



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI POTENSI ANTIKANKER EKSTRAK KASAR  
*Holothuria atra* JAEGER MENGGUNAKAN UJI  
MIKRONUKLEUS DARI SUMSUM TULANG MENCIT  
*Mus musculus* L. JANTAN GALUR DDY**

**SKRIPSI**

**JANUAR HAKAM  
0706263952**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JANUARI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI POTENSI ANTIKANKER EKSTRAK KASAR  
*Holothuria atra* JAEGER MENGGUNAKAN UJI  
MIKRONUKLEUS DARI SUMSUM TULANG MENCIT  
*Mus musculus* L. JANTAN GALUR DDY**

**SKRIPSI**

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

**JANUAR HAKAM  
0706263952**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JANUARI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Januar Hakam**

**NPM : 0706263952**

**Tanda Tangan** 

**Tanggal : 04 Januari 2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Januar Hakam  
NPM : 0706263952  
Program Studi : Biologi  
Judul Skripsi : Uji Potensi Antikanker Ekstrak Kasar *Holothuria atra*  
Menggunakan Uji Mikronukleus dari Sumsum Tulang  
*Mus musculus* Jantan Galur DDY

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Setiorini, M. Kes.

(.....)

Pembimbing II : Dr.rer.nat. Yasman, M.Sc.

(.....)

Penguji I : Dr. Dadang Kusmana, M.S.

(.....)

Penguji II : Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc.

(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 04 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur Penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya, serta junjungan Nabi besar Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan sebagai satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI). Penulis banyak mendapat bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak dalam penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan kerendahan hati disertai rasa tulus ikhlas, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dra. Setiorini, M.Kes. dan Dr.rer.nat. Yasman, M.Sc. selaku Pembimbing I dan II yang telah sabar memberikan bimbingan, pengalaman, nasihat, ilmu, waktu, serta saran dan kritik yang sangat bermanfaat kepada Penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Dr. Dadang Kusmana, M.S. dan Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Penguji I dan II yang telah memberikan saran dan perbaikan yang sangat membangun demi kemajuan Penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Dr. Nisyawati selaku Penasehat Akademis atas dukungan dan bimbingan yang diberikan. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dra. Nining Betawati Prihartini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi, dan Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan yang telah membantu dan memfasilitasi terselesaikannya skripsi ini.
4. Dana Hibah Riset Awal Universitas Indonesia (RA-UI) yang telah mendanai penelitian Penulis.
5. Seluruh sivitas akademis dan nonakademis Departemen Biologi FMIPA UI, khususnya kepada Mbak Asri Martini, Ibu Ida dan Ibu Rusmalina, yang banyak memberikan bantuan dan dukungan kepada Penulis.
6. Kedua orang tua, kakak, dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa restu, kasih sayang, dan dukungan material maupun moral yang tak akan terbalas dengan apapun kepada Penulis hingga selesainya skripsi ini.
7. Rekan kerja Penulis Nabila Chairunnisa yang selalu sabar membantu dan memotivasi serta memberi saran yang sangat bermanfaat kepada Penulis

hingga terselesaikannya skripsi ini. Raden Indah Kendarsari yang selalu sabar memberikan bantuan, motivasi, saran dan kritik yang membangun, serta keceriaan pada Penulis. Teman-teman terbaik Penulis Nova, Jill, RR, Lulu, Wina, Eja, Bayu, Diana, Niar, Kimbod, Karno, beserta kawan-kawan BLOSSOM lainnya yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungan dan kebersamaan yang sangat berkesan kepada Penulis.

8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah banyak membantu Penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, Penulis menerima segala kritik dan saran demi tercapainya hasil yang lebih baik. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh pihak dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 04 Januari 2012

Penulis

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

---

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

Nama : Januar Hakam  
NPM : 0706263952  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Departemen : Biologi  
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 Potensi Antikanker Ekstrak Kasar *Holothuria atra* Menggunakan Uji Mikronukleus dari Sumsum Tulang *Mus musculus* Jantan Galur DDY

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok  
Pada tanggal: 04 Januari 2012  
Yang menyatakan



(Januar Hakam)

## ABSTRAK

Nama : Januar Hakam  
Program Studi : Biologi  
Judul : Uji Potensi Antikanker Ekstrak Kasar *Holothuria atra* Jaeger  
Menggunakan Uji Mikronukleus dari Sumsum Tulang Mencit  
*Mus musculus* L. Jantan Galur DDY

Penelitian tentang potensi aktivitas antikanker ekstrak kasar *Holothuria atra* di Indonesia belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, telah dilakukan penelitian untuk menguji potensi antikanker ekstrak kasar *H. atra* menggunakan uji mikronukleus dari sumsum tulang *Mus musculus* jantan galur DDY yang sebelumnya telah diinduksi 0,66 mg/kg bb kolkisin secara intraperitoneal. Hasil pengujian aktivitas antikanker secara *in vivo* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan dosis 0,33; 0,66; 0,99; dan 1,32 g/kg bb selama 7 hari secara oral mampu menurunkan frekuensi sel eritrosit polikromatik (PCE) bermikronukleus secara nyata ( $p < 0,05$ ) yang diamati melalui preparat apusan sumsum tulang paha mencit. Dosis 0,33; 0,66; 0,99; dan 1,32 g/kg bb secara berurutan mampu menurunkan frekuensi sel PCE bermikronukleus sebanyak 51,24%; 59,70%; 63,68%; dan 68,66%. Namun, dosis ekstrak kasar *H. atra* yang optimum belum ditemukan. Berdasarkan hasil pengujian tersebut diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak kasar *H. atra* mempunyai potensi aktivitas antikanker.

Kata kunci : Ekstrak kasar *Holothuria atra*, antikanker, uji mikronukleus.

xii + 54 halaman; 15 gambar; 14 lampiran; 1 tabel  
Daftar referensi: 40 (1973--2010)

## ABSTRACT

Name : Januar Hakam  
Study Program : Biology  
Title : Anticancer Potential Test of Crude Extract from *Holothuria atra* Jaeger Use Micronucleus Test Toward Male Mice *Mus musculus* L. DDY Bone Marrow

Research on potential anticancer activity of *Holothuria atra* crude extracts in Indonesia has never been done. Therefore, we conducted a study to test the anticancer potential of *H. atra* crude extract using the micronucleus test of male *Mus musculus* strain DDY bone marrow who had previously been induced by 0.66 mg/kg bw colchicines intraperitoneally. Our data showed that treatment of *H. atra* crude extract at dose 0,33; 0,66; 0,99, and 1,32 g/kg bw for 7 days orally can reduce the frequency of micronucleus in polychromatic erythrocytes cells (PCE) from bone marrow smears. Dose of 0,33; 0,66; 0,99, and 1,32 g/kg bw in sequence can reduce the frequency of micronucleus in PCE as much as 51,24%; 59,70%; 63,68%; dan 68,66%. However, the optimum doses of *H. atra* crude extract has not been found. Based on these results we conclude that *H. atra* crude extract has potential anticancer activity.

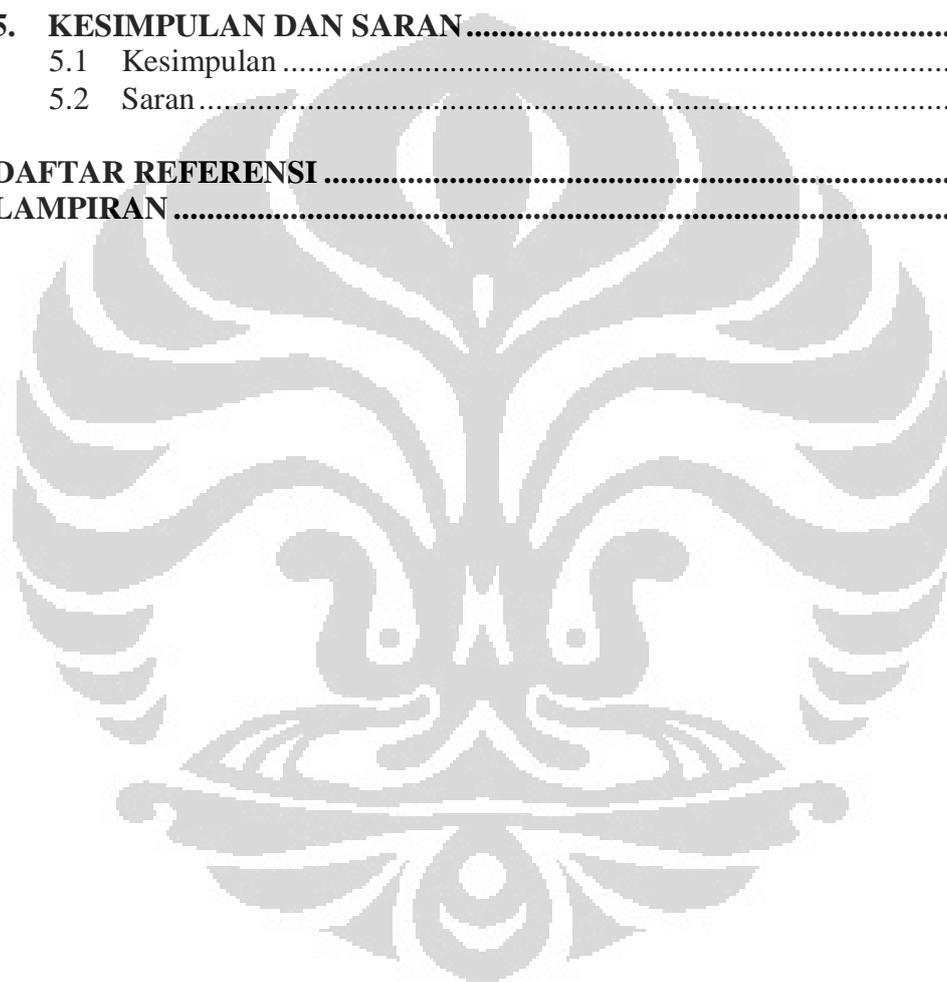
Key word : *Holothuria atra* crude extract, anticancer, micronucleus test.

xii + 54 pages; 14 appendices; 15 pictures; 1 table  
Bibliography: 40 (1973--2010)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Teripang.....	4
2.1.1. Morfologi dan Klasifikasi <i>Holothuria atra</i> .....	5
2.1.2. Kandungan dan Manfaat Senyawa Bioaktif Teripang .....	6
2.2. Mikronukleus .....	8
2.3. Kolkisin .....	12
2.4. Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	13
<b>3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	16
3.2. Peralatan .....	17
3.3. Bahan.....	17
3.3.1. Bahan Uji .....	17
3.3.2. Hewan Uji.....	17
3.3.3. Makanan dan Minuman Hewan Uji .....	17
3.3.4. Bahan Kimia .....	18
3.4. Cara Kerja.....	18
3.4.1. Pengambilan sampel <i>Holothuria atra</i> .....	19
3.4.2. Ekstraksi <i>Holothuria atra</i> .....	19
3.4.3. Pemeliharaan Hewan Uji.....	20
3.4.4. Pembuatan Larutan Ekstrak Kasar <i>Holothuria atra</i> .....	20
3.4.5. Pembuatan Larutan Kolkisin 0,66 mg/kg bb .....	21
3.4.6. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,66 M (pH 6,9).....	21
3.4.7. Perlakuan .....	21
3.4.5. Pembuatan Preparat Olesan Sumsum Tulang.....	22
3.4.9. Pewarnaan Preparat Olesan Sumsum Tulang .....	23
3.4.10. Pengamatan.....	23
3.4.11. Analisis Data.....	24

<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>25</b>
4.1. Hasil.....	25
4.1.1. Hasil Ekstraksi <i>Holothuria atra</i> .....	25
4.1.2. Hasil Pengamatan Mikronukleus .....	26
4.1.3. Hasil Statistik Data Uji Mikronukleus .....	27
4.2. Pembahasan.....	32
4.2.1. Analisis Hasil Pengamatan Uji Mikronukleus .....	32
4.2.2. Analisis Hasil Statistik Data Uji Mikronukleus .....	34
4.2.3. Analisis Mekanisme Penurunan Jumlah Mikronukleus oleh Ekstrak Kasar <i>Holothuria atra</i> .....	36
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>38</b>
5.1 Kesimpulan .....	38
5.2 Saran.....	38
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>43</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1.	Morfologi <i>Holothuria atra</i> .....	6
Gambar 2.1.2.	Struktur kimia holothurin a.....	7
Gambar 2.2(1)	Mikronukleus dalam sel PCE.....	9
Gambar 2.2(2)	Mekanisme pembentukan mikronukleus .....	11
Gambar 2.3.	Struktur kimia kolkisin .....	13
Gambar 2.4.	Mencit.....	14
Gambar 3.1.	Peta lokasi pengambilan sampel teripang di Pulau Pari, Kep. Seribu .....	16
Gambar 3.4.	Skema cara kerja penelitian .....	18
Gambar 4.1.1.	Ekstrak kasar <i>Holothuria atra</i> .....	25
Gambar 4.1.2(1)	Struktur PCE dan NCE.....	26
Gambar 4.1.2(2)	Struktur mikronukleus pada PCE.....	27
Gambar 4.1.3(1)	Diagram batang rerata jumlah mikronukleus per 2000 PCE .....	28
Gambar 4.1.3(2)	Diagram batang perbandingan rerata jumlah mikronukleus per 2000 PCE antara KK+ dan KK-.....	29
Gambar 4.1.3(3)	Diagram batang perbandingan rerata jumlah mikronukleus per 2000 PCE antara KE1, KE2, KE3, KE4 dan KK+ .....	30
Gambar 4.1.3(4)	Diagram batang persentase penurunan jumlah Mikronukleus .....	32

