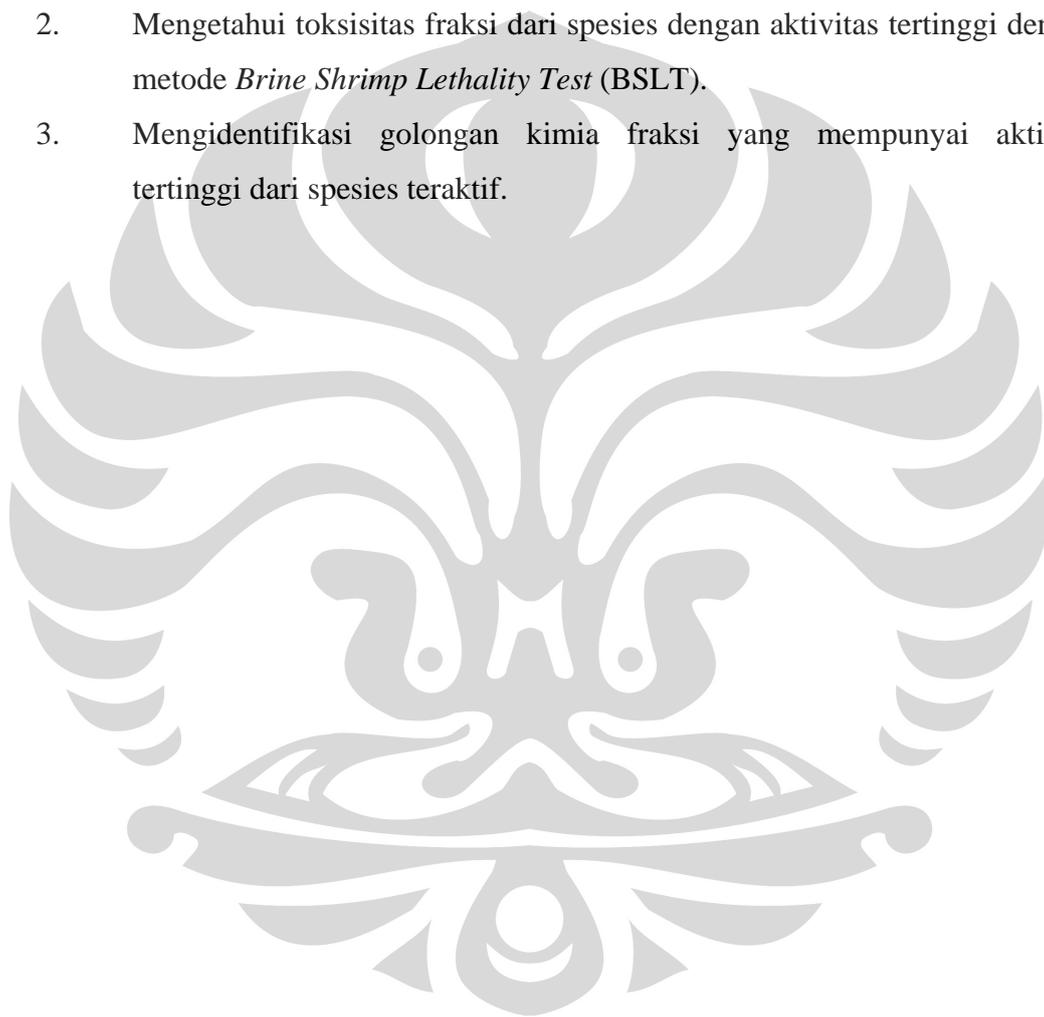
Salah satu organisme laut yang telah terbukti mengandung senyawa antikanker adalah timun laut dari spesies *Bohadschia argus* JAEGER (Bao Shu Liu et al., 2007), *Cucumaria conicospermium* (Avilov, 2003), *Hemoidema spectabilis* (Chludil, Munianin, Seides, dan Maier, 2002), *Holothuria hilla* Lesson (Jun Wu et al., 2007), *Holothuria scabra* (Dang et al., 2007), *Pseudocolochirus violaceus* (Shu Y.Z., Yang H.Y., Hai F.T., 2006), *Psolus patagonicus* (Careaga, Bueno, Munianin, Alche, dan Maier, 2009), dan *Staurocucumis liouvillei* (Maier et al., 2001). Di Cina, timun laut telah digunakan sebagai bahan makanan yang dipercaya memiliki khasiat terhadap kesehatan sejak beberapa ratus tahun yang lalu. Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa timun laut memiliki aktivitas antifungi, antiinflamasi, sitotoksik secara *in vitro*, hemolitik, neuritogenik dan imunodilator (Bao Shu Liu et al., 2007; Shu Y.Z., Yang H.Y., dan Hai F.T., 2006).

Berdasarkan laporan dari penelitian terdahulu timun laut spesies *Holothuria scabra* mampu menghambat pertumbuhan *cell line* KB (sel kanker rongga mulut) dan Hep-G2 (sel kanker hati) pada konsentrasi 0,87- 1,12 mg/ml dan 0,32- 0,57 mg/ml (Dang et al., 2007). Sementara *Holothuria hilla* Lesson memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *cell line* A-549 (sel kanker paru-paru), MCF-7 (sel kanker payudara), KB (sel kanker rongga mulut) dengan konsentrasi penghambatan 0,1-3,8 µg/ml (Jun Wu et al., 2007). Skrining awal untuk menguji bahan-bahan yang diduga antikanker adalah dengan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina*. Metode ini sering digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam bahan alam, karena relatif mudah, murah, cepat, dan cukup *reproducible* (Harmita dan Radji, 2006). Oleh karena itu di dalam penelitian ini, uji senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina*. Uji toksisitas ini dilakukan terhadap empat spesies timun laut yang terdapat di Kepulauan Seribu, yaitu *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. Penelitian terhadap empat spesies tersebut belum pernah dilakukan sebelumnya sehingga dengan mengetahui tingkat toksisitas beberapa spesies timun laut tersebut, yang dilakukan baik terhadap ekstrak kasar maupun fraksi dalam pelarut tertentu, diharapkan dapat dijadikan

sebagai langkah awal pengembangan sumber daya laut dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh toksisitas ekstrak yang diperoleh dari empat spesies timun laut dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).
2. Mengetahui toksisitas fraksi dari spesies dengan aktivitas tertinggi dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).
3. Mengidentifikasi golongan kimia fraksi yang mempunyai aktifitas tertinggi dari spesies teraktif.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Timun Laut (Holothuroidea)

2.1.1 Karakteristik dan Habitat

Timun laut merupakan hewan laut bertubuh lunak dan umumnya berbentuk bulat panjang atau silindris, dengan mulut pada salah satu ujungnya dan anus pada ujung lainnya. Mulutnya dikelilingi oleh tentakel-tentakel atau lengan peraba yang kadang-kadang bercabang-cabang. Sebagian besar timun laut memiliki panjang sekitar 51 cm, akan tetapi ada yang panjangnya sekitar 300 cm. Hewan ini banyak terdapat di paparan terumbu karang, di pantai berbatu atau yang berlumpur. Timun laut tidak hanya dijumpai di perairan dangkal, tetapi ada juga yang hidup di laut dalam (Nontji, 1993).

Timun laut tidak memiliki kerangka luar, akan tetapi sebagai gantinya terdapat kerangka berbentuk jarum atau keping-keping kecil berkapur (spikula) yang mikroskopis, tersebar dalam jaringan dinding tubuhnya. Kulit tubuhnya terdiri atas kutikula yang menutupi epidermis yang tidak bersilia. Di bawahnya terdapat dermis yang mengandung ossicula, selapis otot melingkar, dan 5 berkas otot memanjang ganda yang kuat sepanjang lengan (radii). Dengan otot itu timun laut dapat memanjang dan memendekkan diri, sehingga menimbulkan gerakan seperti cacing (Nontji, 1993; Jasin, 1992).

Untuk melindungi dirinya dari musuh, hewan ini mengeluarkan lendir yang beracun dari tubuhnya. Ada pula jenis yang dapat menyembrotkan getah yang sangat lengket dari anusnya sebagai mekanisme pertahanan dirinya, misalnya pada jenis teripang getah (*Holothuria vagabunda*) (Nontji, 1993).

Di Asia, kulit tubuh timun laut yang telah direbus dan dikeringkan di bawah sinar matahari dibuat sebagai bahan sup. Sedangkan untuk timun laut yang berukuran kecil-kecil dibuat menjadi kerupuk. Beberapa jenis timun laut yang dapat dijadikan sebagai bahan makanan antara lain: *Holothuria nobilis*, *Holothuria scabra*, *Holothuria vagabunda*, *Holothuria atra*, *Bohadschia argus*,

Muelleria lecanora, *Muelleria echinites*, *Stichopus ananas*, dan *Stichopus variegatus* (Nontji, 1993; Jasin, 1992).

2.1.2 Kandungan Kimia

Timun laut memiliki tubuh yang berkartilago yang kaya akan mukopolisakarida terutama kondroitin sulfat. Kondroitin sulfat diketahui mampu mengurangi nyeri arthritis, khususnya osteoarthritis. Polisakarida sulfat rantai panjang, seperti kondroitin, juga menunjukkan aktivitas menghambat virus. Di Jepang terdapat sebuah produk paten yang mengandung kondroitin sulfat yang diindikasikan untuk terapi HIV (Dharmanada, n.d.).

Penelitian di Rusia, Jepang, dan Cina menyatakan bahwa timun laut juga mengandung triterpen glikosida. Studi farmakologi menunjukkan adanya efek antitumor, antivirus, dan antifungi dari senyawa ini (Kelly, 2005). Berdasarkan penelitian lain, timun laut juga mengandung gangliosida yang menunjukkan aktivitas neuritogenik (Koji et al., 2001).

Senyawa antimikroba juga ditemukan pada timun laut *Cucumaria frondosa*, *Actinopyga miliaris*, *Holothuria atra* dan *Holothuria scabra*. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi* dan jamur *Aspergillus* sp. Senyawa lain yang telah berhasil diisolasi dari timun laut yaitu asam 12-metiltetradekanoat. Senyawa ini mampu menghambat proliferasi dari kultur sel kanker prostat. Selain itu, lektin yang terkandung dalam timun laut diketahui juga memperlihatkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker pada tikus dan sel kanker paru-paru manusia (Kelly, 2005).

2.2 *Holothuria coluber*

Timun laut ini mempunyai kebiasaan berpegang pada batu karang mati, terutama bagian posteriornya, sementara bagian anteriornya sering menjulur pada permukaan pasir. Spesies ini mirip dengan *Holothuria leucospilota*, bedanya

tentakel dan bukalnya berwarna kekuning-kuningan, sedangkan tentakel dan bukal *Holothuria leucospilota* berwarna hitam (Aziz, 1995).

Taksonomi *Holothuria coluber* menurut Arnold dan Birtles (1989) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
 Filum : Echinodermata
 Kelas : Holothuroidea
 Ordo : Aspidochirotida
 Famili : Holothuriidae
 Genus : *Holothuria*
 Spesies : *Holothuria coluber*

2.3 *Holothuria edulis*

Spesies ini berbentuk bulat panjang. Apabila diangkat dari permukaan air, badannya akan segera mengerut. Di seluruh badannya terdapat bintil-bintil halus. Jenis teripang ini mudah dikenal karena warnanya indah. Bagian punggungnya berwarna hitam keungu-unguan atau kebiru-biruan. Sedangkan pada bagian perut, sisi sekitar mulut, dan anus berwarna kemerah-merahan. Hidup di daerah perairan yang berkarang atau berpasir yang ditumbuhi ilalang laut (Martoyo dan Aji, n.d.). Adapun taksonominya adalah sebagai berikut: (Arnold dan Birtles, 1989)

Kingdom : Animalia
 Filum : Echinodermata
 Kelas : Holothuroidea
 Ordo : Aspidochirotida
 Famili : Holothuriidae
 Genus : *Holothuria*
 Spesies : *Holothuria edulis*

2.4 *Actinopyga lecanora*

Genus *Actinopyga* termasuk timun laut berukuran sedang, jenis tertentu dapat mencapai panjang total sekitar 30 cm. Hal yang paling menonjol pada genus *Actinopyga* adalah tubuhnya jadi memendek apabila dipegang dan berubah menjadi keras dan kaku. *Actinopyga lecanora* bila dipegang menjadi keras seperti bola karet. Warna tubuhnya abu-abu kecoklatan dengan bercak coklat kemerahan tersebar tidak merata pada bagian dorsalnya dan daerah seputar anusnya berwarna putih (Aziz, 1995). Taksonomi spesies ini adalah sebagai berikut: (Arnold dan Birtles, 1989)

Kingdom	: Animalia
Filum	: Echinodermata
Kelas	: Holothuroidea
Ordo	: Aspidochirotida
Famili	: Holothuriidae
Genus	: <i>Actinopyga</i>
Spesies	: <i>Actinopyga lecanora</i>

2.5 *Stichopus* sp.

Ciri anggota *Stichopus* adalah ukuran tubuhnya sedang-besar dengan penampang lintangnya cenderung trapesium, sisi dorsal dipenuhi oleh tuberkel atau papilla, sisi ventral dipenuhi oleh kaki tabung yang tersusun dalam 3 baris membujur dari anterior sampai posterior, dan spikulanya memiliki bentuk khas berupa batang bentuk C dan batang bentuk S (Wirawati, Setyastuti, dan Purwati, 2007).

Taksonomi *Stichopus* sp. menurut Arnold dan Birtles (1989) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Echinodermata
Kelas	: Holothuroidea
Ordo	: Aspidochirotida

Famili : Stichopodidae
Genus : *Stichopus*
Spesies : *Stichopus* sp.

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Seperti telah disebutkan sebelumnya, tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik kandungan kimia yang terdapat dalam simplisia oleh karena itu, metode ekstraksi yang digunakan akan tergantung pada jenis kandungan kimia yang ingin diperoleh. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Beberapa metode yang sering digunakan dalam ekstraksi bahan alam antara lain (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000):

2.6.1 Cara Dingin

2.6.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Prinsip dari maserasi adalah perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi

keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

Metode ini sederhana, tetapi masih secara luas digunakan, prosedurnya dilakukan dengan merendam bahan tanaman (simplisia) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Terkadang dilakukan sonikasi untuk mengurangi waktu yang diperlukan untuk ekstraksi. Setelah ekstraksi, residu bahan tanaman (maserat) harus dipisahkan dari pelarut dengan cara penyaringan. Sentrifugasi mungkin diperlukan jika serbuk terlalu halus untuk disaring. Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh, umumnya dilakukan maserasi pendahuluan, yang diikuti pemisahan dan penambahan pelarut baru (*fresh solvent*) ke maserat. Hal ini bisa dilakukan secara periodik dengan semua filtrat dikumpulkan (Sarker, Latif, dan Gray, 2006).

Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya sederhana sementara kelemahan yang utama 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. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut pada temperatur kamar. Di lain pihak, dikarenakan ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas (Sarker, Latif, dan Gray, 2006).