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.3	Hasil uji Fisher's <i>least significant difference</i> (LSD).....	31
-------------	---	----

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan dosis ekstrak <i>Holothuria atra</i> untuk <i>Mus musculus</i> .....	43
Lampiran 2	Penyuntikan kolkisin pada mencit secara intraperitoneal .....	44
Lampiran 3	Pencekohan ekstrak kasar <i>H. atra</i> pada mencit secara oral .....	44
Lampiran 4	Pengorbanan mencit dengan cara dislokasi vertebrae servikalis .....	45
Lampiran 5	Pengambilan sumsum tulang dari tulang femur mencit ....	45
Lampiran 6	Persentase mikronukleus per 2000 PCE pada tiap perlakuan.....	46
Lampiran 7	Persentase penurunan mikronukleus (MN) tiap perlakuan.....	47
Lampiran 8	Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov .....	48
Lampiran 9	Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov data transformasi .....	49
Lampiran 10	Hasil uji non-parametrik Kruskal-Wallis .....	50
Lampiran 11	Hasil uji Fisher's <i>least significant difference</i> (LSD).....	51
Lampiran 12	Data tabel hasil pengamatan jumlah mikronukleus per 2000 PCE .....	53
Lampiran 13	Data tabel hasil transformasi ( <i>log</i> ) jumlah mikronukleus per 2000 PCE .....	53
Lampiran 14	Warna ekstrak kasar berdasarkan standar warna ACE- <i>Paint</i> .....	54

## **BAB 1 PENDAHULUAN**

Luas seluruh permukaan bumi 70% didominasi oleh lautan. Laut memiliki potensi yang besar sebagai penghasil produk alam karena memiliki tingkat keanekaragaman spesies yang tinggi. Sebanyak 33 filum dari kingdom animalia dengan jumlah sekitar 500 juta spesies berhabitat di laut. Namun, hanya sebagian kecil dari total spesies tersebut yang berhasil diteliti hingga saat ini. Lebih dari 6000 organisme laut diketahui memiliki aktivitas sitotoksik dalam uji antikanker oleh NCI (*National Cancer Institute*). Hampir 2% dari jumlah organisme tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi sebanyak dua kali lipat dibandingkan dengan tumbuhan dan mikroorganisme. Senyawa sitotoksik tersebut dapat menghambat sel tumor secara *in vitro* (Schupp 2000: 4).

Penggunaan obat-obatan sintetik di dunia masih memegang peranan penting dalam dunia kedokteran. Hal tersebut karena 80% dari total penduduk dunia masih menggunakan obat-obatan sintetik sebagai bahan pengobatan utama. Selama dua puluh tahun terakhir, peneliti mulai banyak melakukan riset tentang senyawa bioaktif potensial dari organisme laut. Riset tersebut bertujuan untuk memenuhi kebutuhan bahan obat alami (Schupp 2000: 1).

Pemanfaatan senyawa bioaktif dari organisme laut di antaranya adalah sebagai obat antikanker, antibakteri, antifungi, antiprotozoa, dan antivirus. Salah satu biota laut yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif adalah teripang yang merupakan invertebrata laut dari filum Echinodermata. Sedikitnya terdapat 188 jenis teripang di perairan Indonesia, tetapi pemanfaatan teripang masih terbatas sebagai bahan makanan (Purwati 2005: 15).

Triterpen glikosida merupakan metabolit sekunder utama yang dihasilkan oleh teripang. Triterpen glikosida memiliki aktivitas bioaktif yang berperan dalam mekanisme pertahanan diri teripang dari predator. Hal tersebut berkaitan dengan karakteristik teripang yang umumnya memiliki tubuh lunak elastik dan tidak mampu bergerak cepat (Schupp 2000: 6 & 13--14). Selain itu, triterpen glikosida dilaporkan memiliki aktivitas toksisitas yang berperan sebagai

antikanker (Dang *dkk.* 2007: 1387; Maier *dkk.* 2000: 732). Berdasarkan penelitian Suriyanto (2010: 28), diketahui bahwa ekstrak kasar *Holothuria atra* memiliki aktivitas toksisitas tertinggi dibandingkan dengan aktivitas toksisitas dari ekstrak kasar *H. pyxis*, *H. arenicola*, dan *H. impatiens* dengan menggunakan BSLT (*brine shrimp lethality test*). Ekstrak kasar *Holothuria atra* memiliki nilai LC<sub>50</sub> sebesar 175 ppm, sedangkan jenis-jenis lainnya masing-masing memiliki nilai LC<sub>50</sub> sebesar 217 ppm, 244 ppm dan 418 ppm. Menurut Mayer & Gustafson (2008: 2381) suatu senyawa dapat dikategorikan sebagai antikanker jika memiliki LC<sub>50</sub> ≤ 1000 ppm.

Pengujian efek antikanker secara *in vivo* umum dilakukan dengan menggunakan uji mikronukleus. Hal tersebut karena uji mikronukleus memiliki prosedur yang lebih sederhana, dapat dilakukan oleh siapa saja, dan lebih cepat dibandingkan dengan metode lainnya (Fenech 1997: 11; Kamboj & Sumita 2007: 121). Mikronukleus merupakan kromatin sitoplasmik yang tampak sebagai inti berukuran kecil. Mikronukleus dapat terbentuk dari patahan kromosom atau kromosom utuh yang diasingkan dari nukleus pada tahap anafase. Keberadaan mikronukleus merupakan indikasi terjadinya aktivitas mutagenik yang merusak kromosom dan akhirnya memicu terjadinya kanker. Kolkisin merupakan senyawa karsinogenik yang mampu menghambat pembentukan benang spindel pada pembelahan sel sehingga menghasilkan sel yang bersifat poliploid (Purwadiwarsa *dkk.* 2000: 18).

Penelitian mengenai aktivitas ekstrak kasar *H. atra* sebagai obat antikanker di Indonesia belum pernah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan pengujian mengenai potensi aktivitas antikanker dari ekstrak kasar *H. atra*. Pengujian efek antikanker dari ekstrak kasar teripang *H. atra* secara *in vivo* akan dilakukan dengan menggunakan metode uji mikronukleus. Uji mikronukleus merupakan prosedur yang umum digunakan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik suatu senyawa. Uji tersebut dapat menggunakan mencit sebagai hewan uji. Senyawa karsinogen yang digunakan dalam penelitian yaitu kolkisin dengan dosis 0,66 mg/Kg bb. Pemberian kolkisin dilakukan dengan penyuntikan pada bagian *intraperitoneal* mencit pada hari pertama, kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak kasar *H. atra* yang dilakukan sekali dalam

satu hari selama tujuh hari berturut-turut dengan cara pencekokkan. Efek mutagenik kemudian diamati pada sel eritrosit polikromatik (PCE) dari sumsum tulang femur mencit albino jantan (*Mus musculus*) (Sumpena *dkk.* 2009: 35).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan berbagai variasi dosis (0,33g/kg bb; 0,66g/kg bb; 0,99g/kg bb; dan 1,32g/kg bb) sebagai obat antikanker terhadap jumlah mikronukleus yang terbentuk. Penelitian diharapkan akan mendapat hasil yang mendukung penggunaan bahan alam dari laut sebagai obat antikanker. Hipotesis penelitian adalah pemberian ekstrak kasar *H. atra* terhadap hewan uji mencit memengaruhi pengurangan jumlah mikronukleus yang terbentuk, sehingga berpotensi sebagai obat antikanker.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Teripang

Teripang atau timun laut merupakan organisme yang berasal dari filum Echinodermata dan dari kelas Holothuroidea. Terdapat sedikitnya 1000 spesies dari kelas Holothuroidea. Teripang umumnya memiliki tubuh lunak elastik berbentuk silindris, simetri bilateral, duri-duri yang tereduksi, dan bergerak dengan sistem ambulakral. Teripang dewasa memiliki panjang tubuh hingga mencapai satu meter. Teripang memiliki kaki tabung di permukaan tubuhnya. Organ tersebut digunakan untuk lokomosi dan menempel. Teripang merupakan hewan pemakan bahan organik yang terdapat pada substrat (*deposit feeder*) (Pechenik 1996: 460--462).

Teripang tersebar hampir di seluruh lautan di berbagai belahan dunia. Teripang umumnya ditemukan di perairan yang dangkal dan hangat dengan suhu perairan antara 28--31°C. Namun teripang juga dapat ditemukan di perairan laut hingga kedalaman 10.000 m. Teripang sering ditemukan di daerah yang bersubstrat pasir, di area pecahan karang, dan di padang alga dan lamun (Aziz 1996: 44).

Teripang umumnya *dioceus* (berkelamin terpisah) dengan dimorfisme yang tidak jelas. Teripang mampu bereproduksi secara seksual dan aseksual. Reproduksi seksual pada teripang yaitu dengan cara pembuahan eksternal. Reproduksi aseksual teripang dilakukan dengan cara fision, yaitu tubuh teripang membelah menjadi dua bagian secara alami dan kemudian masing-masing bagian tersebut akan tumbuh menjadi individu normal (Darsono 1998: 2; Purwati 2001: 33--34).

Teripang merupakan organisme yang tidak mampu bergerak cepat untuk menghindari dari predatornya. Oleh karena itu, teripang harus memiliki suatu mekanisme untuk pertahanan dirinya. Mekanisme pertahanan diri yang dilakukan teripang contohnya seperti mengeraskan bagian tubuhnya, membenamkan diri ke dalam pasir, dan bersembunyi di celah karang. Mekanisme lainnya yang dapat

dilakukan teripang adalah dengan cara pertahanan secara kimiawi. Mekanisme pertahanan secara kimiawi dilakukan dengan memproduksi suatu zat toksik sebagai metabolit sekundernya. Teripang juga dapat mengeluarkan cairan lengket dan organ dalamnya yang toksik (eviserasi) untuk pertahanan dirinya (Aziz 1995: 13; Pechenik 1996: 465; Maier *dkk.* 2000: 732).

### 2.1.1. Morfologi dan Klasifikasi *Holothuria atra*

*Holothuria atra* atau lebih dikenal sebagai teripang hitam (*black sea cucumber*) adalah organisme laut dari filum Echinodermata dan dari kelas Holothuroidea (Gambar 2.2.1.) (Pechenik 1996: 473--474). *Holothuria atra* merupakan salah satu jenis teripang yang tersebar luas di Indo-pasifik barat. *Holothuria atra* merupakan jenis teripang yang sering dijumpai pada rataan terumbu karang terutama dengan substrat pasir (Harriott 1982: 53). Klasifikasi *H. atra* menurut Arnold & Birtles (1989: 221--227) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Echinodermata
Kelas	: Holothuroidea
Bangsa	: Apidochirotida
Suku	: Holothuriidae
Marga	: <i>Holothuria</i>
Jenis	: <i>Holothuria atra</i>

*Holothuria atra* memiliki tubuh berbentuk silindris yang elastis dengan panjang maksimal sekitar 24 inchi. *Holothuria atra* umumnya memiliki warna tubuh hitam hingga kecoklatan pada bagian dorsal dan berwarna lebih terang pada bagian ventral. Tubuh *H. atra* sering tertutupi oleh pasir untuk meredam pengaruh cahaya matahari dan suhu yang tinggi pada siang hari (Siena 1996: 41). *Holothuria atra* merupakan omnivora pemakan detritus dan ganggang dalam sedimen (*deposit feeder*) (Pechenik 1996: 461--465; Skillings *dkk.* 2010: 2).

Pergerakan *H. atra* menggunakan kaki tabung yaitu bagian dari saluran air ambulakral yang bekerja secara hidrolis. Fungsi utama sistem saluran air adalah mengatur tekanan hidrolis sehingga kaki tabung dapat bergerak. Kaki tabung

juga bermodifikasi sebagai alat peraba dan tentakel untuk mengumpulkan makanan. Kaki tabung yang berfungsi sebagai alat gerak terletak di bagian ventral tubuh yang disebut pedisel. Kaki tabung yang berfungsi sebagai alat peraba terletak di bagian dorsal tubuh yang disebut papila, sedangkan kaki tabung yang bermodifikasi menjadi tentakel terletak di sekeliling mulut (Pechenik 1996: 461--465).