2.6.1.2 Perkolasi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

Perkolasi adalah proses mengekstraksi senyawa terlarut dari jaringan selular simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Perkolasi dilakukan dengan menggunakan sebuah alat bernama perkolator. Perkolasi dilakukan dengan kecepatan yang lambat, 1 ml per menit untuk setiap kg simplisia. Untuk mengekstrak secara menyeluruh dilakukan penambahan pelarut yang baru dan semua ekstrak dikumpulkan.

2.6.2 Cara Panas

2.6.2.1 Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi berkesinambungan dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

Keuntungan dari metode ini adalah digunakan pelarut yang tidak banyak. Akan tetapi, karena pelarut didaur ulang, ekstrak yang terkumpul pada wadah di sebelah bawah terus-menerus dipanaskan sehingga dapat menyebabkan reaksi peruraian oleh panas (Sarker, Latif, dan Gray, 2006).

2.6.2.2 Refluks (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

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.

2.6.2.3 Infus (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

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).

2.6.2.4 Dekok (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

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

2.6.2.5 Digesti (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

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

2.7 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka teknik ini disebut kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*), sementara bila berupa zat cair, maka disebut dengan kromatografi pembagian (*partition chromatography*) (Harmita, 2006).

Metode kromatografi dipakai secara luas untuk pemisahan analitik dan preparatif. Hampir setiap campuran kimia, mulai dari bobot molekul rendah sampai tinggi dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya dengan beberapa metode kromatografi. Jenis pemisahan (analitik atau preparatif) tidak ditentukan oleh ukuran cuplikan, melainkan oleh keperluan khusus. Pada umumnya kromatografi analitik digunakan pada tahap permulaan untuk semua cuplikan, sedangkan kromatografi preparatif hanya dilakukan jika diperlukan fraksi murni dari campuran (Gritter, Bobbit, dan Schwarting, 1985).

Faktor-faktor yang berpengaruh pada pemisahan secara kromatografi ialah: (1) kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), (2) kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsorpsi, penjerapan), dan (3) kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap (keatsirian). Pada sistem kromatografi, campuran yang akan dipisahkan ditempatkan dalam keadaan demikian rupa sehingga komponen-komponennya harus menunjukkan dua dari ketiga sifat tersebut. Hal ini mungkin melibatkan dua sifat yang berlainan, misalnya penjerapan dan kelarutan, atau

mungkin melibatkan satu sifat pada dua lingkungan, misalnya kelarutan di dalam dua cairan yang tidak bercampur (Gritter, Bobbit, dan Schwarting, 1985). Jenis-jenis kromatografi yang biasa digunakan dalam pemisahan dan pemurnian kandungan kimia bahan alam, antara lain:

2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Metode ini digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat, dengan menggunakan zat penjerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca (Harmita, 2006; Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

Pada hakikatnya, KLT melibatkan dua peubah yaitu sifat fase diam atau sifat lapisan, dan sifat fase gerak atau campuran pelarut pengembang. Fase diam dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penjerap (kromatografi cair-padat) atau berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair (kromatografi cair-cair). Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kiselgur (tanah diatome), dan selulosa (Gritter, Bobbit, dan Schwarting, 1985).

Penggunaan kromatografi lapis tipis dapat dimaksudkan untuk dua tujuan. Pertama, digunakan selayaknya sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif. Kedua, digunakan untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom (Gritter, Bobbit, dan Schwarting, 1985).

2.7.2 Kromatografi Kolom (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979)

2.7.2.1 Kromatografi Kolom Adsorpsi

Pada kromatografi kolom adsorpsi zat penjerap (misalnya aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel, kiselgur terkalsinasi, dan kiselgur kromatografi murni) dalam keadaan kering atau sebagai bubuk, dimampatkan ke

dalam tabung kromatografi kaca atau kuarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir keluar dengan ukuran tertentu. Zat yang akan diuji dilarutkan dalam sejumlah kecil pelarut kemudian dituangkan ke dalam kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penjerap. Zat berkhasiat diadsorpsi dari larutan secara sempurna oleh bahan penjerap berupa pita sempit pada puncak kolom. Dengan penambahan pelarut lebih lanjut melalui kolom, oleh dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat bergerak turun dalam kolom dengan kecepatan tertentu, sehingga terjadi pemisahan dan diperoleh kromatogram. Kecepatan bergerak 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.

2.7.2.2 Kromatografi Kolom Partisi

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. Hal ini menyebabkan diperolehnya pemisahan yang baik yang tidak dapat dicapai dengan cara penyarian cairan-cairan yang biasa. Kromatografi partisi dilakukan dengan cara yang serupa dengan kromatografi adsorpsi, yaitu campuran yang telah dilarutkan dalam sedikit pelarut, ditambahkan pada permukaan kolom dan eluasi dilakukan dengan pelarut yang mengalir. Selain dilarutkan dalam sedikit pelarut, penyiapan sampel juga dapat dilakukan dengan melarutkan zat uji dengan fase diam dan menambahkan sedikit zat penjerap.

2.8 *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Harmita dan Radji, 2006)

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 keterulangannya cukup baik. Beberapa senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dan aktivitasnya dimonitor dengan BSLT menunjukkan adanya korelasi terhadap suatu uji spesifik antikanker.

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 tanaman yang ditunjukkan sebagai toksisitas terhadap larva *Artemia salina*. Toksisitas ditentukan dengan melihat harga LC_{50} yang dihitung berdasarkan analisis probit. Ekstrak ditentukan dengan melihat $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$.

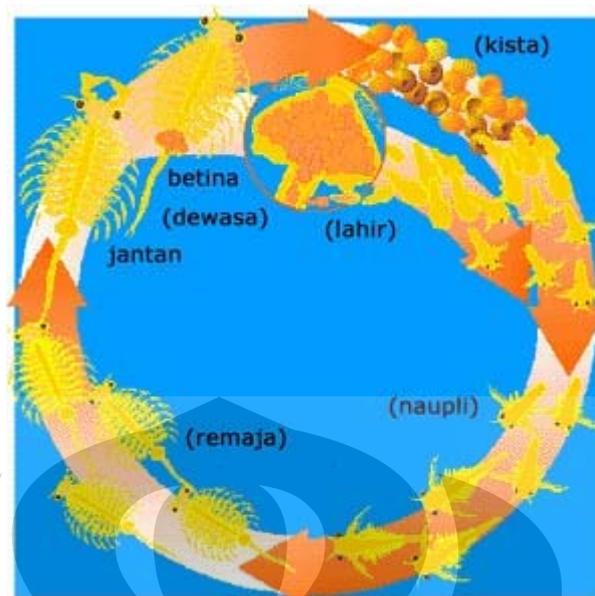
2.9 *Artemia salina*

Artemia salina merupakan kelompok udang-udangan dari filum Arthropoda. Hewan ini memegang peranan penting dalam aliran energi pada rantai makanan dan dapat digunakan dalam uji laboratorium untuk menentukan toksisitas dengan memperkirakan nilai LC_{50} . Kemampuan hidup telur yang tinggi, kemudahan dalam proses penetasan, kecepatan tumbuh *nauplii*, dan kemudahan dalam merawat populasi pada kondisi laboratorium menjadikan *Artemia salina* sebagai hewan uji yang efektif dan sederhana (Kanwar, 2007).

Artemia hanya ditemukan pada danau-danau garam (berair asin) dimana predator tidak mampu bertahan hidup. Populasi *Artemia* ditemukan di sekitar 500 danau-danau asin alami dan buatan. Penyebaran *Artemia* tidak merata karena tidak semua daerah berkadar garam tinggi didiami oleh hewan ini. Keistimewaan dari hewan ini adalah kemampuannya untuk memproduksi dorman embrio, yang

disebut kista. Bentuk dorman ini dapat disimpan selama bertahun-tahun dengan syarat kondisi penyimpanan harus dijaga agar tetap kering. Pada kondisi yang optimum, *Artemia* dapat hidup selama beberapa bulan dan berkembang dari bentuk *nauplii* hingga dewasa hanya dalam waktu 8 hari. *Artemia* dewasa dapat memproduksi *nauplii* atau kista hingga 300 ekor setiap 4 hari (Stappen, 1996).

Siklus hidup *Artemia* bisa dimulai dari saat menetasnya kista atau telur. Setelah 16 - 24 jam pada suhu 25°C kista akan menetas menjadi embrio. Dalam waktu beberapa jam embrio ini masih akan tetap menempel pada kulit kista. Pada fase ini embrio akan menyelesaikan perkembangannya kemudian berubah menjadi *nauplii* tahap I (instar I) yang sudah akan bisa berenang bebas dengan ukuran 400 mikron, lebar 170 mikron dan berat 15 mikrogram. Pada awalnya *nauplii* akan berwarna orange kecoklatan akibat masih mengandung kuning telur. *Artemia* yang baru menetas tidak akan makan, karena mulut dan anusnya belum terbentuk dengan sempurna. Setelah 24 jam menetas mereka akan ganti kulit dan memasuki tahap larva kedua (instar II). Dalam fase ini mereka akan mulai makan, dengan pakan berupa mikroalga, bakteri, dan detritus organik lainnya. Pada dasarnya mereka tidak akan peduli (tidak pemilih) jenis pakan yang dikonsumsinya selama bahan tersebut tersedia di air dengan ukuran yang sesuai. Tingkatan selanjutnya, pada kanan dan kiri mata *nauplii* terbentuk sepasang mata majemuk. Bagian samping badannya mulai tumbuh tunas-tunas kaki, setelah instar XV kakinya sudah lengkap sebanyak 11 pasang. *Nauplii* menjadi *Artemia* dewasa. *Nauplii* akan berganti kulit sebanyak 15 kali sebelum menjadi dewasa dalam waktu 8 hari. *Artemia* dewasa rata-rata berukuran sekitar 8 mm, meskipun demikian pada kondisi yang tepat mereka dapat mencapai ukuran sampai dengan 20 mm (*Artemia salina*, n.d.).



[Sumber: *Artemia salina*, n.d.]

Gambar 2.5 Siklus hidup *Artemia salina*

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan selama proses penetasan adalah aerasi, suhu, salinitas, pH, dan kepadatan kista. Untuk mencapai kondisi penetasan yang optimal, intensitas aerasi harus cukup untuk menjaga kadar oksigen di atas 2 mg/l. Selain itu, suhu medium juga harus dijaga berada dalam kisaran 25-28°C. Pada suhu dibawah 25°C kista akan lebih lama menetas sedangkan pada suhu di atas 33°C metabolisme kista akan berhenti secara irreversibel. Syarat lainnya adalah salinitas antara 30-50‰ dan pH dengan selang 8-9 merupakan selang yang paling baik, pH di bawah 5 atau lebih tinggi dari 10 dapat membunuh *Artemia*. Untuk meningkatkan pH dapat ditambahkan NaHCO₃. Faktor selanjutnya yang perlu diperhatikan adalah kepadatan kista yang akan mempengaruhi beberapa faktor abiotik seperti pH, oksigen, dan penerangan (Stappen, 1996).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi, FMIPA UI pada bulan Februari-Mei 2010.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Bahan uji utama berupa empat spesies timun laut yaitu *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. yang dikumpulkan dari Kepulauan Seribu pada daerah ratahan terumbu pada Januari 2010. Semua sampel dideterminasi oleh Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

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

3.2.2 Bahan Kimia

Pelarut untuk maserasi: metanol teknis yang telah didestilasi; pelarut untuk fraksinasi: n-heksan, etil asetat teknis yang telah didestilasi, dan aquadest; pelarut untuk kolom: metanol, kloroform teknis yang telah didestilasi, dan aquadest; pelarut untuk KLT: butanol (Merck) dan kloroform p.a (Merck); lempeng silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), serbuk silika gel 60 H (Merck 1.07734.1000) sebagai fase diam pada kromatografi kolom; bahan untuk uji toksisitas: air laut komersil, DMSO (Merck); reagen untuk penampak bercak: asam sulfat pekat P (Merck), etanol teknis terdestilasi; reagen untuk penapisan kimia: asam klorida 2N, aluminium klorida, asam borat, asam asetat glasial p.a. (Merck), asam oksalat,

asam sulfat pekat P (Merck), asam sulfat encer P, benzen p.a (Merck), besi (III) klorida, eter P, etil asetat p.a (Merck), gelatin, n-heksan p.a (Merck), kloroform p.a (Merck), larutan NaCl P, metanol p.a (Merck), natrium klorida-gelatin LP, natrium sulfat anhidrat P, n-butanol p.a (Merck), serbuk magnesium, serbuk seng, timbal (II) asetat, pereaksi Baljet LP, Mayer LP, dan Molish LP.

3.3 Alat

Mesin penggiling (Waring commercial), penguap putar vakum (Buchi dan Ikadest), timbangan analitik (Acculab dan Acis), penangas air (Imperial), oven vakum (Hotpack), mesin pengocok, wadah penetasan, aerator, bejana KLT, kolom 1 x 21 cm, klem, statif, lampu ultraviolet (Camag), corong, corong pisah 250 ml (Pyrex), spatel logam, labu Erlenmeyer (Pyrex), beaker glass (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan penguap (jangkar), batang pengaduk, pipet tetes, plat tetes, labu ukur (Pyrex), vial 5 ml, pipet endorf (Socorex), tip pipet, balon pipet (Merriemfield), mat pipet (Pyrex).

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Penyediaan Simplisia

Empat spesies timun laut yaitu *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. dikumpulkan dari perairan laut di Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu pada daerah rataan terumbu. Timun laut dibersihkan dari kotoran yang berasal dari laut dengan cara disiram beberapa kali menggunakan air laut, kemudian direndam dalam etanol. Tahap selanjutnya timun laut dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, kemudian direndam kembali dalam etanol.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak

Pertama-tama etanol yang digunakan untuk merendam timun laut disisihkan terlebih dahulu. Pasir yang terdapat dalam perut timun laut dibersihkan. Selanjutnya timun laut dihaluskan menggunakan mesin penggiling untuk laboratorium (*laboratory blender*) dengan kecepatan tinggi selama 5 menit, timun laut ditimbang sebagai massa basah. Sebanyak ± 150 g massa basah timun laut dimaserasi dengan pelarut metanol sebanyak 500 ml selama 3 hari kemudian disaring. Ekstraksi diulang sampai filtrat metanol hampir jernih. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum (pada suhu $\leq 40^{\circ}\text{C}$) sehingga diperoleh ekstrak kental tetapi masih dapat mengalir, lalu ekstrak dikeringkan dalam oven yang bersuhu $\leq 40^{\circ}\text{C}$. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang dan selanjutnya akan disebut sebagai ekstrak metanol.

3.4.3 Penetasan Telur *Artemia salina*

Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening seperti gelas kimia atau stoples yang diberi bahan plastik, negatif film, atau kaca. Wadah penetasan dibagi menjadi dua bagian, yaitu bagian terang dan gelap, oleh suatu sekat berlubang. Bagian gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah lahir untuk bergerak secara alamiah ke arah terang.

Selama penetasan, wadah penetasan diberi penerangan dengan cahaya lampu 40 watt agar suhu penetasan 25°C - 28°C tetap terjaga. Sebagai media penetasan telur, digunakan air laut komersil yang berasal dari Kepulauan Seribu (Pulau Belanda) yang diambil pada jarak 5 m dari tepian pulau dan pada kedalaman 3 m dengan salinitas 33-35%. Sewaktu penetasan digunakan aerator dan aerasi dihentikan ketika telur pertama mulai menetas. Dalam waktu 16-24 jam, biasanya telur-telur sudah menetas menjadi larva yang disebut *nauplii*. *Nauplii* aktif yang telah berumur 48 jam digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian.

3.4.4 Uji Toksisitas Ekstrak Metanol

Larutan stok (induk) sampel dibuat dengan konsentrasi 10000 µg/ml yaitu dengan melarutkan 100 mg ekstrak dalam 10,0 ml metanol. Larutan induk dipipet masing-masing sebanyak 1,25 ml, 2,5 ml, dan 3,75 ml untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 2500, 5000, dan 7500 µg/ml dalam volume total 5 ml. Sementara untuk membuat larutan 1000 µg/ml, dipipet sebanyak 1,0 ml larutan 5000 µg/ml kemudian volumenya dicukupkan dengan metanol hingga 5 ml. Larutan uji dibuat dengan memipet sebanyak 0,5 ml dari masing-masing larutan 1000, 2500, 5000, 7500, dan 10000 µg/ml ke dalam vial-vial sehingga diperoleh konsentrasi akhir dalam vial sebesar 100, 250, 500, 750 dan 1000 µg/ml (volume akhir medium dalam vial adalah 5 ml). Tiap konsentrasi dibuat 3 replikasi, begitu pula dengan kontrol negatif (blanko), tiga vial untuk tiap seri pengambilan. Ke dalam vial kontrol hanya dimasukkan metanol pada volume yang sama dengan volume sampel. Larutan uji dalam vial diuapkan sampai kering sehingga tidak mengandung metanol.

Ekstrak kering dalam vial dilarutkan dalam air laut secukupnya. Sepuluh ekor larva *Artemia salina* dipindahkan ke dalam masing-masing vial yang telah berisi senyawa uji dan ditambahkan air laut sampai volume 5 ml. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dan toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati, yaitu larva yang setelah selama beberapa detik pengamatan tidak bergerak. Jumlah larva mati pada sampel dibandingkan dengan kontrol. Persen kematian sampel dihitung sebagai berikut :

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva mati pada sampel} - \text{kontrol}}{\text{jumlah larva awal}} \times 100\%$$

LC₅₀ ditentukan dengan menggunakan program komputer analisis probit pada taraf kepercayaan 95%.

3.4.5 Fraksinasi Ekstrak Paling Aktif

3.4.5.1 Fraksinasi dengan n-Heksan

Sebanyak 11,3595 gram ekstrak metanol dari spesies dengan aktifitas tertinggi dan jumlah total ekstrak terbanyak disuspensikan dalam 80 ml air dan dihomogenkan. Ekstraksi cair-cair dilakukan menggunakan corong pisah dengan n-heksan pada volume yang sama dengan jumlah air sehingga terbentuk dua lapisan. Cairan dikocok perlahan, kemudian lapisan n-heksan dikumpulkan. Ekstraksi diulang hingga lapisan n-heksan jernih. Masing-masing lapisan digabungkan dan diperoleh dua gabungan lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan n-heksan. Kemudian lapisan n-heksan diuapkan, yang selanjutnya akan disebut sebagai fraksi n-heksan.

3.4.5.2 Fraksinasi dengan Etil Asetat

Terhadap lapisan air yang diperoleh pada cara (3.4.5.1) ditambahkan etil asetat yang sama jumlahnya dengan lapisan air sehingga terbentuk dua lapisan. Cairan dikocok perlahan, kemudian lapisan etil asetat dikumpulkan. Ekstraksi diulang hingga lapisan etil asetat jernih. Masing-masing lapisan digabungkan dan diperoleh dua gabungan lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan etil asetat. Kemudian lapisan etil asetat diuapkan, yang selanjutnya akan disebut sebagai fraksi etil asetat.

3.4.5.3 Memperoleh Fraksi Air

Lapisan air yang diperoleh pada cara (3.4.5.2) diuapkan, dan selanjutnya disebut sebagai fraksi air.

3.4.6 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air

Pengujian toksisitas ketiga fraksi dilakukan seperti pada pengujian ekstrak metanol dengan metode BSLT. Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Pada sampel yang tidak larut dalam air laut ditambahkan DMSO (dimetil sulfoksida) sebanyak 2 tetes setiap vial, baik sampel maupun kontrol negatif. Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 1, 10, 50, 100, dan 150 $\mu\text{g/ml}$ untuk fraksi etil asetat sedangkan pada fraksi n-heksan dan air, seri konsentrasi larutan uji adalah 100, 250, 500, 750, dan 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pembuatan larutan uji fraksi n-heksan dan air sama seperti prosedur pembuatan larutan uji ekstrak metanol. Pada fraksi etil asetat, larutan stok sampel dibuat dengan konsentrasi 1500 $\mu\text{g/ml}$ kemudian dari larutan induk tersebut dipipet sebanyak 2,0 ml dan dicukupkan volumenya sampai 30 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$. Untuk membuat larutan 10 dan 50 $\mu\text{g/ml}$, dipipet sebanyak 0,5 ml dan 10,0 ml larutan 100 $\mu\text{g/ml}$ lalu dicukupkan volumenya masing-masing hingga 5 ml dan 20 ml. Larutan uji dibuat dengan memipet masing-masing sebanyak 0,5 ml dari larutan 10, 100, dan 1500 $\mu\text{g/ml}$ sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi berturut-turut 1, 10, dan 150 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan larutan uji dengan konsentrasi 50 dan 100 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dengan memipet masing-masing sebesar 5,0 ml dari larutan 50 dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Volume akhir medium dalam vial uji adalah 5 ml. LC_{50} diperoleh dengan analisis probit. Fraksi yang akan digunakan untuk analisis selanjutnya adalah fraksi yang paling aktif, yaitu fraksi dengan nilai LC_{50} paling kecil.

3.4.7 Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi dengan aktivitas toksisitas tertinggi selanjutnya di kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan fase diam silika gel yang bertujuan untuk mencari eluen yang nantinya akan digunakan sebagai eluen dalam kromatografi kolom. Sebagai penampak bercak digunakan asam sulfat 5% dalam etanol P dengan pemanasan 100-110°C.

3.4.8 Pemisahan Fraksi Paling Aktif dengan Kromatografi Kolom Normal

Pemisahan dilakukan terhadap fraksi dengan LC_{50} terendah dengan menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform-metanol-air (3:7:1, v/v). Pemilihan fase gerak didasarkan pada orientasi yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan kromatografi lapis tipis.

Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom yang berdiameter 1 cm dan memiliki panjang 21 cm. Kolom dikemas dengan cara basah. Silika gel dibuat lumpuran dengan bagian lain dari pelarut dan lumpuran ini dituangkan ke dalam kolom. Selama proses pengendapan, kolom diketuk-ketuk pada semua sisi secara perlahan-lahan agar diperoleh lapisan yang seragam. Ketinggian fase diam adalah kurang lebih $\frac{3}{5}$ tinggi kolom. Fraksi aktif yang akan dipisahkan sebanyak 33,4 mg dilarutkan dalam fase gerak yang akan digunakan untuk pemisahan. Sampel yang akan dipisahkan tersebut diteteskan secara perlahan mengitari kolom. Setelah itu eluen dialirkan dan masing-masing fraksi yang diperoleh ditampung sebanyak 1 ml. Pada semua fraksi yang diperoleh dilakukan KLT dengan eluen kloroform-butanol (3:2, v/v) dan fraksi-fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama disatukan sehingga diperoleh fraksi yang lebih sedikit. Fraksi-fraksi yang telah disatukan tersebut lalu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui fraksi yang paling toksik.

3.4.9 Uji Toksisitas Fraksi-Fraksi Hasil Kolom

Fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom dilakukan pengujian toksisitas dengan metode yang sama seperti pada ekstrak metanol dan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air. Pada sampel yang tidak larut dalam air laut ditambahkan DMSO (dimetil sulfoksida) sebanyak 2 tetes setiap vial, baik sampel maupun kontrol negatif. Seri konsentrasi larutan uji adalah 1, 10, dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Pembuatan larutan uji diawali dengan pembuatan larutan induk 1000 $\mu\text{g/ml}$. Larutan induk dipipet ke dalam vial-vial uji masing-masing sebanyak 5,0 μl , 50,0 μl , dan 0,5 ml sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi berturut-turut 1, 10, dan 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.10 Identifikasi Golongan Kimia Fraksi Paling Aktif (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979)

Pada fraksi teraktif yang diperoleh dilakukan pemeriksaan kandungan kimia dengan beberapa pereaksi kimia antara lain pereaksi untuk alkaloid, flavonoid, glikosida, glikosida jantung, glikosida antraknon, saponin, steroid/triterpenoid dan tanin.

3.4.10.1 Identifikasi Alkaloid

Sampel ditambahkan asam klorida encer 2 N kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi Mayer LP, Bouchardat LP, dan Dragendorf LP untuk mengidentifikasi alkaloid. Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Hasil positif Dragendorf LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata. Penambahan Bouchardat LP memberikan hasil positif jika terbentuk endapan coklat sampai hitam.

3.4.10.2 Identifikasi Flavonoid

Sampel yang diuji ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 1 ml asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit lalu ditambahkan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terbentuk warna merah intensif hal tersebut menunjukkan adanya flavonoid.

Sampel yang diuji ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.

Sampel yang diuji diuapkan hingga kering, sisanya dibasahkan dengan aseton P kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan asam oksalat P. Secara hati-hati dipanaskan diatas penangas air dan hindari pemanasan yang berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 5 ml eter P. Perubahan

warna diamati dengan sinar UV 366 nm. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi kuning.

3.4.10.3 Identifikasi Glikosida

Sampel yang diuji ditambahkan larutan asam klorida 10% LP, direfluks selama 30 menit, didinginkan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh disari sebanyak tiga kali dengan eter P. Lapisan eter dipisahkan dan dikumpulkan. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat P kemudian disaring dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C. Sisa dilarutkan dengan metanol P. Larutan ini sebagai larutan percobaan.

a. Percobaan Umum terhadap Glikosida

Sebanyak 1 ml larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diuapkan diatas penangas air. Sisa ditambahkan 1 ml air dan 5 tetes Molisch LP lalu ditambahkan secara hati-hati 10 tetes asam sulfat P. Jika terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molisch).

b. Percobaan terhadap Glikosida Jantung

Sebanyak 5 tetes larutan percobaan diencerkan dengan 1 ml metanol kemudian ditambahkan 5 tetes Baljet LP. Bila terbentuk warna jingga setelah beberapa menit menunjukkan adanya glikosida dan aglikon kardenolid.

Sebanyak 5 tetes larutan percobaan diuapkan diatas penangas air. Sisa dilarutkan dengan 1 ml asam asetat P dengan sedikit pemanasan, didinginkan kemudian diteteskan larutan besi (III) klorida 0,3 M kemudian ditambah dengan hati-hati 3 tetes asam sulfat P dan 1 tetes besi (III) klorida 0,3 M. Bila terbentuk cincin warna merah coklat pada batas cairan dan setelah beberapa menit diatas cincin berwarna biru hijau menunjukkan adanya glikosida dan glikon 2-desoksi gula (reaksi Keller–Kiliani).

c. Percobaan terhadap Glikosida Antrakinon

Sebanyak 1 ml larutan percobaan diuapkan di atas penangas air. Residu ditambahkan 1 ml benzen P, dikocok dan didiamkan, kemudian lapisan benzen dipisahkan. Filtrat yang berwarna kuning menunjukkan adanya antrakinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1-2 ml natrium hidroksida 2 N kemudian didiamkan, lapisan benzen yang tidak berwarna dan lapisan air yang berwarna merah intensif menunjukkan adanya antrakinon.

3.4.10.4 Identifikasi Saponin

Sampel yang akan diuji ditambahkan aquadest panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

3.4.10.5 Identifikasi Steroid/Triterpenoid

Reaksi Lieberman-Burchard dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa steroid/triterpenoid. Reaksi ini dilakukan dengan cara menambahkan sampel yang akan diuji dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat P. Setelah itu tambahkan 4 tetes asam sulfat P. Jika setelah penambahan asam sulfat P terbentuk warna biru/hijau, maka menunjukkan adanya steroid/triterpenoid.

3.4.10.6 Identifikasi Tanin

Sampel yang akan diuji dibagi menjadi tiga bagian dan berturut-turut ditambahkan pereaksi gelatin 10%, natrium klorida-gelatin, besi (III) klorida 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan pada penambahan gelatin 10% dan natrium klorida-gelatin, sedangkan dengan penambahan besi (III) klorida 3% ditunjukkan dengan terbentuknya larutan biru kehitaman atau hijau kehitaman.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyediaan Bahan

Biota laut merupakan kekayaan alam yang belum dimanfaatkan dan dieksplorasi secara optimal, khususnya dibidang pengobatan. Salah satu contohnya adalah timun laut yang saat ini sedang banyak diteliti karena kandungannya yang dipercaya dapat berkhasiat sebagai antikanker.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh toksisitas ekstrak metanol dari empat spesies timun laut dan mengetahui nilai toksisitas fraksi dari spesies dengan aktivitas tertinggi serta mengidentifikasi golongan kimia fraksi teraktif dari spesies dengan aktivitas tertinggi.

Hasil determinasi timun laut yang dilakukan di Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, FMIPA UI, menunjukkan bahwa spesies timun laut yang digunakan dalam penelitian adalah *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2 Pembuatan Ekstrak *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp.

Langkah awal penelitian adalah pembuatan ekstrak metanol dari tiap-tiap spesies sampel. Etanol yang digunakan untuk mengawetkan timun laut disisihkan terlebih dahulu dan diabaikan karena dianggap senyawa yang tersari didalamnya tidak signifikan. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi karena ekstraksi cara dingin ini dapat mencegah terurainya metabolit yang tidak tahan terhadap pemanasan. Lamanya proses ekstraksi akan mempengaruhi jumlah kandungan senyawa yang tersari, oleh karena itu maserasi dilakukan selama tiga hari agar proses ekstraksi benar-benar berlangsung secara optimal. Ekstraksi dilakukan berkali-kali hingga pelarut jernih yang menunjukkan bahwa senyawa yang diinginkan telah terekstraksi sempurna.

Massa basah sampel *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. yang digunakan berturut-turut adalah 118 g, 134 g, 342 g, dan 169 g. Dari hasil ekstraksi, diperoleh ekstrak yang berbau amis dan berwarna kuning kenari untuk ekstrak *Holothuria coluber*, *Actinopyga lecanora*, *Stichopus* sp. serta berwarna jingga untuk ekstrak *Holothuria edulis*. Penguapan ekstrak menggunakan penguap putar vakum pada temperatur $\leq 40^{\circ}\text{C}$. Hal ini bertujuan agar senyawa yang terkandung di dalam ekstrak tidak rusak karena kondisi yang dibuat vakum memungkinkan pelarut dapat menguap pada suhu rendah. Selain itu, pelarut yang menguap dapat ditampung dan digunakan kembali untuk maserasi berikutnya.