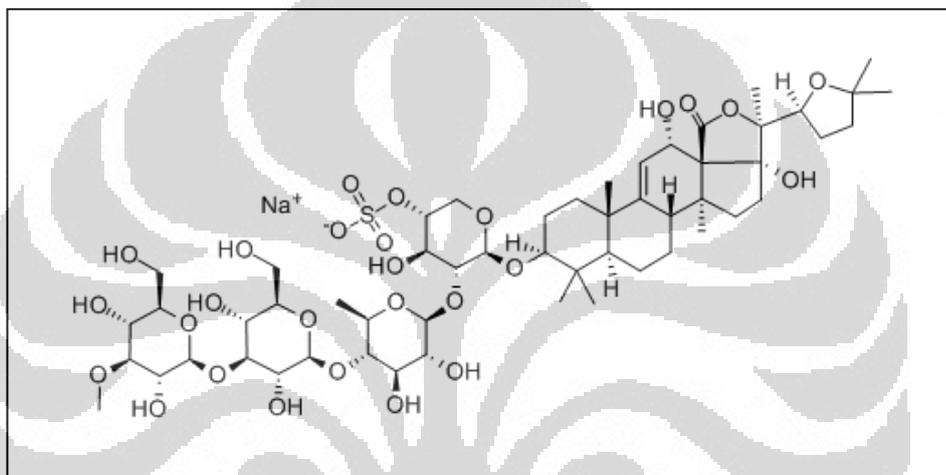


Gambar 2.1.1. Morfologi *Holothuria atra*  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

### 2.1.2. Kandungan dan Manfaat Senyawa Bioaktif Teripang

Teripang memiliki kandungan senyawa bioaktif yang cukup potensial. Teripang selain menjadi bahan makanan yang lezat, juga mempunyai senyawa sebagai antibiotik, antimikrobal, antitumor dan antikoagulan. Senyawa toksik yang terdapat pada Echinodermata dikenal sebagai triterpen glikosida, yaitu senyawa kompleks yang terdiri dari gula dan steroid atau triterpenoid. Nama umum dari senyawa triterpen glikosida yang terdapat pada teripang *H. atra* adalah holoturin a (Gambar 2.1.2) dan holothurin b (Maier *dkk.* 2000: 732; Dang *dkk.* 2007: 1387).

Metabolit sekunder utama yang bertanggung jawab pada sifat toksik teripang adalah triterpen glikosida. Hal tersebut berhubungan dengan mekanisme pertahanan teripang. Triterpen glikosida diproduksi pada bagian kulit dan di dalam tubulus cuvier teripang. Senyawa tersebut dilaporkan memiliki efek biologis yang luas seperti antifungi yang terbukti efektif untuk mematikan fungi jenis *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae*, sebagai ikhtiotoksik, hemolitik, aktivitas imunomodulator dan aktivitas sitotoksik melawan sel tumor pada manusia dan mencit (Wu *dkk.* 2007: 609; Careaga *dkk.* 2008: 61).



Gambar 2.1.2. Struktur kimia holothurin a  
[Sumber: Chemicalbook 2010: 1.]

Teripang merupakan organisme yang mempunyai nilai penting karena dua hal yaitu teripang dapat digunakan sebagai sumber biofarmaka potensial dan teripang sebagai makanan kesehatan. Komponen yang terkandung dalam tubuh teripang terdiri dari 44--55% Protein, 3--5 % karbohidrat dan 1,5% lemak. Kandungan asam lemak penting pada teripang seperti asam eikosapentaenoat (EPA) dan asam dekosa heksanoat (DHA) dapat berperan dalam agen penyembuh luka dan antitrombotik. Selain itu teripang juga mengandung bahan aktif antibakteri, antifungi dan antikoagulan (Mayer & Gustafson 2008: 2357; Dewi *dkk.* 2010: 1).

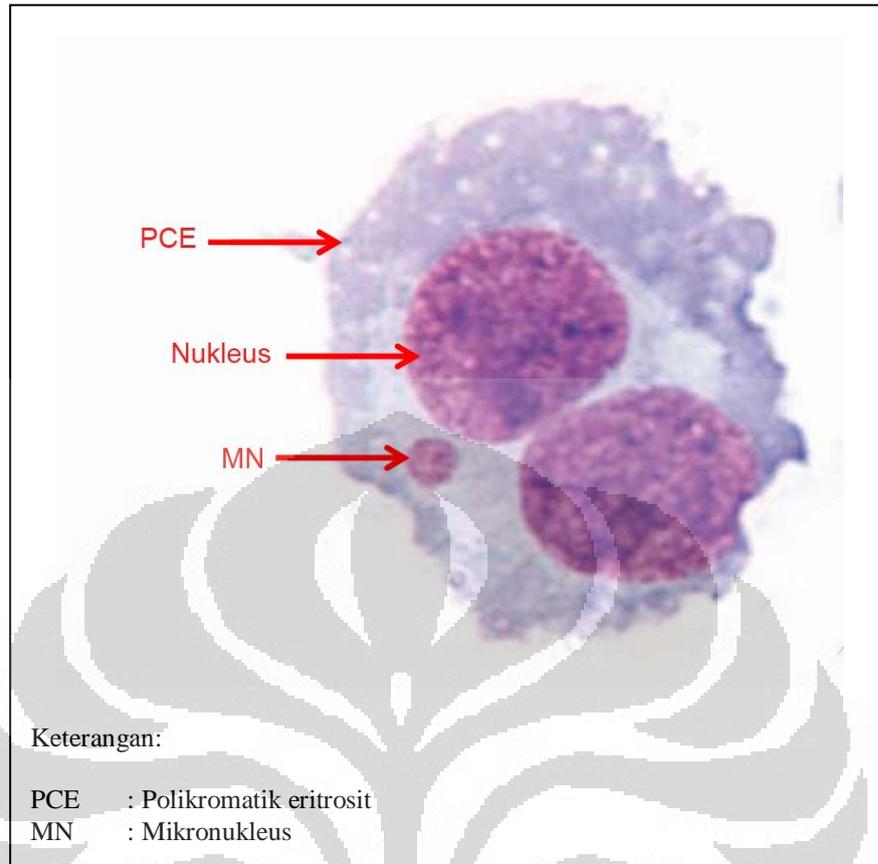
Teripang digunakan sebagai bahan obat-obatan oleh banyak negara di dunia. Salah satu produk obat-obatan yang berasal dari teripang yaitu *gamat oil*. Produk tersebut kaya akan senyawa *grow factor*, sehingga dapat memperbaiki sel-

sel yang telah rusak. Kandungan protein hingga 82% dan asam lemak essensial dilaporkan mampu memperkuat sel hati untuk mengeluarkan zat antibiotik (*immunomodulator*). Kandungan kolagen yang tinggi pada produk *Gamat oil* mampu memicu proses regenerasi sel secara singkat, sehingga dapat juga berfungsi untuk mencegah dan membantu mempercepat penyembuhan berbagai macam penyakit. Penelitian mengungkapkan bahwa *Gamat oil* pada konsentrasi 50 µg dapat menggumpalkan dan mencegah pembentukan sel kanker. Manfaat lain dari produk tersebut yaitu mampu menyembuhkan berbagai penyakit jantung koroner, kencing manis, kanker, osteoporosis, alergi saluran pernafasan (bersin, sinusitis, asma), alergi kulit, darah tinggi, darah rendah, kolesterol, penyempitan pembuluh darah, dan penurunan fungsi hati (Rohani 2009: 1--4).

## 2.2. Mikronukleus

Mutasi merupakan perubahan yang terjadi pada gen atau pada kromosom. Mutasi dapat dikaitkan dengan timbulnya beragam kelainan, termasuk penyakit kanker. Selain dapat terjadi secara spontan, mutasi juga dapat diinduksi oleh berbagai faktor seperti radiasi, senyawa kimia tertentu, dan virus. Faktor-faktor penginduksi mutasi dikenal sebagai mutagen (Purwadiwarsa *dkk.* 2000: 18).

Salah satu indikator terjadinya mutasi adalah adanya mikronukleus (MN). Mikronukleus merupakan hasil mutasi dari kromosom utuh yang patah dan kemudian tampak sebagai nukleus berukuran kecil di dalam suatu sel. Mikronukleus mudah diamati pada sel polikromatik eritrosit (PCE) (Purwadiwarsa *dkk.* 2000: 18). Mikronukleus adalah suatu massa berbentuk bundar yang merupakan DNA ekstranukleus yang berasal dari fragmen kromatid pada aberasi kromosom yang dikeluarkan dari inti saat pembelahan sel (Gambar 2.2(1)). Terbentuknya mikronukleus menunjukkan adanya kerusakan sitogenetik pada kromosom atau tidak berfungsinya benang spindel pada saat anafase yang disebabkan mutagen. Oleh karena itu, mikronukleus dapat menjadi parameter untuk mengetahui efek paparan suatu senyawa karsinogenik (Sumpena *dkk.* 2009: 35).



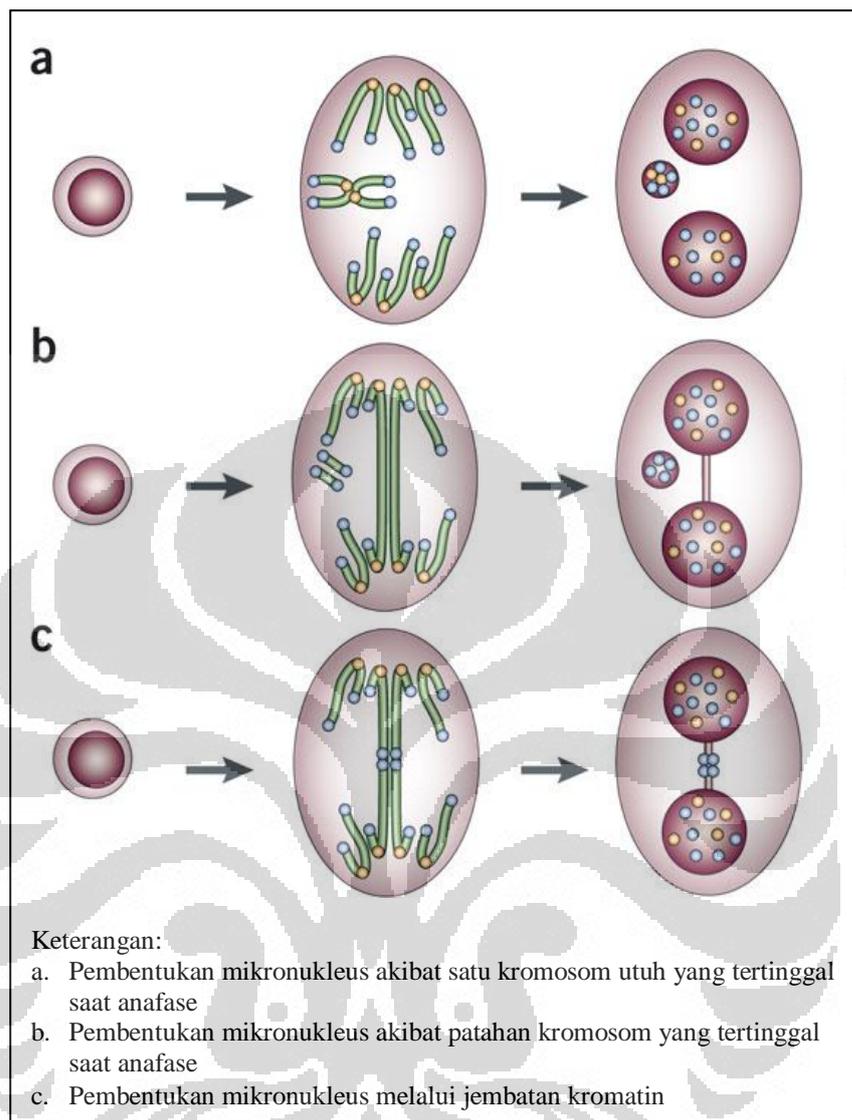
Gambar 2.2(1). Mikronukleus dalam sel polikromatik eritrosit  
 [Sumber: Fenech 2007: 1085.]

Mekanisme pembentukan mikronukleus menurut Fenech (2007: 1084--1086) dapat terjadi akibat adanya patahan kromosom atau kromosom utuh yang tertinggal ketika tahap anafase pembelahan sel. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya kegagalan dalam pembentukan benang spindel akibat pajanan agen mutagenik. Pembentukan mikronukleus juga dapat terjadi melalui pembentukan jembatan kromatin yang menyebabkan terjadinya patahan-patahan kromosom. Terjadinya poliploidi pada sel juga merupakan salah satu cara dalam pembentukan mikronukleus. Menurut Sahu *dkk.* (1981: 72) mikronukleus juga dapat terbentuk secara alami atau tanpa adanya pengaruh pemajanan bahan-bahan mutagenik. Jumlah mikronukleus yang terbentuk secara alami yaitu sebanyak 20 per 10.540 PCE atau setara dengan 3,795 per 2000 PCE.