Ekstrak pekat yang diperoleh dari hasil penguapan dengan penguap putar vakum diuapkan kembali dengan bantuan penangas air hingga semua pelarutnya menguap. Adanya garam yang ikut tersari selama proses pengekstrakan menyebabkan ekstrak bersifat higroskopis sehingga diperlukan proses pengeringan dengan menggunakan oven. Ekstrak kering yang diperoleh dari *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. masing-masing adalah 1,8364 g (1,56%), 7,1529 g (5,34%), 12,3592 g (3,61%) dan 6,7688 g (4,01%). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Berdasarkan hasil yang diperoleh terlihat bahwa *Holothuria coluber* memiliki rendemen dengan persentase paling kecil. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan mekanisme pertahanan dirinya yang lebih mengutamakan pertahanan fisik dibanding pertahanan kimiawi. Hewan ini biasa bersembunyi di bawah karang dan menempel erat pada celah-celah karang untuk menghindari dirinya dari serangan biota pemangsa, seperti ikan, burung laut, dan kepiting. Perolehan nilai rendemen dari masing-masing spesies juga dapat dikaitkan dengan tingkat toksisitasnya. Besarnya jumlah persentase rendemen yang dimiliki oleh *Holothuria edulis* diperkirakan karena toksisitasnya yang kecil sehingga perlu dihasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih banyak agar dapat mengatasi serangan predator. Sementara pada *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. diperoleh jumlah rendemen yang lebih sedikit dibanding pada *Holothuria edulis*, kenyataan ini disebabkan toksisitas dari kedua spesies tersebut lebih besar daripada *Holothuria edulis*. Oleh karena itu, tidak diperlukan kadar yang terlalu

besar untuk membunuh predator sehingga senyawa kimiawi yang diproduksi pun hanya sedikit.

4.3 Penetasan Telur *Artemia salina*

Penetasan dilakukan dengan menggunakan wadah bening berbentuk persegi panjang yang terbagi menjadi dua bagian (bagian gelap dan terang) oleh suatu sekat berlubang. Bagian yang gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan, kemudian larva yang telah menetas akan bergerak secara alamiah ke arah bagian terang melalui sekat berlubang.

Sebagai media penetasan, digunakan air laut komersil yang berasal dari Kepulauan Seribu (Pulau Belanda) yang diambil pada jarak 5 m dari tepian pulau dan pada kedalaman 3 m dengan salinitas 33-35‰. Pada waktu awal penetasan dipasang aerator untuk mensuplai oksigen dan mendispersikan telur-telur agar waktu penetasan bisa bersamaan dan usia larva lebih seragam. Apabila larva sudah terlihat menetas, aerator harus segera dikeluarkan. Hal ini bertujuan untuk mencegah agar larva tidak mati akibat putaran air dalam media yang disebabkan oleh gelembung udara dari aerator. Dalam waktu 16-24 jam, telur menetas. Larva yang digunakan untuk uji toksisitas adalah yang berumur 48 jam setelah telur dimasukkan ke dalam medium penetasan karena pada umur tersebut larva sangat sensitif terhadap pengaruh lingkungan disebabkan dinding selnya masih lunak sehingga larva dapat digunakan sebagai indikator adanya bahan beracun pada medium.

4.4 Uji Toksisitas Ekstrak Metanol *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. dengan Metode BSLT

Pengujian toksisitas terhadap ekstrak metanol dari keempat spesies timun laut menggunakan metode BSLT. Uji dilakukan dengan membuat seri konsentrasi larutan sebesar 100, 250, 500, 750, dan 1000 µg/ml. Larutan uji tersebut diuapkan sampai kering sehingga tidak mengandung pelarut metanol. Selanjutnya ekstrak kering dalam vial dilarutkan dengan air laut secukupnya. Lalu sepuluh ekor larva

Artemia salina dimasukkan ke dalam masing-masing vial sampel dan kontrol dengan menggunakan pipet dan ditambahkan air laut sampai volumenya 5 ml. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dan toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati, yaitu larva yang setelah selama beberapa detik pengamatan tidak bergerak. Penghitungan larva yang mati dalam vial uji dilakukan dengan menggunakan bantuan lampu neon. Larva yang telah mati biasanya akan berada di dasar vial dan tidak bergerak. Efek pelarut organik dapat dieliminasi dengan adanya kontrol. Persen kematian kontrol yang nihil mengindikasikan bahwa pelarut organik tidak memberikan pengaruh yang signifikan.

Dari hasil pengujian diperoleh nilai LC_{50} ekstrak metanol *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. berturut-turut sebesar 585,218 $\mu\text{g/ml}$, 433,241 $\mu\text{g/ml}$, 227,094 $\mu\text{g/ml}$, dan 337,471 $\mu\text{g/ml}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2-4.5 dan Lampiran 2-5. Nilai LC_{50} dihitung dengan analisis probit menggunakan program komputer. Besarnya nilai LC_{50} menunjukkan ketoksikan suatu senyawa. Senyawa dikategorikan toksik jika nilai $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$. Data di atas menunjukkan bahwa ekstrak dari *Actinopyga lecanora* memiliki nilai toksisitas tertinggi. Perbedaan nilai LC_{50} dari tiap spesies disebabkan karena adanya kandungan senyawa yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut dapat terletak pada kadar ataupun jenis senyawa metabolit.

Tingkat toksisitas dari masing-masing spesies dapat dikaitkan dengan perilaku hidupnya dalam upaya mempertahankan diri dari serangan predator sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya. Timun laut yang mengandalkan pertahanan fisik sebagai mekanisme pertahanan diri biasanya hanya sedikit memproduksi senyawa kimiawi toksik. Pernyataan ini menjelaskan mengapa *Holothuria coluber* memiliki nilai toksisitas yang paling rendah dibandingkan dengan spesies lainnya. Spesies yang paling aktif adalah *Actinopyga lecanora*. Ukuran tubuh yang lumayan besar mungkin dapat menjelaskan pernyataan tersebut karena dengan ukuran tubuhnya yang besar maka kemungkinan untuk dapat ditemukan oleh predator pun semakin mudah. Oleh karena itu, *Actinopyga lecanora* membutuhkan cara untuk dapat mengatasi hal ini, yaitu dengan memproduksi senyawa metabolit yang bersifat sangat toksik.

4.5 Fraksinasi Ekstrak *Actinopyga lecanora* dengan n-Heksan, Etil Asetat, dan Air

Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak dengan aktifitas tertinggi dan massa total ekstrak terbanyak, yaitu ekstrak metanol dari *Actinopyga lecanora*. Metanol memiliki daya mengekstraksi senyawa dengan rentang kepolaran yang cukup luas dan dapat melarutkan berbagai senyawa. Oleh karena itu, untuk mempersempit lingkup analisis, maka ekstrak metanol dari *Actinopyga lecanora* difraksinasi dengan pelarut non-polar sampai yang paling polar yaitu n-heksan, etil asetat, dan air.

Pada proses fraksinasi digunakan ekstrak seberat 11,3595 g. Kemudian ekstrak dilarutkan dalam 80 ml air dan dimasukkan ke dalam corong pisah untuk diekstraksi cair-cair berturut-turut dengan n-heksan dan etil asetat. Pemisahan dilakukan sampai lapisan n-heksan dan etil asetat tidak berwarna. Pada n-heksan, fraksinasi dilakukan sebanyak dua kali sementara untuk etil asetat sebanyak delapan kali. Fraksi air yang diperoleh memiliki jumlah rendemen paling besar yaitu 8,2649 g (72,76%), dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan etil asetat yang jumlah rendemennya berturut-turut 1,9823 g (17,45%), dan 0,0542 g (0,48%). Hal ini kemungkinan disebabkan karena garam yang terdapat dalam ekstrak metanol terlarut seluruhnya ke dalam fraksi air. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.6 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air dengan Metode BSLT

Larutan uji dibuat dengan seri konsentrasi yang lebih kecil dibandingkan dengan seri konsentrasi pada pengujian ekstrak metanol, yaitu 1, 10, 50, 100, dan 150 µg/ml. Pada sampel yang tidak larut dalam air laut ditambahkan DMSO (dimetil sulfoksida) sebanyak 2 tetes setiap vial, baik sampel maupun kontrol negatif. Akan tetapi pada seri konsentrasi tersebut, nilai LC_{50} dari fraksi n-heksan dan air tidak dapat diperoleh karena semua hewan uji tidak ada yang mati sehingga seri konsentrasi untuk fraksi n-heksan dan air disamakan seperti pada pengujian ekstrak metanol, yaitu 100, 250, 500, 750, dan 1000 µg/ml.

Hasil uji memperlihatkan bahwa fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif karena memberikan LC_{50} paling kecil yaitu 158,276 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan nilai LC_{50} fraksi n-heksan dan air berturut-turut 921,508 $\mu\text{g/ml}$ dan 1674,138 $\mu\text{g/ml}$. Berarti efek toksik ekstrak metanol *Actinopyga lecanora* sebagian besar disebabkan oleh senyawa-senyawa semipolar. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7-4.9 dan Lampiran 6-8.

Berdasarkan nilai LC_{50} di atas, fraksi etil asetat ternyata sedikit lebih toksik dari ekstrak metanol. Hal tersebut disebabkan karena senyawa hasil fraksinasi bersifat lebih murni.

4.7 Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom Normal

Pemisahan kandungan kimia dilakukan untuk mendapatkan fraksi yang lebih murni. Kromatografi kolom memungkinkan pemisahan multikomponen sehingga dapat digunakan untuk tujuan preparatif. Pemisahan ini dilakukan terhadap fraksi etil asetat yang memberikan nilai LC_{50} terkecil dibanding dengan fraksi n-heksan dan air.

Preparasi sampel menggunakan cara basah dengan cara melarutkan fraksi kering etil asetat sebanyak 33,4 mg dalam fase gerak yang digunakan dalam kromatografi kolom. Pengemasan kolom juga dilakukan dengan cara basah, dimana silika gel sebagai fase diam yang telah disuspensikan dalam metanol dimasukkan sedikit demi sedikit secara perlahan-lahan ke dalam kolom berdiameter 1 cm. Pengisian kolom disertai pengetukan kolom secara perlahan-lahan untuk membantu fase diam turun secara merata ke seluruh bagian kolom serta untuk menghilangkan gelembung-gelembung udara yang terperangkap diantaranya. Pengemasan kolom memegang peranan penting pada proses pemisahan. Kolom harus dapat dipastikan benar-benar mampat dan tidak ada udara yang terperangkap di dalamnya karena udara yang terperangkap dapat menyebabkan kolom tidak homogen sehingga menghasilkan pemisahan yang tidak bagus.

Fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol-air (3:7:1, v/v). Fase gerak ini dipilih berdasarkan orientasi sebelumnya dengan menggunakan

kromatografi lapis tipis yang memberikan hasil bahwa campuran kloroform-metanol-air (3:7:1, v/v) menghasilkan pemisahan paling baik karena terdapat dua bercak memisah (Gambar 4.1). Penggunaan eluen ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat bersifat polar.

Dari hasil pemisahan dengan kromatografi kolom diperoleh 6 fraksi dengan tiap fraksi tampungan sebanyak 1 ml. Fraksi 1 sampai dengan fraksi 6 berwarna kuning dengan gradasi warna yang semakin memudar.

4.8 Uji Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Normal

Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom diekstraksi dengan sistem pengembang kloroform-butanol (3:2, v/v) menggunakan lempeng KLT GF₂₅₄ untuk memperoleh fraksi gabungan. Pemilihan eluen ini berdasarkan orientasi yang telah dilakukan sebelumnya. Profil KLT fraksi hasil kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Senyawa non polar tidak terikat kuat ke fase diam yang polar (silika gel) sehingga dengan eluen yang non polar akan tertahan lebih lama di fase gerak kemudian terbawa jauh ke garis depan dan memberikan bercak dengan R_f yang tinggi. Sebaliknya untuk senyawa polar akan tertahan oleh fase diam yang polar sehingga gerakannya terhambat dan R_fnya kecil.

Fraksi yang memiliki bercak yang sama digabungkan karena dianggap memiliki kandungan senyawa kimia yang sama. Pada Gambar 4.2 terlihat bahwa fraksi 1 dan 2 mempunyai pola bercak yang hampir sama, begitu pula dengan fraksi 3 dan 4, sedangkan untuk fraksi 5 dan 6 sama-sama tidak memiliki bercak. Oleh karena itu, fraksi-fraksi hasil fraksinasi ini disederhanakan menjadi 3 fraksi gabungan, yaitu fraksi I, II, dan III (Gambar 4.3). Fraksi I-III masing-masing menghasilkan berat 10,5, 20,7, dan 2,2 mg. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.10.

4.9 Uji Toksisitas Fraksi I-III dengan Metode BSLT

Uji BSLT dari tiap fraksi memperlihatkan bahwa nilai toksisitas tertinggi dimiliki oleh fraksi I dengan LC_{50} sebesar 84,202 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diikuti oleh fraksi II sebesar 162,475 $\mu\text{g/ml}$, dan fraksi III sebesar 311,732 $\mu\text{g/ml}$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.11-4.13 dan Lampiran 9-11.

Hasil ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa yang bertanggung jawab dalam toksisitas *Actinopyga lecanora* terdapat dalam fraksi I. Nilai toksisitas yang rendah pada fraksi III mungkin dikarenakan kadar senyawa aktif yang kecil. Hal ini terlihat dari hasil lempeng KLT yang menunjukkan tidak adanya bercak yang muncul setelah proses eluasi.

4.10 Identifikasi Golongan Kimia dalam Fraksi I

Terhadap fraksi gabungan paling aktif, yaitu fraksi I dilakukan identifikasi golongan kimia dengan berbagai pereaksi kimia. Dari hasil pemeriksaan diperoleh hasil bahwa fraksi I diduga mengandung golongan flavonoid dan steroid/triterpenoid. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang menyatakan bahwa senyawa yang bertanggung jawab dalam toksisitas timun laut adalah senyawa triterpen glikosida yang masuk ke dalam golongan kimia steroid/triterpenoid. Hasil uji yang negatif pada beberapa golongan kimia kemungkinan dikarenakan kadarnya yang terlalu kecil sehingga tidak dapat terdeteksi dengan menggunakan pereaksi kimia, meskipun pada lempeng KLT terlihat bahwa fraksi I mempunyai lebih dari dua buah bercak. Hasil pemeriksaan selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.14.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian terhadap ekstrak metanol *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstrak *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus* sp. bersifat toksik dengan nilai LC_{50} masing-masing 585,218 $\mu\text{g/ml}$, 433,241 $\mu\text{g/ml}$, 227,094 $\mu\text{g/ml}$, dan 337,471 $\mu\text{g/ml}$.
2. Fraksinasi ekstrak *Actinopyga lecanora* diperoleh fraksi etil asetat sebagai fraksi yang paling aktif dengan LC_{50} sebesar 158,276 $\mu\text{g/ml}$.
3. Fraksinasi lebih lanjut dari fraksi etil asetat dengan kromatografi kolom diperoleh fraksi III memiliki toksisitas paling tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 84,202 $\mu\text{g/ml}$ dan diduga mengandung senyawa golongan flavonoid dan steroid/triterpenoid.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis dan komposisi eluen yang terbaik agar diperoleh hasil pemisahan yang bagus.
2. Sebaiknya dilakukan uji aktivitas farmakologis untuk lebih mengoptimalkan pemantauan terhadap sifat bioaktif *Actinopyga lecanora*.
3. Agar diperoleh senyawa murni perlu dilakukan isolasi.

DAFTAR ACUAN

- Arnold, P. W., dan Birtles, R. A. (Maret-April, 1987). *Soft-sediment marine invertebrates of southeast Asia and Australia: A guide to identification*. Townsville: Australian Institute of Marine Science.
- Artemia salina*. (n.d.). 20 Januari 2010. <http://www.o-fish.com/PakanIkan/artemia.php>.
- Astuti, P., et al. (2005). Uji sitotoksik senyawa alkaloid dari spons *Petrosia* sp.: Potensial pengembangan sebagai antikanker. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 6, No. 1, 58-62.
- Avilov, S. A. (2003). Triterpene glycosides from the far eastern sea cucumber *Cucumaria conicospermium*. *Journal of Natural Products*, Vol. 66, No. 7, 910-916.
- Aziz, Aznam. (1995). Beberapa catatan tentang teripang bangsa Aspidochirotida. *Oseana*, Vol. 20, No. 4, 11-23.
- Bao Shu Liu, et al. (2007). Arguside a: A new cytotoxic triterpene glycoside from the sea cucumber *Bohadschia argus* JAEGER. *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 4.
- Careaga, V. P., et al. (2009). Antiproliferative, cytotoxic and hemolytic activities of a triterpene glycoside from *Psolus patoginus* and its desulfated analog. *Chemotherapy*, Vol. 55, 60-68.
- Chludil, H. D., et al. (2002). Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the patagonian sea cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *Journal of Natural Products*, Vol. 65, No. 6, 860-865.
- Dang, N. H., et al. (2007). Two new triterpene glycosides from the vietnamese sea cucumber *Holothuria scabra*. *Archives of Pharmacal Research*, Vol. 30, No. 11, 1387-1391.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope indonesia* (Ed. ke-3). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 780.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Materia medika indonesia jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 142-150, 167-171.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dharmanada, Subhuti. (n.d.). *Sea cucumber: Food and medicine*. 15 Januari 2010. <http://www.itmonline.org/arts/seacucumber.htm>.
- Gritter, R. J., Bobbit, J. M., Schwarting, A. E. (1985). *Pengantar kromatografi. Terj. dari introduction to chromatography* (Padmawinata K., Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB, 107-183.
- Harmita, dan Radji, M. (2006). *Buku ajar analisis hayati*. (Ed. ke-3). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 76-78.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, 101, 205.
- International Agency for Research on Cancer. (2008). *2007 Annual world cancer data update*. IARC Press Release.
- Jasin, M. (1992). *Zoologi invertebrata untuk perguruan tinggi*. Surabaya: Sinar Wijaya, 268-273.
- Jun Wu, et al. (2007). Hillasides A and B, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria hilla* Lesson. *Journal of Asian Natural Product Research*, Vol. 9, No. 7, 609-615.
- Kanwar, A. S. (2007). Brine shrimp (*Artemia salina*): A marine animal for simple and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, Vol. 2, No. 4, 236-240.
- Kelly, M. S. (2005). *Echinoderms: Their culture and bioactive compounds*. Berlin: Springer, 153-156.
- Kijjoa, Anake, dan Sawangwong, Pichan. (2004). Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, Vol. 2, 73-82.
- Koji, Y., et al. (2001). Constituents of holothuroidea. 10. Isolation and structure of a biologically active ganglioside molecular species from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 49, No. 4, 447-452.
- Maier, M. S., et al. (2001). Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the antarctic sea cucumber *Staurocucumis liovillei*. *Journal of Natural Products*, Vol. 64, No. 6, 732-736.

- Marini, Frank. (n.d). *Brine shrimp*. 5 Juni 2010. <http://www.advancedaquarist.com/issues/dec2002/breeder.htm>.
- Martoyo, J., dan Aji. *Budidaya teripang*. 18 Januari 2010. <http://book.google.com>.
- Nontji, A. (1993). *Laut nusantara*. Djambatan, 200-202.
- Rasyid, Abdullah. (2008). Biota laut sebagai sumber obat-obatan. *Oseana*, Vol. 33, No. 1, 11-18.
- Sarker, D. S., Latif, Z., dan Gray, A. I. (2006). *Natural product isolation* (ed. ke-2). New Jersey: Humana Press, 327-329.
- Setyawati, E. P., et al. (2007). Isolasi senyawa sitotoksik spons Kaliapis. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 18, No. 4, 183-189.
- Shu Y. Z., Yang H. Y., Hai F. T. (2006). Cytotoxic sulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Pseudocolochirus violaceus*. *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 3.
- Stappen, V. G. (1996). *Artemia: Introduction, biology and ecology of Artemia*. In Patrick Lavens dan Patrick sargelous (Ed.). *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (pp. 79-85). Rome: FAO Fisheries Technical Paper, No. 361.
- Wirawati, I., Setyastuti, A., Purwati, P. (2007). Timun laut anggota famili Stichopodidae (Aspidochirotida, Holothuroidea, Echinodermata) koleksi puslit oseanografi LIPI, Jakarta. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, Vol. 33, 355-380.



GAMBAR



Keterangan : bobot per hewan adalah ± 39 g

Gambar 2.1 *Holothuria coluber*



Keterangan : bobot per hewan adalah ± 134 g

Gambar 2.2 *Holothuria edulis*



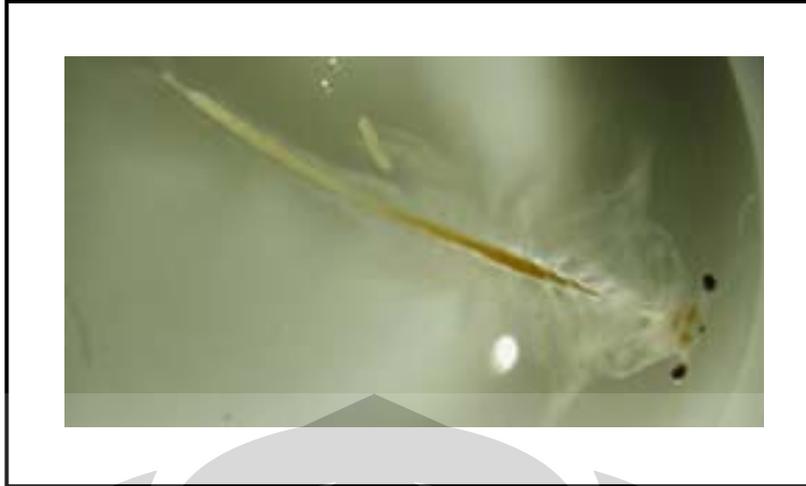
Keterangan : bobot per hewan adalah ± 342 g

Gambar 2.3 *Actinopyga lecanora*



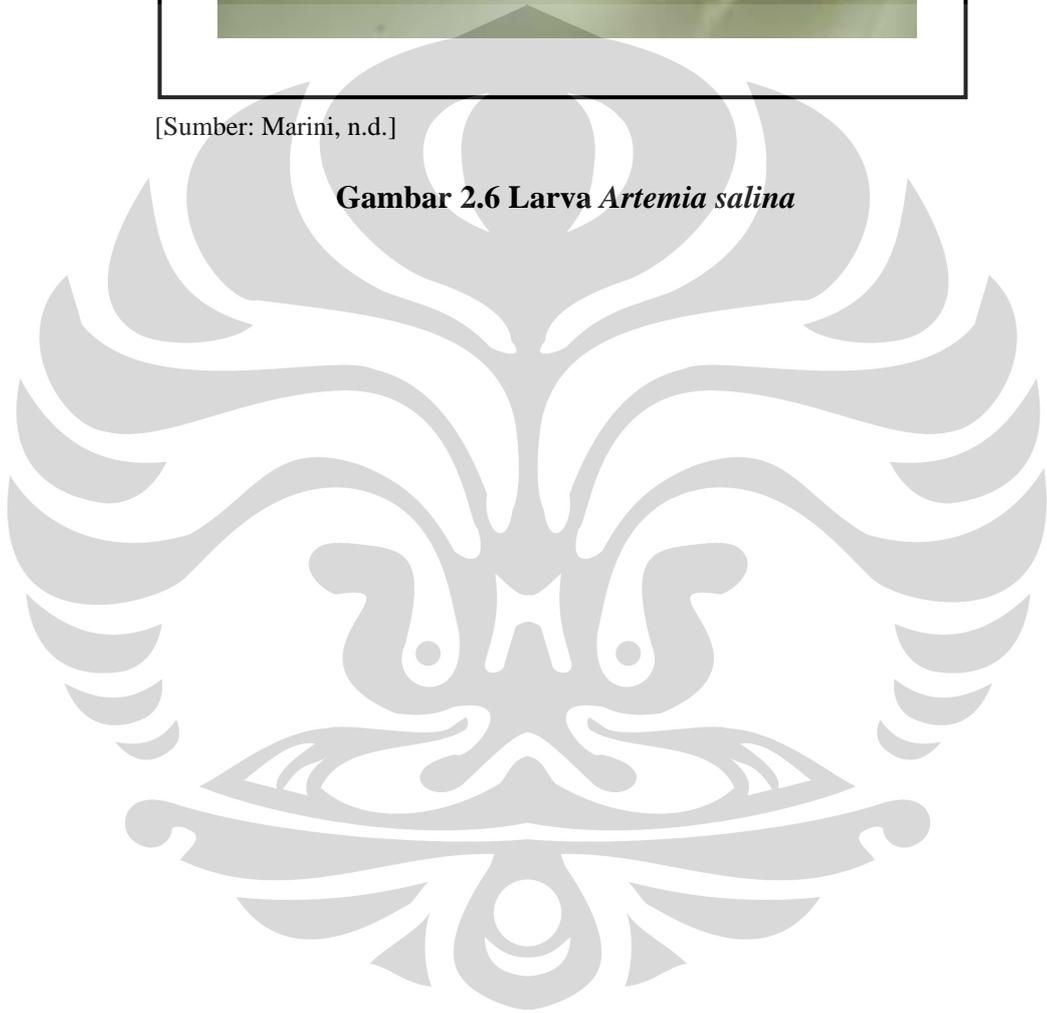
Keterangan : bobot per hewan adalah ± 112 g

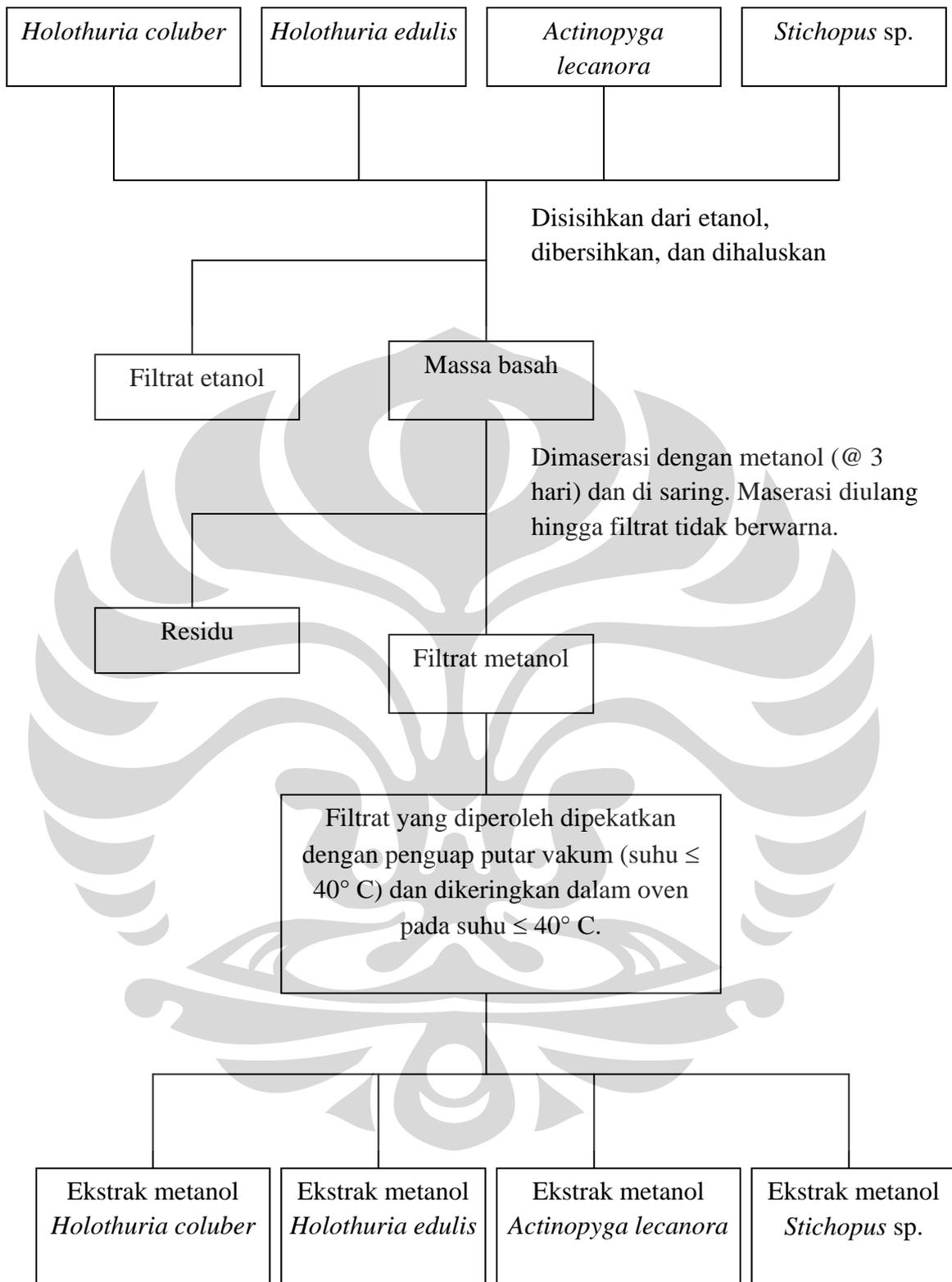
Gambar 2.4 *Stichopus* sp.