Menurut Khrisna *dkk.* (1994: 12), mikronukleus terlihat jelas dan dapat dihitung pada sel polikromatik eritrosit yang masih muda dan berukuran lebih besar dari eritrosit. Polikromatik eritrosit merupakan sel darah yang akan mengalami perkembangan menjadi eritrosit. Sel darah berasal dari *stem cell* dengan proses pematangan dan pembentukan yang terjadi pada sumsum tulang merah. Ketika tahap mitosis berakhir, sel normoblas akan mengeluarkan inti nukleus (enukleasi). Sel yang telah terpajan senyawa mutagenik akan mengeluarkan nukleus tanpa disertai dengan mikronukleus. Tahapan tersebut menyebabkan mikronukleus dapat terlihat jelas pada sel polikromatik eritrosit (Heddle *dkk.* 1983: 65).

Senyawa karsinogen dapat menimbulkan mutasi gen yang dapat dimanifestasikan sebagai kerusakan kromosom, yaitu terjadi aberasi atau terbentuk patahan-patahan kromosom. Beberapa senyawa karsinogenik diantaranya *cyclophosphamide* (CP), *ethyl methanesulphonate*, *tryethyl enemelamine*, mitomisin C, dan kolkisin. Ketika tahap telofase, fragmen kromosom atau massa kromatin dalam sel akan tertinggal pada sitoplasma membentuk struktur menyerupai inti sel dengan diameter antara 1/20 sampai 1/5 diameter inti yang dinamakan mikronukleus. Terbentuknya mikronukleus pada sel merupakan indikasi terjadinya aktivitas mutagenik yang merusak kromosom dan akhirnya memicu terjadinya kanker. Metode uji mikronukleus merupakan cara sederhana untuk mengetahui efek sitotoksik suatu senyawa yang dapat dilakukan pada sel PCE dari apusan sumsum tulang hewan rodensia (Heddle *dkk.* 1983: 77; Sumpena *dkk.* 2009: 35).

Menurut Cicchetti *dkk.* (1999: 240), uji mikronukleus pada sumsum tulang mencit sangat efektif untuk mendeteksi kerusakan dan hilangnya kromosom akibat induksi zat kimia mutagenik karena uji tersebut lebih sederhana dan cepat dibandingkan cara analisis yang lain. Pada uji mikronukleus, efek karsinogenik dapat diukur dengan menghitung jumlah mikronukleus yang terdapat dalam sel. Uji mikronukleus terhadap mencit merupakan prosedur yang umum digunakan untuk mendeteksi potensi agen-agen mutagen yang dapat merusak kromosom (Hayes *dkk.* 2009: 416).



Gambar 2.2(2). Mekanisme pembentukan mikronukleus  
[Sumber: Fenech 2007: 1086.]

Aberasi kromosom dapat diketahui melalui uji mikronukleus dan analisis metafase. Kelebihan dari uji mikronukleus yaitu sederhana karena penghitungan mikronukleus dapat dilakukan dengan cepat tanpa memerlukan keahlian khusus. Uji mikronukleus memiliki metode yang lebih sederhana dibandingkan dengan analisis metafase. Hal tersebut disebabkan karena dalam uji mikronukleus pengamatan mikronukleus diamati pada tahap interfase sel dan penghitungan mikronukleus dilakukan dengan cara menghitung banyaknya mikronukleus yang terdapat dalam sel. Sementara itu, pengamatan dalam metode analisis metafase dilakukan pada tahap metafase sel dan penghitungan dilakukan dengan

menghitung kromosom sehingga lebih sulit untuk dilakukan (Matter & Tsuchimoto 1980: 92; Fenech 1997: 11).

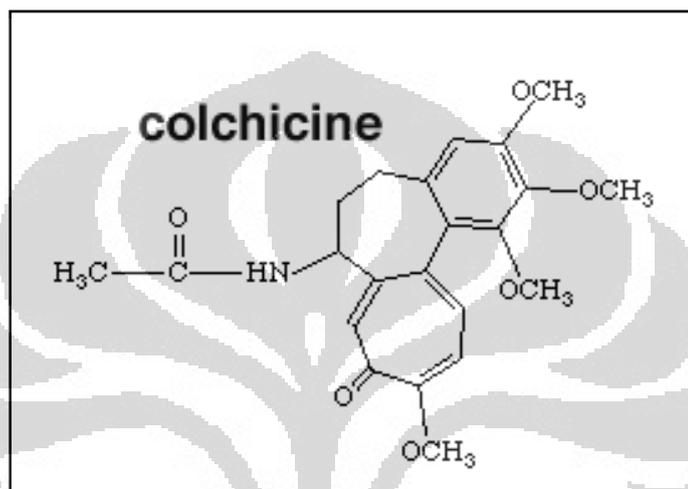
### 2.3. Kolkisin

Kolkisin adalah senyawa alami beracun dan merupakan metabolit sekunder yang umumnya dihasilkan oleh tanaman seperti *Colchicum autumnale* dan *Gloriosa superba* (Gambar 2.4). Senyawa tersebut pada awalnya digunakan untuk mengobati keluhan rematik, terutama asam urat dan tetap digunakan hingga kini meskipun terdapat perdebatan mengenai dosis toksisitasnya. Kolkisin digunakan dalam pengobatan asam urat dan demam mediterania familial. Senyawa ini juga sedang diselidiki kegunaannya sebagai obat antikanker (Ade & Rai 2010: 90--91).

Menurut Suryo (1995 lihat Haryanti dkk. 2009 : 113--114) larutan kolkisin efektif pada konsentrasi 0,001--1,00% dengan lama perlakuan 3--24 jam. Kolkisin pada konsentrasi kritis tertentu akan menghalangi penyusunan mikrotubula dari benang-benang spindel yang mengakibatkan ketidakteraturan pada mitosis. Benang-benang spindel yang tidak terbentuk pada pembelahan mitosis sel diploid menyebabkan kromosom yang telah mengganda selama interfase gagal memisah pada tahapan anafase. Hal tersebut akan menyebabkan pembelahan sel terhambat dan kromosom yang telah mengganda selama interfase gagal memisahkan diri, sehingga membentuk sel yang poliploid (Ade & Rai 2010: 90--92).

Menurut Sheeler dan Bianchi (1987 lihat Haryanti dkk. 2009: 113--114) setiap dimer penyusun mikrotubula (gabungan tubulin a dan b) mempunyai tempat pengikatan spesifik bagi kolkisin. Dimer yang telah berikatan dengan kolkisin akan mencegah tersusunnya dimer tersebut menjadi mikrotubula. Selain menyusun benang-benang spindel, mikrotubula bersama mikrofilamen dan filamen intermediet juga menyusun rangka sel yang berperan dalam proses transportasi intraseluler molekul kecil seperti air dan ion anorganik pada sitoplasma. Oleh karena itu, selain menghalangi penyusunan dimer mikrotubula pada pembelahan sel, kolkisin juga dapat menghalangi perakitan mikrotubula

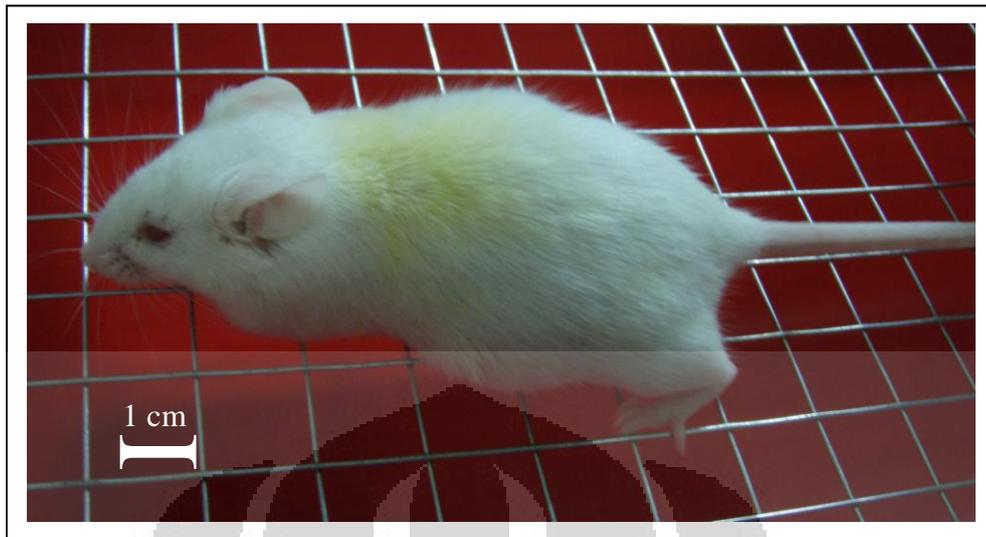
penyusun rangka sel dan mengacaukan tata letak beberapa protein pada membran sel khususnya glikoprotein yang diatur oleh mikrotubula dan mikrofilamen yang berperan sebagai protein reseptor dan pengikat molekul lain pada permukaan sel (Wolfe 1982 *lihat* Haryanti *dkk.* 2009: 113--114). Rusaknya formasi mikrotubula dalam sel menyebabkan gangguan transportasi sel, sehingga molekul-molekul dalam sitoplasma tidak terdistribusi dengan baik (Ade & Rai 2010: 90--92).



Gambar 2.3. Struktur kimia kolkisin  
[Sumber: Ade & Rai 2010: 19.]

#### 2.4. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan mamalia yang termasuk dalam ordo Rodensia atau hewan pengerat. Mencit memiliki hidung runcing dengan panjang tubuh sekitar 6--10 cm. Mencit memiliki telinga tegak yang berukuran sekitar 1,5 cm. Rambut mencit berwarna abu-abu kecoklatan pada bagian punggung dan putih keabu-abuan pada bagian perut, tetapi umumnya seluruh tubuhnya berwarna putih (Gambar 2.4). Mencit memiliki ekor yang tidak berambut dengan panjang 6--11 cm. Berat badan mencit umumnya berkisar 12--30 gram (Ballenger 1999: 4).

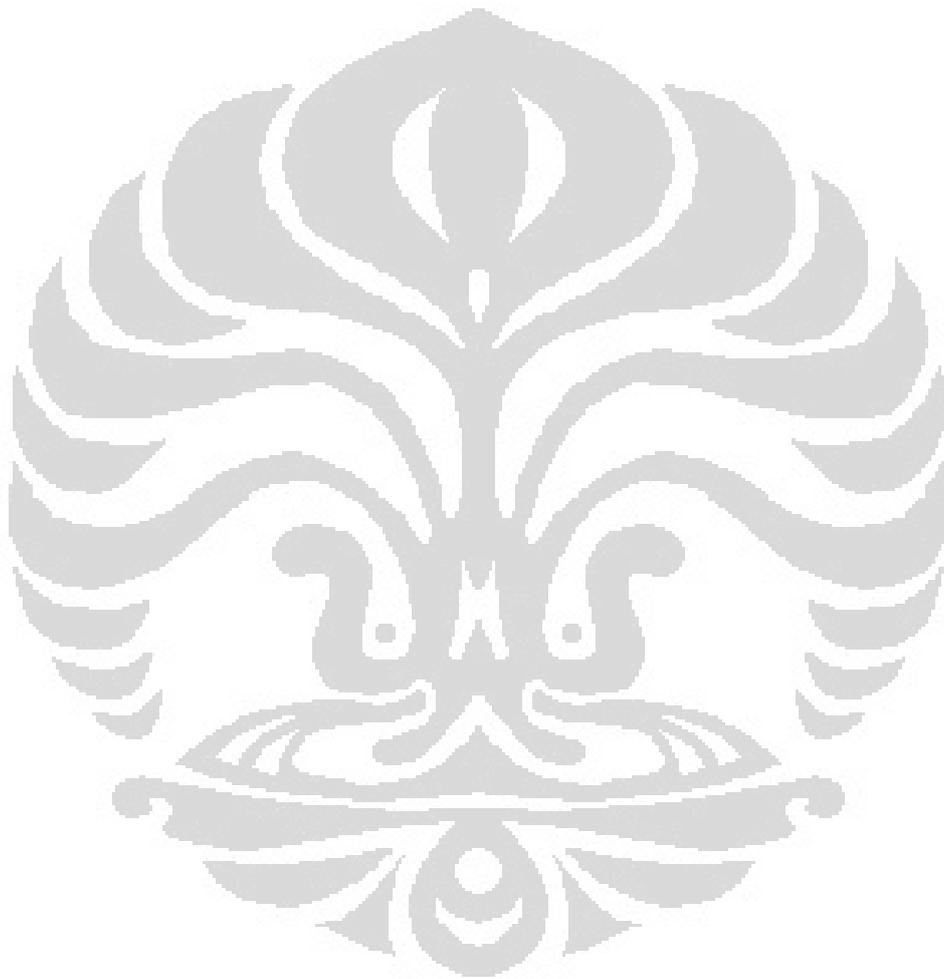


Gambar 2.4. Mencit (*Mus musculus*)  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Mencit adalah hewan kosmopolit yang lebih dikenal sebagai hama tanaman pertanian, perusak barang dan hewan pengganggu di perumahan. Namun di samping dampak negatif yang ditimbulkan oleh mencit, mencit merupakan hewan yang umum dimanfaatkan sebagai hewan uji laboratorium dalam bidang kedokteran dan genetika (Ballenger 1999: 1 & 4). Hal tersebut dikarenakan banyaknya kesamaan genetik dan fisik antara mencit dan manusia. Berdasarkan hasil *mouse genome sequencing consortium* pada tahun 2002, diketahui bahwa kemiripan genetik antara mencit dan manusia mencapai 99%, diperkirakan 30.000--40.000 gen manusia ada pada mencit. Oleh karena itu, peneliti yang mempelajari mekanisme gen spesifik suatu penyakit pada mencit dapat dihubungkan dengan mekanisme gen tersebut pada manusia (Fox *dkk.* 2007: 25).

Mencit sering digunakan sebagai hewan eksperimen karena mencit merupakan hewan yang mudah dipelihara dalam jumlah banyak. Mencit biasa digunakan dalam penelitian genetika *in vivo* karena mencit peka terhadap berbagai bahan kimia mutagenik dan karsinogenik. Umur mencit yang digunakan dalam uji mikronukleus sebaiknya antara 6--8 minggu karena pada umur tersebut sumsum tulang mencit secara optimum memproduksi eritrosit (Schmid 1976: 37; MacGregor *dkk.* 1987: 105--108; Khrisna *dkk.* 1994: 12).

Alasan lain penggunaan mencit sebagai hewan uji adalah adanya kemajuan yang pesat dalam teknik rekayasa genetik pada mencit. Munculnya teknik molekuler untuk menghasilkan mutasi gen pada mencit memungkinkan peneliti untuk mempelajari peran fisiologi dan patofisiologi protein fungsional. Selain itu kemajuan teknik untuk mengkarakterisasi fenotip mencit pada tingkat jaringan dan organ juga menjadi faktor pendukung (Fox *dkk.* 2007: 25).



## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pengambilan sampel teripang hitam *Holothuria atra* adalah Pulau Pari, Kepulauan Seribu, Jakarta Utara (Gambar 5). Pengambilan sampel teripang *H. atra* telah dilakukan pada bulan Februari 2011 dan April 2011. Lokasi pengujian sampel *H. atra* dilakukan di Laboratorium Taksonomi Hewan dan Laboratorium Perkembangan Hewan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.



Gambar 3.1. Peta lokasi pengambilan sampel teripang di Pulau Pari, Kep. Seribu [Sumber: Google earth.]

### 3.2. Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian yaitu alat *snorkeling* (*fin*, *masker*, dan *snorkel*) [Mares], botol sampel, timbangan digital [OHAUS], timbangan analitik [Precisa], blender lab. [Waring], sonikator, *rotary vacuum evaporator* [Stuart], oven [Precision], mikroskop medan terang [Nikon], kamera digital, *vortex* [Lab Line], *sentrifuge* [Procion Scientific Kic. Vari Hi-Speed Centricone], gelas ukur [Pyrex], *round flask* [Schott Duran], gelas piala (gelas kimia) [Iwaki], cawan penguap [Pyrex], corong kaca [Pyrex], pipet Pasteur, gelas objek [Sail Brand], dan gelas penutup, pipet kaca 5 ml dan 10 ml [Iwaki], kertas saring no. 1 [Whatman], jarum suntik [Terumo], syringe [Terumo], bak plastik dan kawat penutup untuk kandang mencit, *dissecting set*, *counter*, cawan penguap [Pyrex], tabung sentrifugasi [Iwaki], rak tabung reaksi kimia.

### 3.3. Bahan

#### 3.3.1. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian adalah ekstrak kasar teripang hitam (*Holothuria atra*) dari Pulau Pari, Kepulauan Seribu Jakarta Utara.

#### 3.3.2. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah mencit jantan (*Mus musculus* L.) galur DDY yang berumur sekitar 6--8 minggu dengan berat antara 30--40 gram. Hewan uji di dapatkan dari Bagian Nonruminansia dan Satwa Harian Fakultas Peternakan IPB.

#### 3.3.3. Makanan dan Minuman Hewan Uji

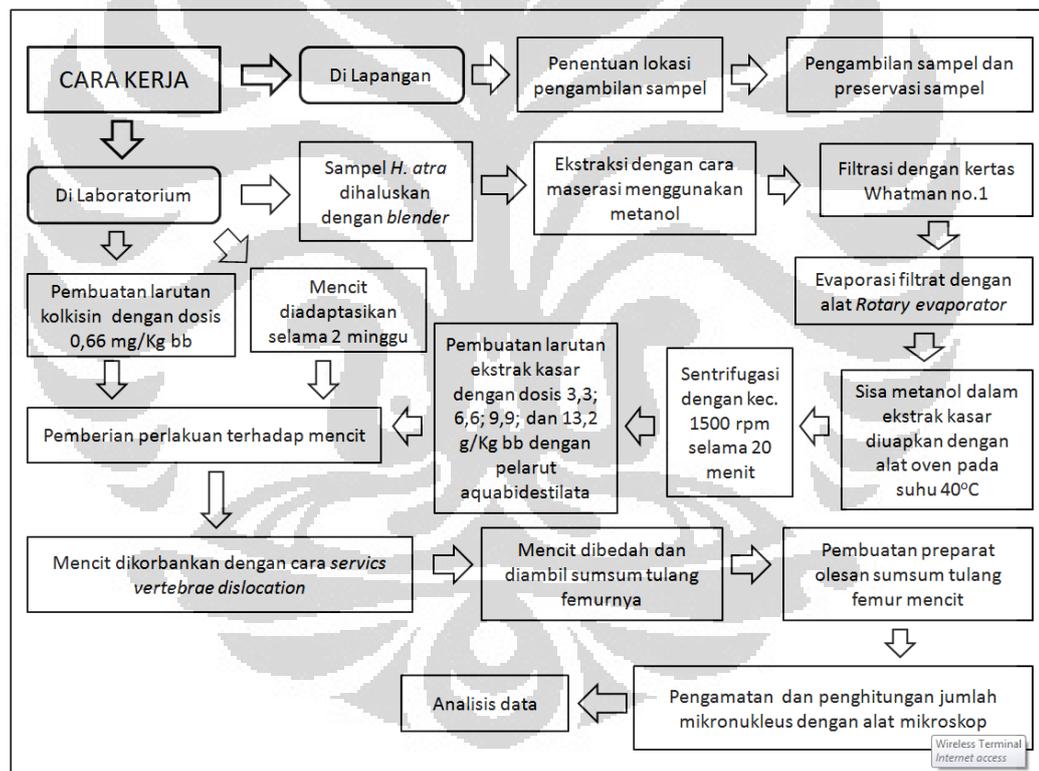
Jenis makanan mencit yang digunakan selama penelitian berupa pelet, dan jenis minuman yang diberikan kepada mencit adalah air yang telah matang.

### 3.3.4. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian adalah akuades, akuabides, kolkisin, larutan ringer, metanol, xilol, entelan, pewarna Giemsa, pewarna May-Gruenwald, asam pikrat, eosin, dapar fosfat 0,066M, desinfektan [Bayclin], dan minyak imersi.

### 3.4. Cara Kerja

Cara kerja yang dilakukan selama penelitian dapat dilihat pada gambar sebagai berikut:



Gambar 3.4. Skema cara kerja penelitian

#### 3.4.1. Pengambilan Sampel *Holothuria atra*

Pengambilan sampel teripang hitam (*Holothuria atra*) telah dilakukan pada bulan Februari 2011 dan April 2011 di rataan terumbu karang Pulau Pari Kepulauan Seribu Jakarta Utara. Proses pengambilan sampel dilakukan dengan cara *snorkeling*. Sampel teripang hitam dikoleksi secara bebas kemudian diletakkan dalam plastik sampel. Sampel teripang kemudian dikorbankan dengan cara dipotong dan kemudian organ dalam perutnya dibuang. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam botol sampel yang telah diisi metanol. Metanol kemudian ditambahkan kembali sampai sampel tersebut terendam sepenuhnya.

#### 3.4.2. Ekstraksi *Holothuria atra*

Sampel teripang dikeluarkan dari dalam bejana kaca penyimpanan dan ditiriskan dari metanol. Sampel teripang yang telah tiris ditimbang dan dicatat untuk mengetahui berat basahnya. Tahapan selanjutnya teripang dipotong menjadi bagian-bagian yang kecil kemudian dihaluskan dengan *blender*.

Sampel yang telah dihaluskan kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia berukuran 1L. Jumlah sampel teripang yang dimasukkan ke dalam gelas kimia 1L adalah kurang lebih satu perlima bagian dari volume gelas kimia tersebut. Metanol ditambahkan ke dalam gelas kimia yang berisi sampel teripang halus hingga volume totalnya mencapai 1L. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam sonikator selama 1 jam dan setelah itu sampel dimaserasi selama 24 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 1. Sampel yang sudah diambil filtratnya tersebut kemudian ditambahkan metanol dan di maserasi kembali selama 24 jam. Proses maserasi tersebut berulang dilakukan hingga filtrat yang diperoleh berwarna bening.

Hasil filtrat kemudian diuapkan dengan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* hingga menjadi ekstrak yang lebih pekat. Suhu yang digunakan dalam proses evaporasi yaitu 40 °C dengan rotasi pemutaran *round flask* pada volume 5. Sampel ekstrak kental yang diperoleh kemudian dipindahkan ke dalam cawan penguap dan di masukkan ke dalam oven dengan suhu 40 °C. Proses tersebut

bertujuan untuk menghilangkan metanol yang masih tercampur di dalam ekstrak kasar teripang. Garam yang terkandung dalam ekstrak kasar dihilangkan dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Bagian supernatan diambil dengan menggunakan pipet secara hati-hati dan kemudian dikeringkan kembali dengan menggunakan oven pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kasar yang bebas dari pelarut.

#### 3.4.3. Pemeliharaan Hewan Uji

Mencit jantan yang diperoleh dari Bagian Nonruminansia dan Satwa Harian Fakultas Peternakan IPB diadaptasikan selama 2 minggu di dalam kandang hewan Lab. Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI. Selama penelitian mencit diberi makan berupa pelet dan diberi minum air matang. Kandang dibersihkan rutin tiga kali dalam seminggu atau ketika kandang sudah kotor dan tercium bau. Sebelum diberi perlakuan, berat badan mencit ditimbang dan dibagi menjadi kelompok-kelompok perlakuan. Mencit ditandai dengan menggunakan asam pikrat sesuai dengan kelompok perlakuan yang akan diberikan.

#### 3.4.4 Pembuatan Larutan Ekstrak Kasar *Holothuria atra*

Pembuatan larutan ekstrak kasar *Holothuria atra* dengan dosis 0,33 g/kg bb diperoleh dengan cara memasukkan 0,33 g ekstrak kering teripang ke dalam aquabidestilata steril hingga mencapai volume total 10 ml. Sampel kemudian diaduk hingga ekstrak teripang tercampur rata dengan akuabides. Larutan ekstrak kasar teripang dengan dosis 0,66 g/kg bb; 0,99 g/kg bb; dan 1,32 g/kg bb diperoleh dengan memasukkan berturut-turut 0,66 g; 0,99 g; dan 1,32 g ekstrak teripang kering ke dalam akuabides steril hingga mencapai volume total 10 ml.

#### 3.4.5. Pembuatan Larutan Kolkisin 0,66 mg/kg bb

Larutan kolkisin dengan dosis 0,66 mg/kg bb diperoleh dengan cara memasukkan 0,66 mg bubuk kolkisin ke dalam gelas ukur, kemudian dimasukkan akuabides hingga diperoleh volume larutan 10 ml.

#### 3.4.6. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,66 M (pH 6,9)

Pembuatan larutan dapar fosfat yang terdiri dari larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  diperoleh dengan cara melarutkan masing-masing 9,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 11,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  di dalam akuades hingga tercapai volume sebanyak 1 L. Larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 320 ml kemudian di campurkan dengan larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sebanyak 400 ml. NaOH ditambahkan sedikit demi sedikit hingga diperoleh larutan dapar fosfat dengan pH 6,9.