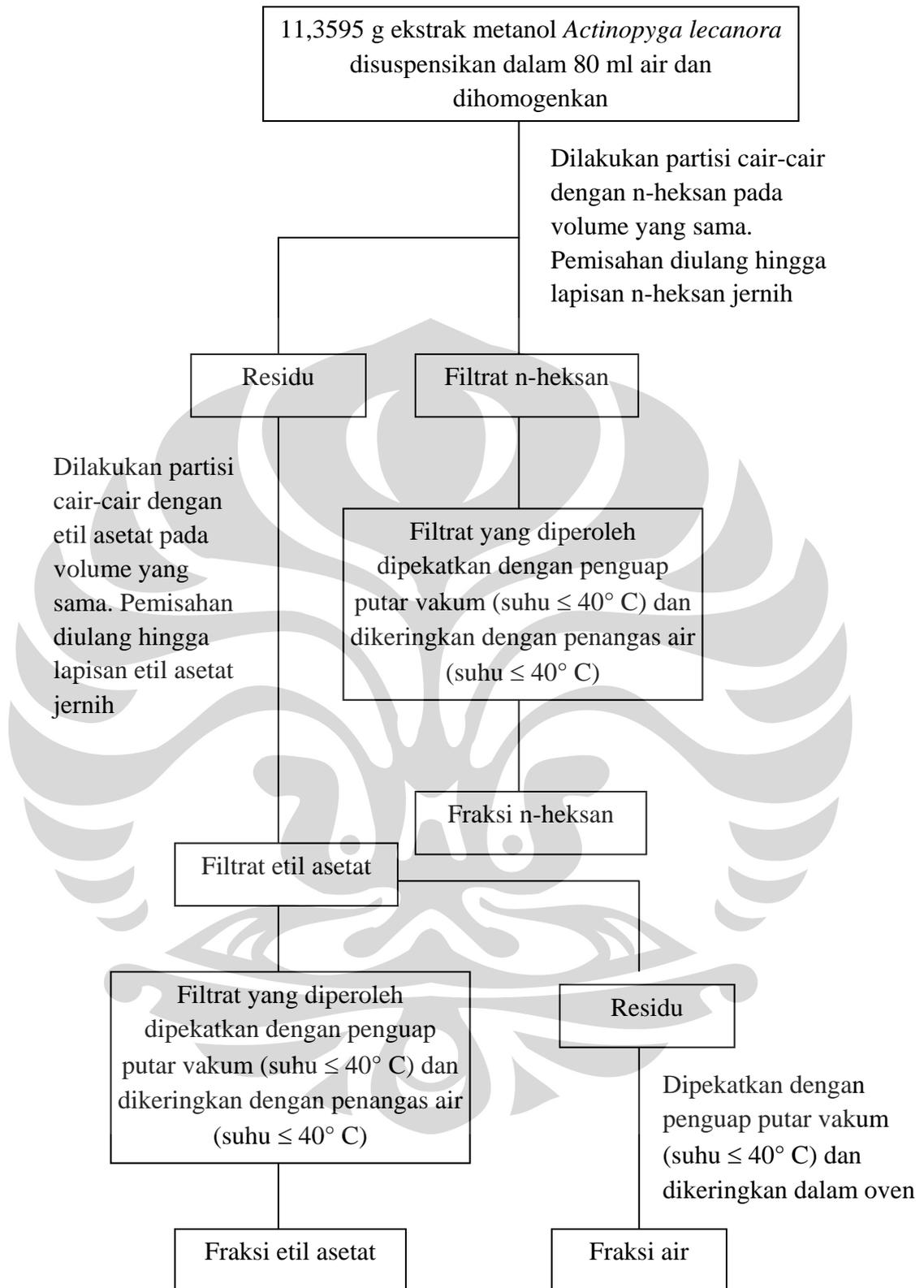
[Sumber: Marini, n.d.]

Gambar 2.6 Larva *Artemia salina*

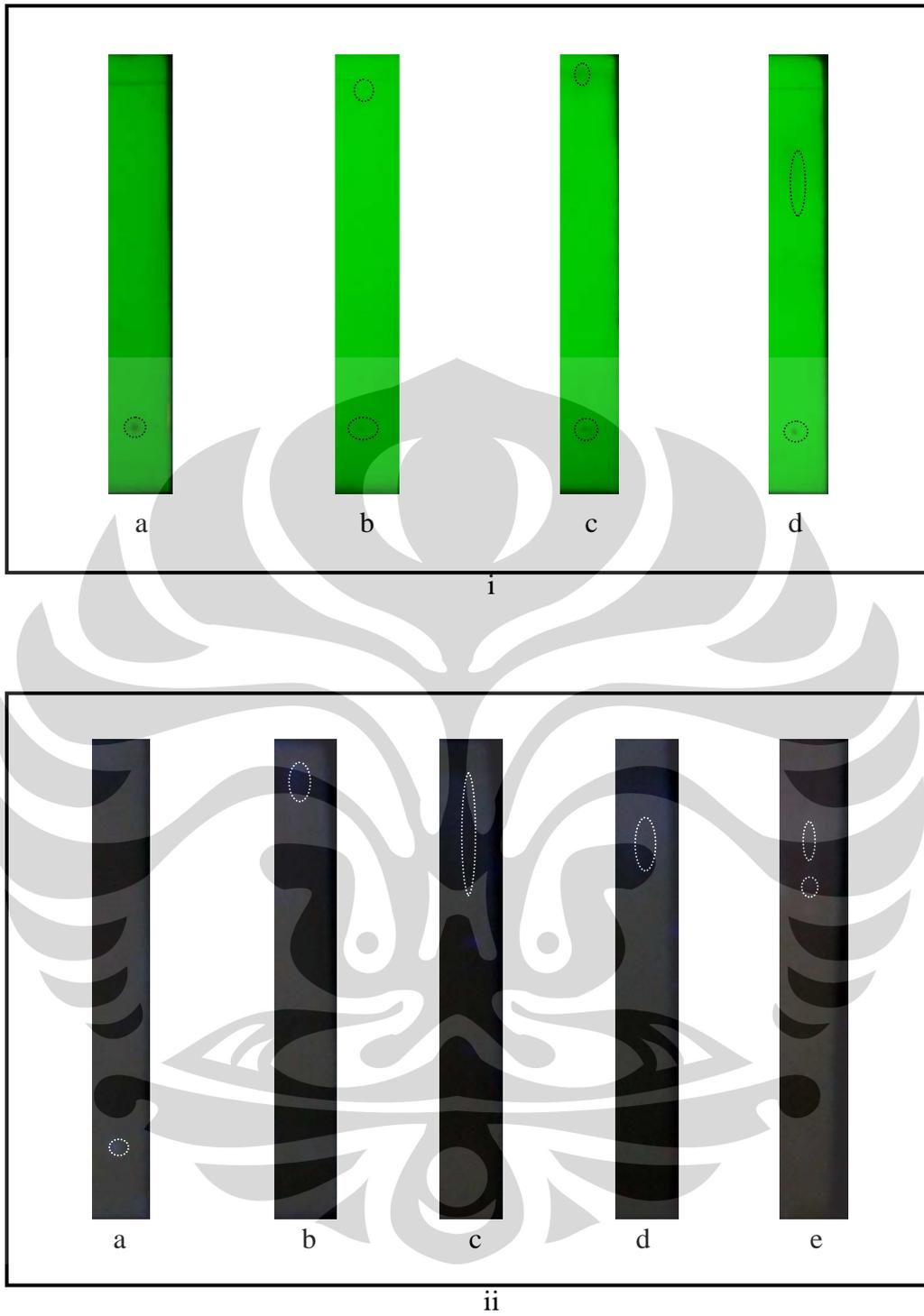




Gambar 3.1 Bagan ekstraksi *Holothuria coluber*, *Holothuria edulis*, *Actinopyga lecanora*, dan *Stichopus sp.*

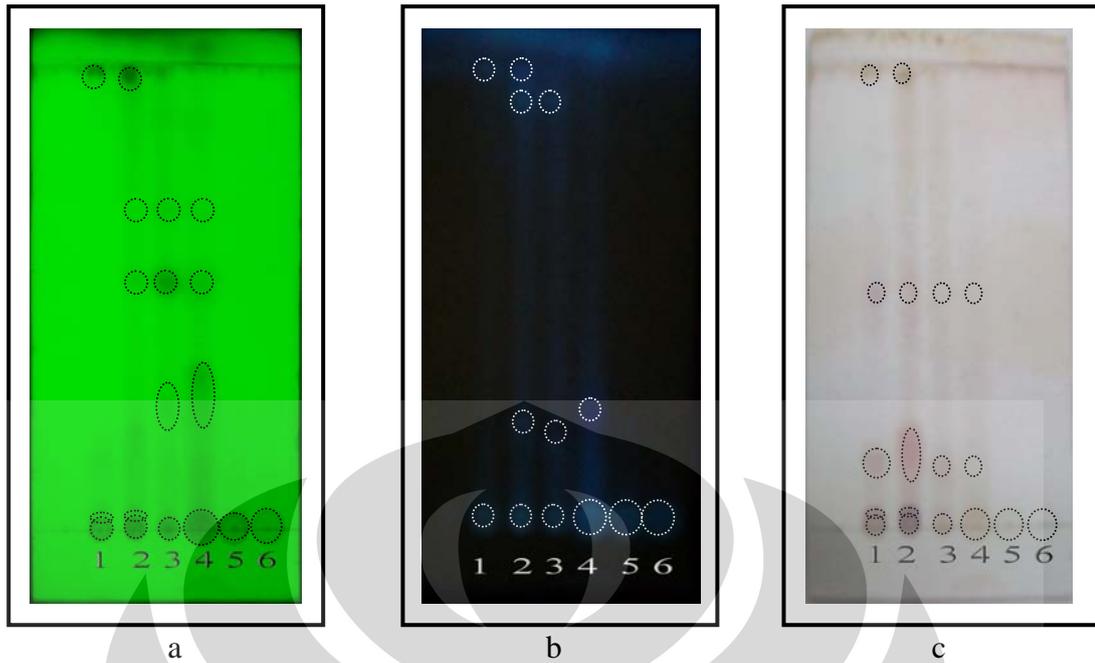


Gambar 3.2 Bagan fraksinasi ekstrak metanol *Actinopyga lecanora*



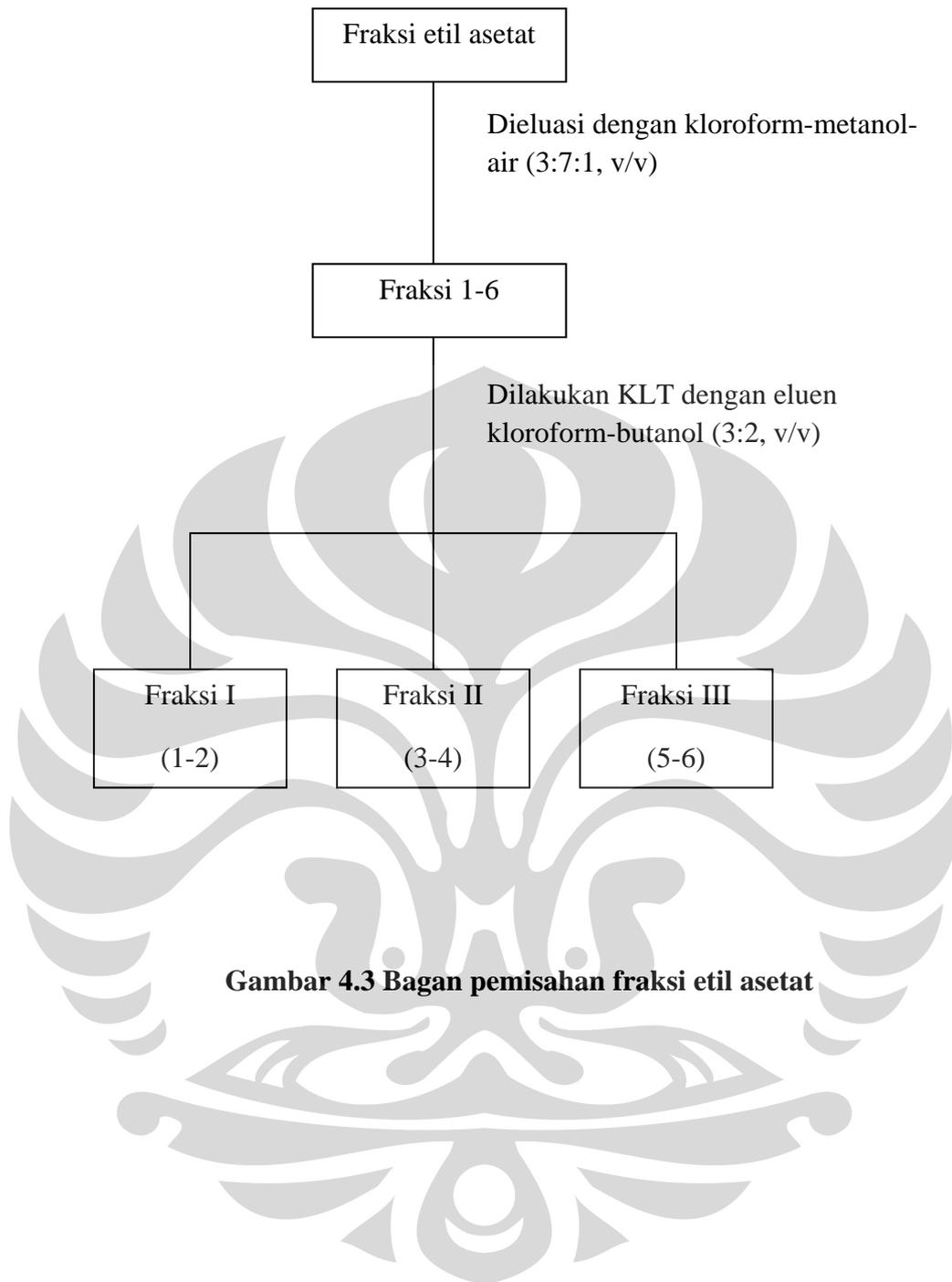
Keterangan : i. panjang gelombang 254 nm; ii. Panjang gelombang 366 nm; a. eluen heksan-etil asetat (9:1, v/v); b. eluen kloroform-metanol (8:2, v/v); c. eluen kloroform-metanol (6,5:3,5, v/v); d. eluen kloroform-metanol (3:7, v/v); e. eluen kloroform-metanol:air (3:7:1, v/v).

Gambar 4.1 Gambar profil KLT fraksi etil asetat dengan berbagai eluen



Keterangan : Pola kromatogram fraksi hasil kromatografi kolom normal dengan eluen kloroform-butanol (3:2, v/v) a. Pada panjang gelombang 254 nm; b. Pada panjang gelombang 366 nm; c. Setelah disemprot dengan penampak bercak asam sulfat 5% dalam etanol P dengan pemanasan 100-110°C.

Gambar 4.2 Gambar profil KLT hasil kromatografi kolom normal



Gambar 4.3 Bagan pemisahan fraksi etil asetat



Tabel 4.1 Rendemen ekstrak metanol timun laut

Spesies	Bobot basah sampel (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen ekstrak (%)
<i>Holothuria coluber</i>	118	1,8364	1,56
<i>Holothuria edulis</i>	134	7,1529	5,34
<i>Actinopyga lecanora</i>	342	12,3592	3,61
<i>Stichopus sp.</i>	169	6,7688	4,01

Tabel 4.2 Hasil uji kematian larva *A. salina* ekstrak metanol *Holothuria coluber*

Konsentrasi (µg/ml)	Konsentrasi uji (µg/ml)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1000,8	100,8	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	1	10
2567,5	256,75	0,5	5	10	0	3	30
				10	0	3	30
				10	0	3	30
5135	513,5	0,5	5	10	0	6	60
				10	0	6	60
				10	0	7	70
7702,5	770,25	0,5	5	10	0	7	70
				10	0	7	70
				10	0	6	60
10008	1000,8	0,5	5	10	0	7	70
				10	0	7	70
				10	0	7	70
					LC ₅₀	585,218	
							µg/ml

Tabel 4.3 Hasil uji kematian larva *A. salina* ekstrak metanol *Holothuria edulis*

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1004	100,4	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
2510	251	0,5	5	10	0	1	10
				10	0	1	10
				10	0	3	30
5020	502	0,5	5	10	0	8	80
				10	0	8	80
				10	0	9	90
7995	799,5	0,5	5	10	0	9	90
				10	0	9	90
				10	0	10	100
10660	1066	0,5	5	10	0	10	100
				10	0	10	100
				10	0	9	90
						LC ₅₀	433,241
							$\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.4 Hasil uji kematian larva *A. salina* ekstrak metanol *Actinopyga lecanora*

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1006	100,6	0,5	5	10	0	1	10
				10	0	2	20
				10	0	2	20
2515	251,5	0,5	5	10	0	8	80
				10	0	7	70
				10	0	7	70
5030	503	0,5	5	10	0	9	90
				10	0	9	90
				10	0	7	70
7545	754,5	0,5	5	10	0	9	90
				10	0	9	90
				10	0	8	80
10060	1006	0,5	5	10	0	9	90
				10	0	9	90
				10	0	10	100
						LC ₅₀	227,094
							$\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.5 Hasil uji kematian larva *A. salina* ekstrak metanol *Stichopus* sp.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1036	103,6	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	1	10
2595,2	259,52	0,5	5	10	0	7	70
				10	0	5	50
				10	0	6	60
5180	518	0,5	5	10	0	7	70
				10	0	8	80
				10	0	7	70
7770	777	0,5	5	10	0	10	100
				10	0	9	90
				10	0	10	100
10360	1036	0,5	5	10	0	9	90
				10	0	10	100
				10	0	10	100
						LC ₅₀	337,471 $\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.6 Hasil fraksinasi cair-cair

Hasil fraksi	Bobot fraksi (g)	Rendemen fraksi (%)	Warna
Heksan	1,9823	17,45	Coklat
Etil asetat	0,00542	0,48	Kuning pucat
Air	8,2649	72,76	Coklat

Tabel 4.7 Hasil uji kematian larva *A. salina* fraksi n-heksan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1186,7	118,67	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
2510	251	0,5	5	10	0	1	10
				10	0	2	20
				10	0	2	20
5020	502	0,5	5	10	0	2	20
				10	0	2	20
				10	0	2	20
7530	753	0,5	5	10	0	4	40
				10	0	4	40
				10	0	4	40
10040	1004	0,5	5	10	0	5	50
				10	0	5	50
				10	0	6	60
					LC₅₀	921,508	
							$\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.8 Hasil uji kematian larva *A. salina* fraksi etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
10,07	1,007	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
100,67	10,067	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
50,335	50,335	5,0	5	10	0	2	20
				10	0	1	10
				10	0	2	20
103,330	103,33	5,0	5	10	0	3	30
				10	0	1	10
				10	0	3	30
1510	151	0,5	5	10	0	3	30
				10	0	5	50
				10	0	5	50
					LC ₅₀	158,276	
						$\mu\text{g/ml}$	

Tabel 4.9 Hasil uji kematian larva *A. salina* fraksi air

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1035	103,5	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
2627,5	262,75	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
5250	525,5	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
7882,5	788,25	0,5	5	10	0	0	0
				10	0	1	10
				10	0	0	0
10510	1051	0,5	5	10	0	1	10
				10	0	0	0
				10	0	1	10
					LC ₅₀	1674,138 $\mu\text{g/ml}$	

Tabel 4.10 Hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom

Fase gerak	Fraksi ke-	Bobot fraksi (mg)	Rendemen (%)	Fraksi hasil penggabungan
Kloroform-metanol-air (3:7:1, v/v)	1	4,4	13,17	I
	2	6,1	18,26	
	3	8,4	25,15	II
	4	12,3	36,83	
	5	1,1	3,29	III
	6	1,1	3,29	

Tabel 4.11 Hasil uji kematian larva *A. salina* fraksi I

Konsentrasi (µg/ml)	Konsentrasi uji (µg/ml)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Jumlah larva	Kematian larva		Persentase kematian (%)
					Kontrol	Sampel	
1000	1	0,005	5	10	0	0	0
				10	0	0	0
				10	0	0	0
1000	10	0,05	5	10	0	1	10
				10	0	0	0
				10	0	0	0
1000	100	0,5	5	10	0	7	70
				10	0	7	70
				10	0	6	60
					LC ₅₀	84,202	µg/ml

Tabel 4.12 Hasil uji kematian larva *A. salina* fraksi II

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Kematian larva		Persentase kematian (%)
				Kontrol	Sampel	
1000	1	0,005	5	0	1	10
				0	0	0
				0	0	0
1000	10	0,05	5	0	1	10
				0	0	0
				0	0	0
1000	100	0,5	5	0	3	30
				0	3	30
				0	1	10
				LC ₅₀	162,475 $\mu\text{g/ml}$	

Tabel 4.13 Hasil uji kematian larva *A. salina* fraksi III

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Volume larutan yang dipipet ke dalam vial (ml)	Volume larutan total dalam vial (ml)	Kematian larva		Persentase kematian (%)
				Kontrol	Sampel	
1000	1	0,005	5	0	0	0
				0	0	0
				0	0	0
1000	10	0,05	5	0	1	10
				0	0	0
				0	0	0
1000	100	0,5	5	0	0	0
				0	1	10
				0	1	10
				LC₅₀	311,732	$\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.14 Identifikasi golongan kimia fraksi I

Kandungan kimia	Pereaksi kimia	Fraksi I
Alkaloid	Mayer	-
	Dragendorf	-
	Bouchardat	-
Tanin	FeCL ₃	-
	Gelatin 10%	-
	NaCl-gelatin	-
Flavonoid	Serbuk Zn + HCl 2N + HCl pekat P	-
	Serbuk Mg + HCl pekat P	-
	Serbuk as. borat + serbuk as. oksalat	+
Steroid/Triterpenoid	Lieberman-Burchard	+
Saponin	Air panas	-
Glikosida	Molisch LP	-
Glikosida Antrakinon	Benzen P + NaOH 2N	-
Glikosida Jantung	Baljet LP	-



Lampiran 1

Hasil determinasi sampel timun laut



UNIVERSITAS INDONESIA
 FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
 DEPARTEMEN BIOLOGI
 Gedung E, Kampus UI Depok, Depok 16424
 Telp. (021) 727 0163, Fax. (021) 78849010
 E-mail : biomipa1@makara.cso.ui.ac.id

Kepada Yth. Sdr. Wahyu Astuti

Departemen Farmasi

Fakultas MIPA UI, Depok

Berikut ini kami terangkan bahwa sampel teripang yang Saudara teliti dalam penelitian Skripsi Saudara adalah:

1. *Holothuria coluber* (Gambar 1)
2. *Holothuria edulis* (Gambar 2)
3. *Actinopyga lecanora* (Gambar 3)
4. *Stichopus* sp. (Gambar 4)

Gambar yang dimaksud merujuk kepada gambar sebagaimana yang terlampir bersama surat ini.

Demikian surat keterangan ini kami buat dengan sebenar-benarnya untuk dapat dimanfaatkan sebagaimana mestinya.

Lab. Taksonomi Hewan

Dept. Biologi FMIPA UI

Kepala,

Dr. rer. nat. Yasman, M.Sc.

NIP 197309121998021001

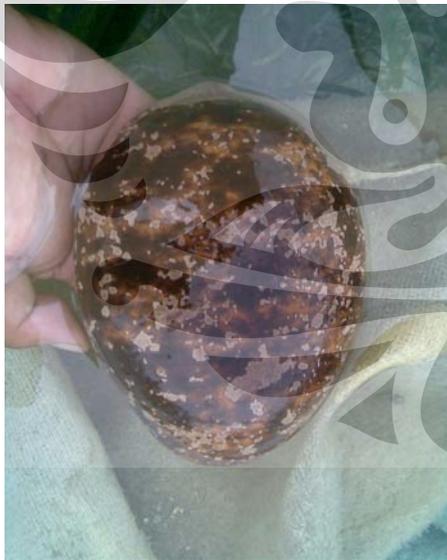
(lanjutan)



Gambar 1



Gambar 2



Gambar 3



Gambar 4

Lampiran 2
Hasil probit analisis ekstrak metanol *Holothuria coluber*

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentra tion	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO BIT	1	100.800	10	0	1.657	-1.657	.166
	2	100.800	10	0	1.657	-1.657	.166
	3	100.800	10	1	1.657	-.657	.166
	4	256.750	10	3	2.551	.449	.255
	5	256.750	10	3	2.551	.449	.255
	6	256.750	10	3	2.551	.449	.255
	7	513.500	10	6	4.428	1.572	.443
	8	513.500	10	6	4.428	1.572	.443
	9	513.500	10	7	4.428	2.572	.443
	10	770.250	10	7	6.447	.553	.645
	11	770.250	10	7	6.447	.553	.645
	12	770.250	10	6	6.447	-.447	.645
	13	1008.000	10	7	8.017	-1.017	.802
	14	1008.000	10	7	8.017	-1.017	.802
	15	1008.000	10	7	8.017	-1.017	.802

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-575.159	-1185.278	-270.633
	.020	-439.188	-979.547	-167.614
	.030	-352.918	-849.301	-101.968
	.040	-288.020	-751.510	-52.397
	.050	-235.231	-672.112	-11.927
	.060	-190.300	-604.656	22.643
	.070	-150.903	-545.620	53.064
	.080	-115.629	-492.861	80.402
	.090	-83.548	-444.971	105.359
	.100	-54.017	-400.978	128.420
	.150	68.247	-220.009	225.075
	.200	165.419	-78.131	303.845
	.250	248.784	41.389	373.621
	.300	323.648	146.083	438.921
	.350	393.021	239.842	502.686
	.400	458.849	324.818	567.185
	.450	522.538	402.333	634.288
	.500	585.218	473.488	705.460
	.550	647.898	539.549	781.725
	.600	711.587	602.073	863.820
	.650	777.415	662.817	952.551
	.700	846.788	723.676	1049.216
	.750	921.652	786.789	1156.096
	.800	1005.017	854.927	1277.254
	.850	1102.189	932.454	1420.375
	.900	1224.453	1028.137	1602.317
	.910	1253.984	1051.027	1646.481
	.920	1286.065	1075.818	1694.537
	.930	1321.340	1102.995	1747.458
	.940	1360.736	1133.257	1806.652
	.950	1405.668	1167.671	1874.264
	.960	1458.457	1207.984	1953.819
	.970	1523.354	1257.394	2051.770
	.980	1609.624	1322.867	2182.189
	.990	1745.595	1425.685	2388.122

Lampiran 3
Hasil probit analisis ekstrak metanol *Holothuria edulis*

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	100.400	10	0	.640	-.640	.064
BIT	2	100.400	10	0	.640	-.640	.064
	3	100.400	10	0	.640	-.640	.064
	4	251.000	10	1	2.023	-1.023	.202
	5	251.000	10	1	2.023	-1.023	.202
	6	251.000	10	3	2.023	.977	.202
	7	502.000	10	8	6.234	1.766	.623
	8	502.000	10	8	6.234	1.766	.623
	9	502.000	10	9	6.234	2.766	.623
	10	799.500	10	9	9.530	-.530	.953
	11	799.500	10	9	9.530	-.530	.953
	12	799.500	10	10	9.530	.470	.953
	13	1066.000	10	10	9.981	.019	.998
	14	1066.000	10	10	9.981	.019	.998
	15	1066.000	10	9	9.981	-.981	.998

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT(a)	.010	-75.492	-929.425	152.574
	.020	-15.879	-777.405	193.764
	.030	21.943	-681.532	220.476
	.040	50.395	-609.787	240.947
	.050	73.539	-551.714	257.884
	.060	93.238	-502.519	272.535
	.070	110.510	-459.588	285.584
	.080	125.976	-421.330	297.449
	.090	140.041	-386.701	308.406
	.100	152.987	-354.980	318.646
	.150	206.591	-225.576	362.974
	.200	249.193	-125.670	401.144
	.250	285.742	-42.875	436.806
	.300	318.564	28.427	471.882
	.350	348.978	91.236	507.649
	.400	377.839	147.330	545.093
	.450	405.761	197.875	585.048
	.500	433.241	243.740	628.247
	.550	460.722	285.677	675.374
	.600	488.644	324.424	727.126
	.650	517.505	360.759	784.330
	.700	547.919	395.539	848.126
	.750	580.741	429.756	920.286
	.800	617.290	464.683	1003.816
	.850	659.892	502.222	1104.354
	.900	713.496	545.999	1234.308
	.910	726.442	556.136	1266.133
	.920	740.507	566.991	1300.863
	.930	755.973	578.756	1339.222
	.940	773.245	591.704	1382.254
	.950	792.944	606.254	1431.550
	.960	816.088	623.087	1489.727
	.970	844.540	643.449	1561.581
	.980	882.362	670.042	1657.572
	.990	941.975	711.089	1809.734

a A heterogeneity factor is used

Lampiran 4

Hasil probit analisis ekstrak metanol *Actinopyga lecanora*

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	100.600	10	1	3.814	-2.814	.381
BIT	2	100.600	10	2	3.814	-1.814	.381
	3	100.600	10	2	3.814	-1.814	.381
	4	251.500	10	8	5.232	2.768	.523
	5	251.500	10	7	5.232	1.768	.523
	6	251.500	10	7	5.232	1.768	.523
	7	503.000	10	9	7.448	1.552	.745
	8	503.000	10	9	7.448	1.552	.745
	9	503.000	10	7	7.448	-.448	.745
	10	754.500	10	9	8.959	.041	.896
	11	754.500	10	9	8.959	.041	.896
	12	754.500	10	8	8.959	-.959	.896
	13	1006.000	10	9	9.684	-.684	.968
	14	1006.000	10	9	9.684	-.684	.968
	15	1006.000	10	10	9.684	.316	.968

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT(a)	.010	-747.920	-1745.458	-367.268
	.020	-633.669	-1536.271	-287.221
	.030	-561.180	-1403.746	-236.237
	.040	-506.650	-1304.178	-197.758
	.050	-462.293	-1223.282	-166.364
	.060	-424.539	-1154.503	-139.567
	.070	-391.436	-1094.262	-116.005
	.080	-361.797	-1040.382	-94.850
	.090	-334.840	-991.433	-75.558
	.100	-310.027	-946.424	-57.751
	.150	-207.294	-760.683	16.583
	.200	-125.645	-613.987	76.587
	.250	-55.597	-489.076	129.005
	.300	7.308	-377.937	177.115
	.350	65.599	-276.163	222.908
	.400	120.911	-181.076	267.847
	.450	174.427	-90.974	313.222
	.500	227.094	-4.795	360.372
	.550	279.761	78.032	410.874
	.600	333.276	157.673	466.711
	.650	388.588	234.040	530.371
	.700	446.879	307.146	604.831
	.750	509.784	377.701	693.524
	.800	579.832	447.736	800.819
	.850	661.481	521.238	934.016
	.900	764.214	605.971	1109.359
	.910	789.028	625.582	1152.564
	.920	815.984	646.609	1199.778
	.930	845.624	669.439	1251.982
	.940	878.727	694.631	1310.593
	.950	916.481	723.028	1377.772
	.960	960.837	756.014	1457.077
	.970	1015.367	796.113	1555.025
	.980	1087.856	848.810	1685.836
	.990	1202.107	930.845	1893.035

a A heterogeneity factor is used

Lampiran 5
Hasil probit analisis ekstrak metanol *Stichopus* sp.