#### 3.4.7. Perlakuan

Sebelum diberi perlakuan, berat badan mencit ditimbang dan dicatat terlebih dahulu. Mencit-mencit dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing 5 ulangan. Tubuh mencit ditandai dengan asam pikrat untuk membedakan masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok-kelompok perlakuan meliputi:

- a. KK+ (kelompok kontrol positif) yaitu kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) (Lampiran 2) pada hari pertama, kemudian dicekok (Lampiran 3) akuabides (10 ml/kg bb) mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh.
- b. KK- (kelompok kontrol negatif) yaitu kelompok mencit yang dicekok akuabides (10 ml/kg bb) mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh.
- c. KE1 (kelompok eksperimen 1) yaitu kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) pada hari pertama kemudian dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,33 g/kg bb mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh.

- d. KE2 (kelompok eksperimen 2) yaitu kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) pada hari pertama kemudian dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,66 g/kg bb mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh.
- e. KE3 (kelompok eksperimen 3) yaitu kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) pada hari pertama kemudian dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,99 g/kg bb mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh.
- f. KE4 (kelompok eksperimen 4) yaitu kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) pada hari pertama kemudian dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 1,32 g/kg bb mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh.

#### 3.4.8. Pembuatan Preparat Olesan Sumsum Tulang

Mencit-mencit dikorbankan dengan cara dislokasi vertebrae servikalisnya (Lampiran 4), kemudian dibedah dan diambil tulang femurnya. Tulang femur yang telah bersih dari otot kemudian dipotong pada bagian proksimal sampai terlihat saluran sumsumnya. Larutan ringer sebanyak 1,5 ml diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Larutan ringer sebanyak 0,2 ml kemudian disedot dengan menggunakan *syringe*. Jarum *syringe* kemudian dimasukkan ke dalam saluran sumsum kemudian cairan sumsum disedot secara perlahan hingga cairan sumsum habis terambil (Lampiran 5). Cairan sumsum yang telah bercampur dengan larutan ringer kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro.

Tabung mikro yang berisi cairan sumsum tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 2 menit. Bagian supernatan kemudian dibuang secara perlahan, sedangkan bagian pelet kemudian divorteks hingga membentuk suspensi. Suspensi tersebut kemudian disedot dengan menggunakan pipet Pasteur kemudian ditetaskan di atas gelas objek. Tetesan tersebut diratakan dengan menggunakan gelas objek lainnya. Proses tersebut dilakukan dengan cara dua buah gelas objek tersebut digerakkan dengan arah berlawanan dengan

membentuk sudut  $45^\circ$ . Preparat yang telah terbentuk kemudian dikeringanginkan dan kemudian preparat direndam di dalam metanol absolut selama 3 menit. Preparat kemudian dikeringanginkan selama sehari semalam sebelum dilakukan pewarnaan.

#### 3.4.9. Pewarnaan Preparat Olesan Sumsum Tulang

Preparat yang telah dikeringkan selama semalam kemudian dimasukkan ke dalam *staining jar* yang telah diisi pewarna May-Gruenwald. Pewarnaan tersebut dilakukan selama 3 menit. Preparat kemudian direndam kembali ke dalam pewarna May-Gruenwald yang telah diencerkan dengan akuades dengan perbandingan 1:1 selama 2 menit. Preparat kemudian dicuci dengan akuades sebanyak dua kali. Tahap selanjutnya preparat direndam ke dalam *staining jar* yang sudah diisi larutan pewarna Giemsa yang telah dicampur dengan dapar fosfat dengan perbandingan 7:160 selama 10 menit. Preparat dicuci dengan dengan akuades kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam *staining jar* yang diisi larutan xilol selama 10 menit kemudian diberi entelan dan terakhir preparat ditutup dengan *cover glass*.

#### 3.4.10. Pengamatan

Preparat olesan sumsum tulang diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran  $10 \times 100$  dengan menggunakan minyak imersi. Penghitungan dalam pengamatan preparat dilakukan dengan metode *score blind* yaitu dengan cara menutup label perlakuan pada preparat yang diamati. Jumlah PCE dihitung dengan menggunakan *counter*. Jumlah mikronukleus yang terdapat dalam PCE juga dihitung dengan *counter* yang berbeda dalam waktu bersamaan. Penghitungan jumlah mikronukleus dilakukan pada 2000 sel PCE.

### 3.4.11. Analisis Data

Hasil penghitungan jumlah mikronukleus dari 2000 sel PCE pada setiap kelompok perlakuan (KK+, KK-, KE1, KE2, KE3, dan KE4) disusun dalam bentuk tabel. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan menggunakan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas Levene. Analisis data dilanjutkan dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis karena data yang diperoleh terdistribusi tidak normal. Data yang memiliki perbedaan nyata dari hasil uji Kruskal-Wallis kemudian dilanjutkan dengan pengujian berganda menggunakan Fisher's *least significant difference* (LSD). Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program *software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) dengan pendekatan uji nilai probabilitas.



## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil

#### 4.1.1 Hasil Ekstraksi *Holothuria atra*

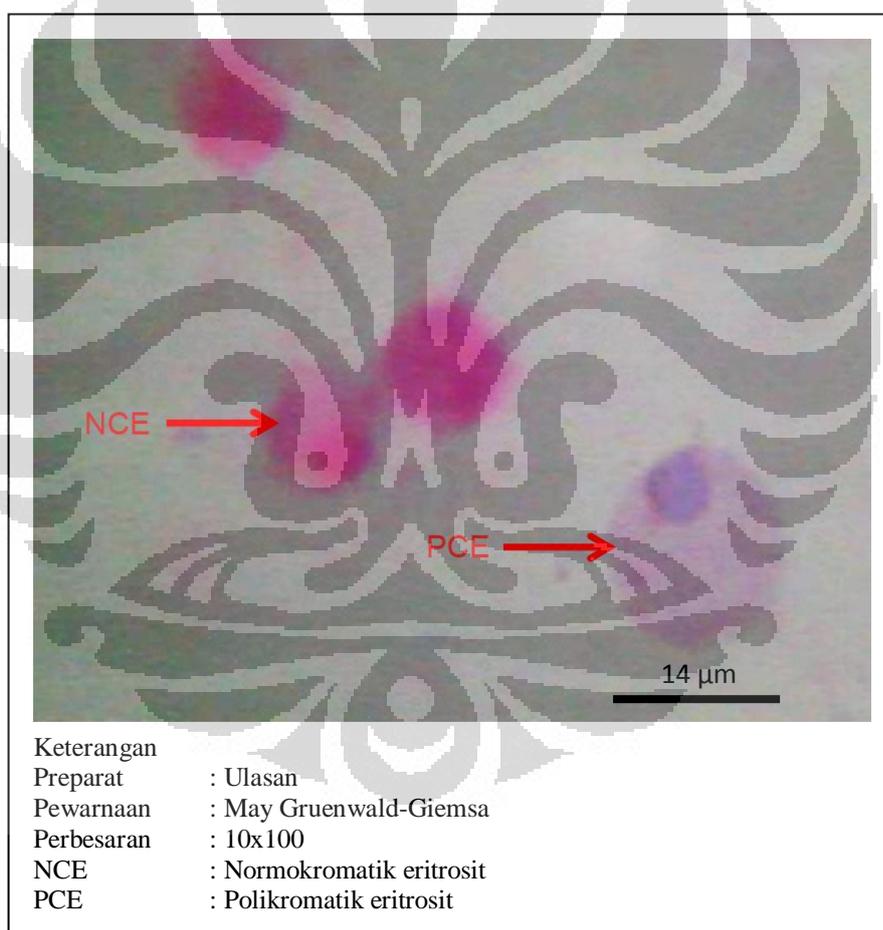
*Holothuria atra* yang berhasil dikoleksi dari Pulau Pari, Kepulauan Seribu Jakarta Utara, yaitu sebanyak 43 individu dengan berat total 2.534 g. Ekstrak kasar *H. atra* yang diperoleh dari seluruh sampel sebanyak 31,80 g (0,79%). Hasil tersebut sesuai dengan Elyakov (1973: 327) yang menyatakan bahwa ekstrak kasar yang diperoleh berkisar antara 0,5--2,5% dari jumlah total sampel teripang. Ekstrak tersebut (Gambar 4.1.1.) memiliki tekstur seperti pasta kental dan berwarna coklat-oranye (Outpost B16-7) (Lampiran 14).



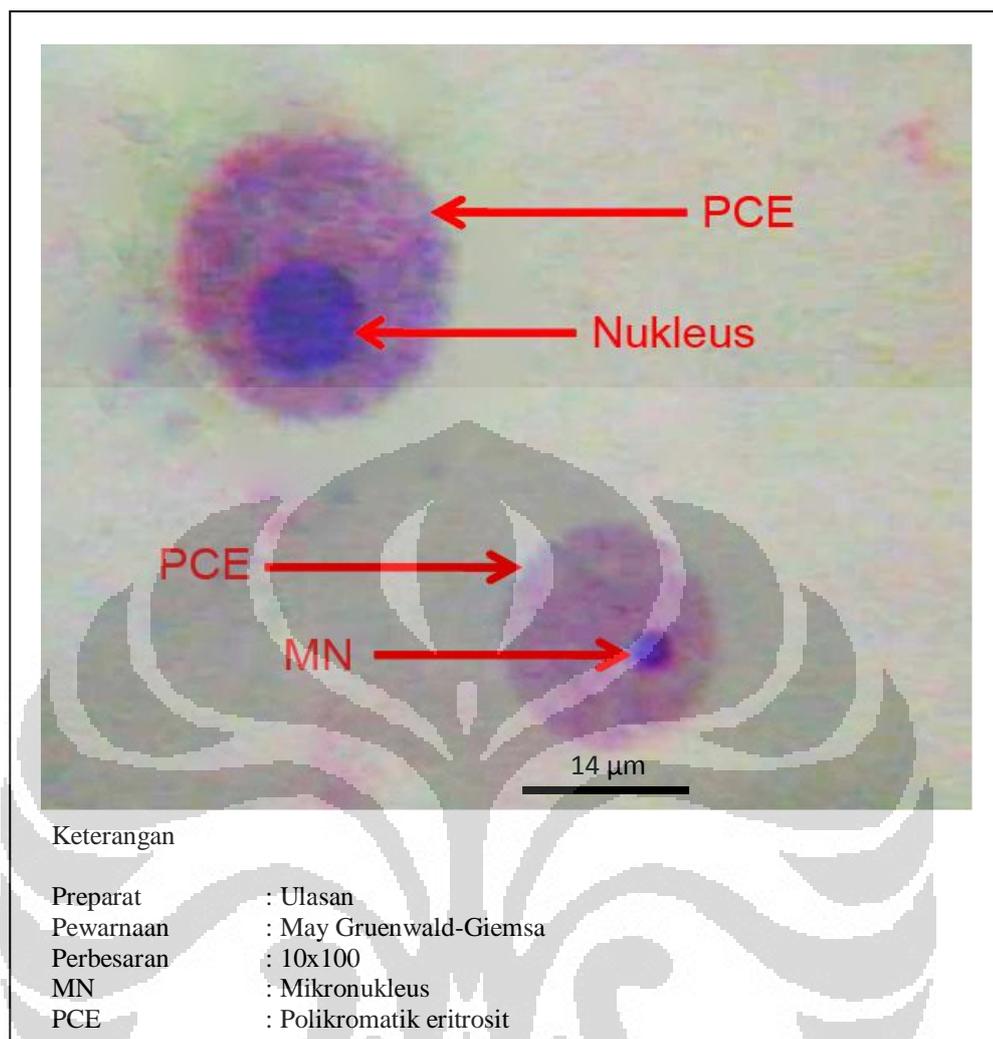
Gambar 4.1.1. Ekstrak kasar *Holothuria atra*  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

#### 4.1.2. Hasil Pengamatan Uji Mikronukleus

Pengamatan preparat sumsum tulang femur *Mus musculus* dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x. Sel polikromatik eritrosit (PCE) dibedakan dari sel lainnya, seperti normokromatik eritrosit (NCE) dengan melihat perbedaan warna dan ukuran sel. Sel PCE yang teramati memiliki warna kebiruan dan berukuran relatif lebih besar dibandingkan dengan sel monokromatik yang berwarna kemerahan dan berukuran lebih kecil (Gambar 4.1.2(1)). Mikronukleus pada sel PCE teramati seperti inti berukuran kecil yang berwarna biru (Gambar 4.1.2(2)).



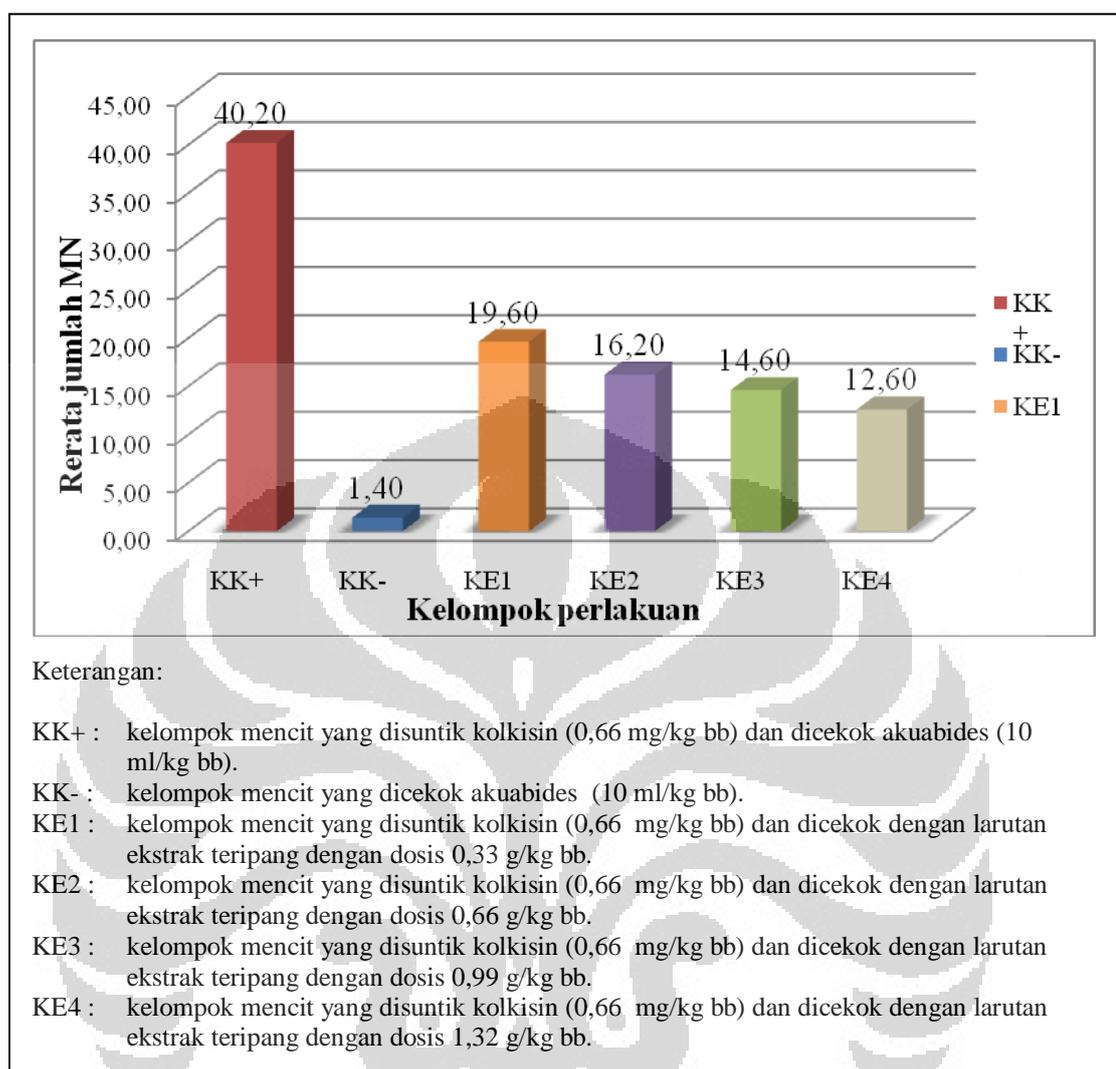
Gambar 4.1.2(1). Struktur PCE dan NCE  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.2(2). Struktur mikronukleus pada PCE  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

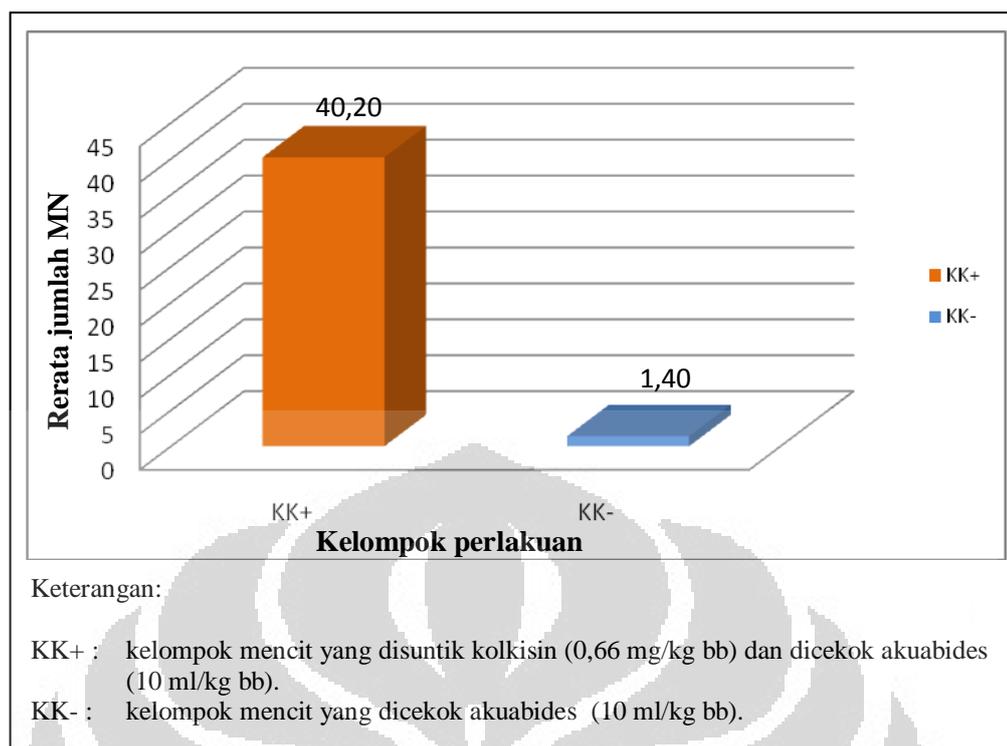
#### 4.1.3. Hasil Statistik Data Uji Mikronukleus

Hasil uji mikronukleus menunjukkan bahwa jumlah rata-rata mikronukleus per 2000 sel eritrosit polikromatik (PCE) pada kelompok kontrol positif (KK+), kelompok kontrol negatif (KK-), kelompok eksperimen 1 (KE1), kelompok eksperimen 2 (KE2), kelompok eksperimen 3 (KE3), dan kelompok eksperimen 4 (KE4) secara berurutan yaitu  $40,20 \pm 2,49$ ;  $1,40 \pm 0,55$ ;  $19,60 \pm 3,51$ ;  $16,20 \pm 5,31$ ;  $14,60 \pm 2,19$ ;  $12,60 \pm 2,88$  (Gambar 4.1.3(1)) (Lampiran 12).



Gambar 4.1.3(1). Diagram batang rerata jumlah mikronukleus per 2000 PCE

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata jumlah mikronukleus pada KK+ dan KK- masing-masing sebesar  $40,2 \pm 2,49$  dan  $1,40 \pm 0,55$  (Gambar 4.1.3(2)). Berdasarkan hasil tersebut, pemberian kolkisin pada KK+ dengan dosis 0,66 mg/kg bb mampu meningkatkan jumlah mikronukleus secara signifikan yaitu sebesar 96,52% dibandingkan dengan KK-.



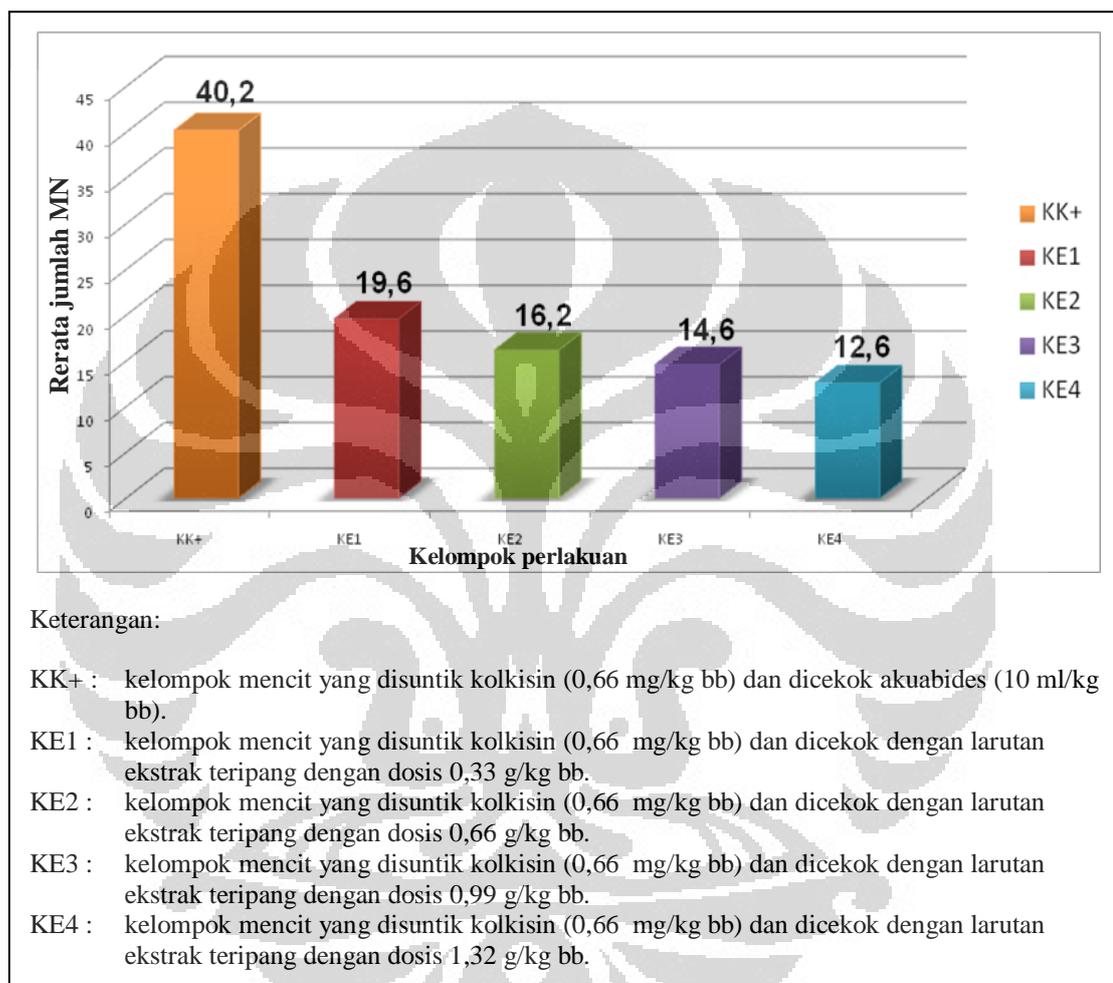
Gambar 4.1.3(2). Diagram batang perbandingan rerata jumlah mikronukleus per 2000 PCE antara KK+ dan KK-

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata jumlah mikronukleus pada KE1, KE2, KE3, dan KE4 lebih kecil dibandingkan dengan KK+ masing-masing sebesar  $19,60 \pm 3,51$ ;  $16,20 \pm 5,31$ ;  $14,60 \pm 2,19$ ;  $12,60 \pm 2,88$  (Gambar 4.1.3(3)). Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* pada kelompok eksperimen mampu menurunkan jumlah mikronukleus.

Data hasil uji mikronukleus kemudian dianalisis dengan menggunakan uji normalitas Kogomarov-Smirnov. Uji tersebut digunakan untuk mengetahui kenormalan distribusi data secara analitik (Dahlan 2004: 55). Pengolahan data dilakukan menggunakan *software statistical product and service solution* (SPSS) v.17. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada Lampiran 8. Hasil uji Kogomarov-Smirnov menunjukkan bahwa data jumlah mikronukleus pada enam kelompok perlakuan memiliki distribusi data tidak normal  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ).

Data jumlah mikronukleus kemudian ditransformasi dengan menggunakan *log* untuk menormalkan data yang diperoleh. Namun, berdasarkan uji Kogomarov-Smirnov, data hasil transformasi masih memiliki distribusi data tidak normal  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 9 & 13). Pengujian menggunakan uji

Levene untuk mengetahui homogenitas data tidak dilanjutkan karena dapat disimpulkan bahwa data hasil penelitian memiliki distribusi tidak normal. Analisis data dilanjutkan dengan menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan nyata pada kelompok data (Dahlan 2004: 87 & 91).



Gambar 4.1.3(3). Diagram batang perbandingan rerata jumlah mikronukleus per 2000 PCE antara KE1, KE2, KE3, KE4 dan KK+

Pemilihan uji statistik non-parametrik Kruskal-Wallis dilakukan karena tujuan dari eksperimen untuk menguji hipotesis komparatif dan data uji merupakan variabel numerik yang memiliki lebih dari dua kelompok, dalam hal ini 6 kelompok perlakuan (Dahlan 2004: 87). Uji non-parametrik Kruskal-Wallis dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95%. Berdasarkan uji tersebut, diketahui

bahwa terdapat perbedaan bermakna pada kelompok data  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 10).