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	103.600	10	0	1.965	-1.965	.197
BIT	2	103.600	10	0	1.965	-1.965	.197
	3	103.600	10	1	1.965	-.965	.197
	4	259.520	10	7	3.879	3.121	.388
	5	259.520	10	5	3.879	1.121	.388
	6	259.520	10	6	3.879	2.121	.388
	7	518.000	10	7	7.452	-.452	.745
	8	518.000	10	8	7.452	.548	.745
	9	518.000	10	7	7.452	-.452	.745
	10	777.000	10	10	9.458	.542	.946
	11	777.000	10	9	9.458	-.458	.946
	12	777.000	10	10	9.458	.542	.946
	13	1036.000	10	9	9.946	-.946	.995
	14	1036.000	10	10	9.946	.054	.995
	15	1036.000	10	10	9.946	.054	.995

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT(a)	.010	-299.489	-971.049	-53.619
	.020	-224.851	-828.148	-.963
	.030	-177.495	-737.787	32.750
	.040	-141.871	-670.009	58.308
	.050	-112.894	-615.024	79.246
	.060	-88.230	-568.345	97.189
	.070	-66.604	-527.522	113.025
	.080	-47.241	-491.062	127.298
	.090	-29.631	-457.987	140.363
	.100	-13.421	-427.621	152.468
	.150	53.693	-302.882	203.571
	.200	107.033	-205.246	245.689
	.250	152.794	-123.000	283.339
	.300	193.889	-50.776	318.787
	.350	231.969	14.309	353.475
	.400	268.104	73.949	388.509
	.450	303.065	129.192	424.865
	.500	337.471	180.718	463.486
	.550	371.877	229.028	505.323
	.600	406.838	274.590	551.360
	.650	442.973	317.968	602.656
	.700	481.053	359.930	660.468
	.750	522.148	401.539	726.530
	.800	567.909	444.324	803.642
	.850	621.249	490.711	897.008
	.900	688.363	545.419	1018.143
	.910	704.573	558.188	1047.845
	.920	722.183	571.903	1080.270
	.930	741.546	586.816	1116.089
	.940	763.172	603.287	1156.279
	.950	787.836	621.865	1202.322
	.960	816.813	643.448	1256.661
	.970	852.437	669.676	1323.769
	.980	899.793	704.116	1413.403
	.990	974.431	757.637	1555.439

a A heterogeneity factor is used

Lampiran 6
Hasil probit analisis fraksi n-heksan

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	118.670	10	0	.589	-.589	.059
BIT	2	118.670	10	0	.589	-.589	.059
	3	118.670	10	0	.589	-.589	.059
	4	251.000	10	1	.957	.043	.096
	5	251.000	10	2	.957	1.043	.096
	6	251.000	10	2	.957	1.043	.096
	7	502.000	10	2	2.069	-.069	.207
	8	502.000	10	2	2.069	-.069	.207
	9	502.000	10	2	2.069	-.069	.207
	10	753.000	10	4	3.714	.286	.371
	11	753.000	10	4	3.714	.286	.371
	12	753.000	10	4	3.714	.286	.371
	13	1004.000	10	5	5.638	-.638	.564
	14	1004.000	10	5	5.638	-.638	.564
	15	1004.000	10	6	5.638	.362	.564

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-272.682	-885.598	3.414
	.020	-132.748	-657.144	107.041
	.030	-43.965	-512.861	173.453
	.040	22.824	-404.804	223.893
	.050	77.151	-317.306	265.321
	.060	123.392	-243.188	300.939
	.070	163.936	-178.532	332.500
	.080	200.239	-120.957	361.076
	.090	233.255	-68.906	387.376
	.100	263.646	-21.301	411.893
	.150	389.473	171.365	517.830
	.200	489.476	316.379	610.138
	.250	575.271	431.399	698.718
	.300	652.316	524.904	788.053
	.350	723.711	602.826	879.559
	.400	791.457	670.013	973.142
	.450	857.002	730.212	1068.491
	.500	921.508	786.123	1165.660
	.550	986.014	839.692	1265.173
	.600	1051.560	892.424	1367.989
	.650	1119.306	945.637	1475.546
	.700	1190.700	1000.695	1589.916
	.750	1267.746	1059.257	1714.194
	.800	1353.540	1123.712	1853.339
	.850	1453.543	1198.116	2016.256
	.900	1579.371	1290.955	2222.021
	.910	1609.762	1313.279	2271.819
	.920	1642.777	1337.495	2325.954
	.930	1679.080	1364.083	2385.517
	.940	1719.624	1393.732	2452.085
	.950	1765.865	1427.496	2528.057
	.960	1820.193	1467.102	2617.376
	.970	1886.981	1515.713	2727.263
	.980	1975.765	1580.215	2873.456
	.990	2115.699	1681.660	3104.093

Lampiran 7
Hasil probit analisis fraksi etil asetat

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	1.007	10	0	.209	-.209	.021
BIT	2	1.007	10	0	.209	-.209	.021
	3	1.007	10	0	.209	-.209	.021
	4	10.067	10	0	.276	-.276	.028
	5	10.067	10	0	.276	-.276	.028
	6	10.067	10	0	.276	-.276	.028
	7	50.335	10	2	.813	1.187	.081
	8	50.335	10	1	.813	.187	.081
	9	50.335	10	2	.813	1.187	.081
	10	103.330	10	3	2.386	.614	.239
	11	103.330	10	1	2.386	-1.386	.239
	12	103.330	10	3	2.386	.614	.239
	13	151.000	10	3	4.625	-1.625	.462
	14	151.000	10	5	4.625	.375	.462
	15	151.000	10	5	4.625	.375	.462

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-21.512	-107.252	17.098
	.020	-.445	-72.546	32.925
	.030	12.922	-50.714	43.154
	.040	22.977	-34.431	50.989
	.050	31.156	-21.304	57.481
	.060	38.118	-10.239	63.114
	.070	44.222	-.637	68.153
	.080	49.688	7.863	72.763
	.090	54.658	15.498	77.050
	.100	59.234	22.433	81.089
	.150	78.177	49.856	99.105
	.200	93.233	69.579	115.495
	.250	106.149	84.674	131.381
	.300	117.749	96.843	147.034
	.350	128.498	107.163	162.496
	.400	138.697	116.318	177.805
	.450	148.565	124.743	193.050
	.500	158.276	132.733	208.354
	.550	167.988	140.502	223.879
	.600	177.856	148.228	239.822
	.650	188.055	156.079	256.435
	.700	198.804	164.242	274.054
	.750	210.403	172.952	293.166
	.800	223.320	182.560	314.540
	.850	238.376	193.668	339.544
	.900	257.319	207.542	371.109
	.910	261.895	210.880	378.746
	.920	266.865	214.501	387.047
	.930	272.331	218.476	396.181
	.940	278.435	222.910	406.389
	.950	285.397	227.960	418.037
	.960	293.576	233.883	431.732
	.970	303.631	241.154	448.580
	.980	316.998	250.801	470.994
	.990	338.065	265.973	506.354

Lampiran 8
Hasil probit analisis fraksi air

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	103.500	10	0	.001	-.001	.000
BIT	2	103.500	10	0	.001	-.001	.000
	3	103.500	10	0	.001	-.001	.000
	4	262.750	10	0	.006	-.006	.001
	5	262.750	10	0	.006	-.006	.001
	6	262.750	10	0	.006	-.006	.001
	7	525.500	10	0	.040	-.040	.004
	8	525.500	10	0	.040	-.040	.004
	9	525.500	10	0	.040	-.040	.004
	10	788.250	10	0	.204	-.204	.020
	11	788.250	10	1	.204	.796	.020
	12	788.250	10	0	.204	-.204	.020
	13	1051.000	10	1	.752	.248	.075
	14	1051.000	10	0	.752	-.752	.075
	15	1051.000	10	1	.752	.248	.075

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	666.321	.	.
	.020	784.416	.	.
	.030	859.343	.	.
	.040	915.708	.	.
	.050	961.557	.	.
	.060	1000.581	.	.
	.070	1034.798	.	.
	.080	1065.435	.	.
	.090	1093.298	.	.
	.100	1118.946	.	.
	.150	1225.136	.	.
	.200	1309.532	.	.
	.250	1381.936	.	.
	.300	1446.958	.	.
	.350	1507.210	.	.
	.400	1564.383	.	.
	.450	1619.699	.	.
	.500	1674.138	.	.
	.550	1728.577	.	.
	.600	1783.892	.	.
	.650	1841.066	.	.
	.700	1901.318	.	.
	.750	1966.339	.	.
	.800	2038.744	.	.
	.850	2123.140	.	.
	.900	2229.330	.	.
	.910	2254.978	.	.
	.920	2282.841	.	.
	.930	2313.478	.	.
	.940	2347.694	.	.
	.950	2386.719	.	.
	.960	2432.567	.	.
	.970	2488.932	.	.
	.980	2563.860	.	.
	.990	2681.955	.	.

Lampiran 9
Hasil probit analisis fraksi I

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	1.000	10	0	.109	-.109	.011
BIT	2	1.000	10	0	.109	-.109	.011
	3	1.000	10	0	.109	-.109	.011
	4	10.000	10	1	.204	.796	.020
	5	10.000	10	0	.204	-.204	.020
	6	10.000	10	0	.204	-.204	.020
	7	100.000	10	7	6.684	.316	.668
	8	100.000	10	7	6.684	.316	.668
	9	100.000	10	6	6.684	-.684	.668

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-.167	-47.173	23.832
	.020	9.720	-32.175	31.567
	.030	15.992	-22.723	36.538
	.040	20.711	-15.654	40.319
	.050	24.549	-9.935	43.425
	.060	27.816	-5.092	46.095
	.070	30.680	-.869	48.458
	.080	33.245	2.894	50.593
	.090	35.577	6.298	52.552
	.100	37.725	9.415	54.372
	.150	46.614	22.122	62.106
	.200	53.679	31.929	68.544
	.250	59.741	40.073	74.337
	.300	65.184	47.127	79.800
	.350	70.228	53.410	85.115
	.400	75.014	59.125	90.405
	.450	79.645	64.416	95.762
	.500	84.202	69.395	101.262
	.550	88.759	74.159	106.977
	.600	93.390	78.798	112.986
	.650	98.176	83.403	119.386
	.700	103.220	88.078	126.309
	.750	108.663	92.952	133.952
	.800	114.725	98.210	142.631
	.850	121.790	104.163	152.924
	.900	130.679	111.449	166.078
	.910	132.827	113.183	169.282
	.920	135.159	115.056	172.772
	.930	137.724	117.104	176.621
	.940	140.588	119.380	180.932
	.950	143.855	121.961	185.863
	.960	147.693	124.976	191.674
	.970	152.412	128.659	198.840
	.980	158.684	133.523	208.399
	.990	168.571	141.126	223.528

Lampiran 10
Hasil probit analisis fraksi II

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	1.000	10	1	.297	.703	.030
BIT	2	1.000	10	0	.297	-.297	.030
	3	1.000	10	0	.297	-.297	.030
	4	10.000	10	1	.375	.625	.037
	5	10.000	10	0	.375	-.375	.037
	6	10.000	10	0	.375	-.375	.037
	7	100.000	10	3	2.328	.672	.233
	8	100.000	10	3	2.328	.672	.233
	9	100.000	10	1	2.328	-1.328	.233

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-36.742	-291.599	12.112
	.020	-13.398	-212.304	27.858
	.030	1.413	-162.715	38.569
	.040	12.555	-126.056	47.272
	.050	21.618	-96.884	54.999
	.060	29.332	-72.737	62.258
	.070	36.096	-52.302	69.360
	.080	42.152	-34.803	76.517
	.090	47.659	-19.743	83.881
	.100	52.729	-6.772	91.551
	.150	73.720	35.500	134.739
	.200	90.403	57.248	180.912
	.250	104.715	71.234	225.196
	.300	117.568	81.910	266.849
	.350	129.478	90.900	306.348
	.400	140.780	98.930	344.330
	.450	151.714	106.388	381.390
	.500	162.475	113.515	418.074
	.550	173.236	120.489	454.912
	.600	184.170	127.456	492.463
	.650	195.472	134.560	531.370
	.700	207.382	141.965	572.456
	.750	220.235	149.881	616.868
	.800	234.547	158.625	666.394
	.850	251.230	168.745	724.195
	.900	272.221	181.392	797.007
	.910	277.291	184.436	814.605
	.920	282.799	187.738	833.727
	.930	288.855	191.364	854.757
	.940	295.618	195.408	878.251
	.950	303.332	200.013	905.051
	.960	312.395	205.416	936.546
	.970	323.537	212.048	975.276
	.980	338.348	220.848	1026.777
	.990	361.692	234.686	1107.980

Lampiran 11
Hasil probit analisis fraksi III

Probit Analysis

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PRO	1	1.000	10	0	.145	-.145	.015
BIT	2	1.000	10	0	.145	-.145	.015
	3	1.000	10	0	.145	-.145	.015
	4	10.000	10	1	.170	.830	.017
	5	10.000	10	0	.170	-.170	.017
	6	10.000	10	0	.170	-.170	.017
	7	100.000	10	0	.685	-.685	.068
	8	100.000	10	1	.685	.315	.068
	9	100.000	10	1	.685	.315	.068

(lanjutan)

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-19.456	.	.
	.020	19.352	.	.
	.030	43.975	.	.
	.040	62.497	.	.
	.050	77.564	.	.
	.060	90.388	.	.
	.070	101.632	.	.
	.080	111.700	.	.
	.090	120.857	.	.
	.100	129.285	.	.
	.150	164.181	.	.
	.200	191.915	.	.
	.250	215.709	.	.
	.300	237.076	.	.
	.350	256.876	.	.
	.400	275.665	.	.
	.450	293.842	.	.
	.500	311.732	.	.
	.550	329.622	.	.
	.600	347.800	.	.
	.650	366.588	.	.
	.700	386.388	.	.
	.750	407.755	.	.
	.800	431.549	.	.
	.850	459.283	.	.
	.900	494.179	.	.
	.910	502.608	.	.
	.920	511.764	.	.
	.930	521.832	.	.
	.940	533.076	.	.
	.950	545.900	.	.
	.960	560.967	.	.
	.970	579.490	.	.
	.980	604.112	.	.
	.990	642.921	.	.