Pengujian kemudian dilanjutkan menggunakan uji Fisher's *least significance density* (LSD) untuk melihat perbandingan ganda antar tiap kelompok eksperimen (Tabel 4.1.3). Hasil LSD menunjukkan bahwa kelompok kontrol, baik KK+ maupun KK-, memiliki perbedaan nyata dengan setiap kelompok eksperimen (KE1,2,3, dan 4) ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 11). Namun, hasil LSD antar tiap kelompok eksperimen tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata, kecuali antara KE1 dan KE3, serta KE1 dan KE4.

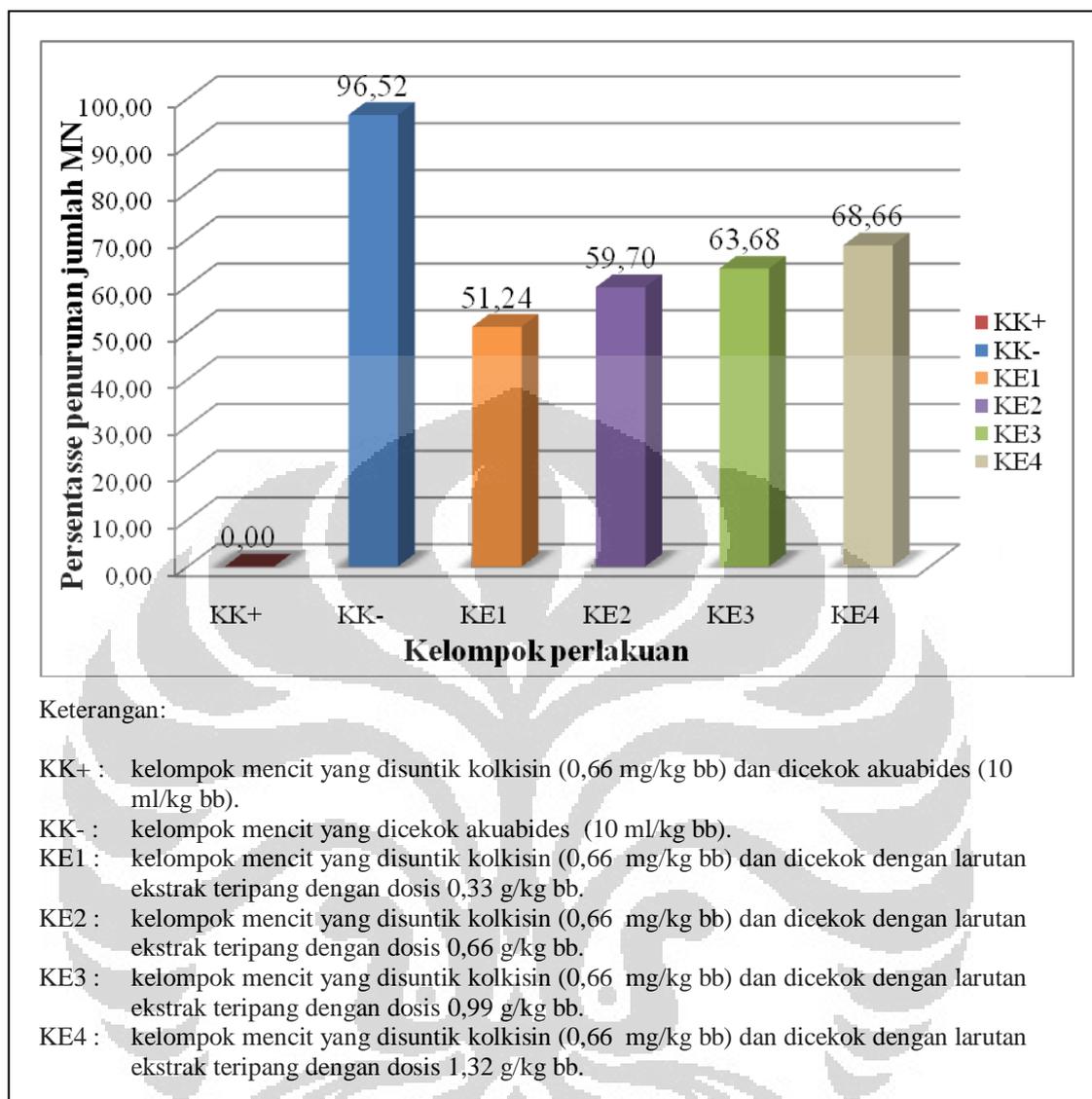
Tabel 4.1.3. Hasil uji Fisher's *least significance density* (LSD)

	KK+	KK-	KE1	KE2	KE3	KE4
KK+		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
KK-			0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
KE1				0,102	0,020*	0,002*
KE2					0,432	0,085
KE3						0,328
KE4						

Keterangan:

- \* Berbeda nyata ( $p < 0,05$ )
- Tidak berberda nyata ( $p > 0,05$ )

Penghitungan penurunan jumlah MN kemudian dilakukan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kasar *H. atra* secara kuantitatif. Hasil uji mikronukleus menunjukkan bahwa persentase penurunan jumlah mikronukleus per 2000 sel PCE yang dibandingkan dengan KK+ pada KE1, KE2, KE3, dan KE4 secara berurutan yaitu 51,24%; 59,70%; 63,68%; dan 68,66% (Gambar 4.1.3(4)) (Lampiran 7). Hasil tersebut menunjukkan bahwa KE4 memiliki persentase penurunan jumlah MN tertinggi dibandingkan dengan kelompok eksperimen lainnya.



Gambar 4.1.3(4). Diagram batang persentase penurunan jumlah mikronukleus

## 4.2. Pembahasan

### 4.2.1. Analisis Hasil Pengamatan Uji Mikronukleus

Pengamatan mikronukleus dilakukan pada preparat olesan sumsum tulang *Mus musculus* dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x.

Pengamatan mikronukleus dilakukan pada sel polikromatik eritrosit (PCE) karena mikronukleus yang terbentuk akibat induksi mutagen dapat terlihat jelas pada sel

PCE. Sel PCE juga digunakan dalam pengamatan mikroskopis karena memiliki ukuran yang lebih besar daripada sel normokromatik eritrosit (NCE) sehingga memudahkan dalam penghitungan. Sel normoblas yang terpajan oleh klastogen akan mengeluarkan nukleusnya (enukleasi) tanpa disertai pengeluaran mikronukleus. Peristiwa enukleasi tersebut terjadi pada tahap PCE dengan mikronukleus yang tetap berada di dalam sitoplasma sel (Heddle *dkk.* 1983: 65&74; Cicchetti *dkk.* 1999: 240).

Penghitungan jumlah mikronukleus yang dilakukan dalam uji mikronukleus umumnya menggunakan 1000--2000 sel polikromatik eritrosit (PCE). Pada penelitian dilakukan penghitungan terhadap 2000 sel PCE yang bertujuan untuk memperbesar peluang mikronukleus yang terhitung. Hal tersebut didasarkan pada penelitian Maidona (2003: 29) yang menunjukkan bahwa pengamatan 2000 PCE hanya mampu mendeteksi 1--2 mikronukleus pada kelompok kontrol negatif.

Mikronukleus yang teramati memiliki struktur seperti inti berukuran kecil yang berwarna kebiruan, sedangkan sitoplasma terlihat berwarna kemerahan (Gambar 4.1). May-Gruenwald merupakan pewarna yang terdiri atas metilen biru dan eosin. Teknik pewarnaan May-Gruenwald didasarkan pada prinsip asam basa. Metilen biru bersifat basa sedangkan larutan eosin bersifat asam. Sifat basa pada larutan metilen biru akan memungkinkan metilen biru berikatan dengan komponen sel yang bersifat basofilik, seperti nukleus. Sementara itu eosin merupakan pewarna yang bersifat asam, sehingga akan mengikat komponen sel yang bersifat asidofilik, seperti sitoplasma. Giemsa merupakan pewarna yang bersifat basa yaitu dengan pH 10. Fungsi pewarna Giemsa yaitu untuk memberi warna pada sel darah dengan jelas. Hal tersebut karena pewarna Giemsa mampu masuk ke dalam inti sel darah, sehingga bagian sel-sel pada darah terlihat jelas saat diamati dibawah mikroskop (Salle 1961: 71).

Hasil pengamatan mikroskopis tersebut sesuai dengan Purwadiwarsa *dkk.* (2000: 18) yang menyatakan bahwa mikronukleus merupakan kromatin sitoplasmik yang tampak sebagai inti berukuran kecil yang terbentuk dari fragmen atau patahan kromosom yang diasingkan dari nukleus pada tahap anafase. Setelah mencapai tahap telofase, fragmen kromosom yang tertinggal tetap berada pada

sitoplasma membentuk inti kecil yang disebut mikronukleus. Senyawa karsinogenik seperti kolkisin dapat mengganggu proses pembelahan sel dengan menghambat pembentukan benang spindel sehingga mengakibatkan segregasi kromosom tidak sempurna. Aberasi kromosom akibat induksi kolkisin dapat memicu pembentukan mikronukleus. Selain itu, aberasi kromosom merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya kanker. Dengan demikian, keberadaan mikronukleus dapat menjadi indikasi awal terjadinya kanker sebagai akibat dari paparan suatu senyawa karsinogenik (Sumpena *dkk.* 2009: 35).

Mekanisme pembentukan mikronukleus menurut Fenech (2007: 1084--1086) dapat terjadi akibat adanya patahan kromosom atau kromosom utuh yang tertinggal ketika tahap anafase pembelahan sel. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya kegagalan dalam pembentukan benang spindel akibat pajanan agen mutagenik. Pembentukan mikronukleus juga dapat terjadi melalui pembentukan jembatan kromatin yang menyebabkan terjadinya patahan-patahan kromosom. Terjadinya poliploidi pada sel juga merupakan salah satu cara dalam pembentukan mikronukleus. Menurut Sahu *dkk.* (1981: 72) mikronukleus juga dapat terbentuk secara alami atau tanpa adanya pengaruh pemajanan bahan-bahan mutagenik. Jumlah mikronukleus yang terbentuk secara alami yaitu sebanyak 20 per 10.540 PCE atau setara dengan 3,795 per 2000 PCE.

#### 4.2.2. Analisis Hasil Statistik Data Uji Mikronukleus

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase jumlah mikronukleus (MN) per 2000 sel eritrosit polikromatik pada KK+, KK-, KE1, KE2, KE3, dan KE4 secara berurutan yaitu 2,01%; 0,07%; 0,98%; 0,81%; 0,73%; dan 0,63% (Lampiran 6). Hasil tersebut menunjukkan bahwa KK+ memiliki persentase jumlah MN tertinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diketahui bahwa pemberian kolkisin pada KK+ dapat meningkatkan pembentukan mikronukleus sebesar 96,52% dibandingkan dengan KK-. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa kolkisin merupakan senyawa mutagenik yang dapat menyebabkan kanker. Kolkisin menghambat polimerisasi mikrotubulus dengan cara berikatan dengan

tubulin yang merupakan komponen utama mikrotubulus. Sementara itu, mikrotubulus merupakan komponen penyusun benang-benang spindel. Dengan demikian penghambatan pembentukan mikrotubulus menyebabkan benang-benang spindel tidak terbentuk sempurna, sehingga proses segregasi kromosom dalam mitosis terganggu dan menghasilkan individu poliploid (Haryanti *dkk.* 2009: 112--114; Ade & Rai 2010: 90--91).

Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis, diperoleh  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan adanya perbedaan dalam keenam kelompok perlakuan. Selain itu, terlihat adanya penurunan jumlah mikronukleus pada kelompok eksperimen (KE1, KE2, KE3, dan KE4) dibandingkan dengan KK+. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan dosis 0,33; 0,66; 0,99 dan 1,32 g/kg bb mampu menurunkan jumlah mikronukleus.

Hasil penghitungan uji mikronukleus menunjukkan bahwa persentase penurunan jumlah mikronukleus per 2000 sel PCE yang dibandingkan dengan KK+ pada KE1, KE2, KE3, dan KE4 secara berurutan yaitu 51,24%; 59,70%; 63,68%; dan 68,66% (Gambar 4.1.3(2)) (Lampiran 7). Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak kasar *H. atra* berbanding lurus dengan penurunan jumlah mikronukleus. Hal tersebut sesuai dengan Wu *dkk.* (2007: 609) dan Careaga *dkk.* (2008: 61) yang menyebutkan bahwa ekstrak teripang memiliki aktivitas antikanker.

Berdasarkan hasil uji LSD diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan antara KK+ dengan semua kelompok eksperimen lainnya (KK-; KE1; KE2, KE3; KE4). Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan berbagai dosis mampu menurunkan jumlah mikronukleus. Hasil lain menunjukkan bahwa antara KE1 dan KE2 tidak memiliki signifikansi. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan dosis 0,33 dan 0,66 g/kg bb memiliki kemampuan yang sama untuk menurunkan jumlah mikronukleus (51,24--59,70%). Hasil yang sama juga diperoleh pada KE3 dan KE4 yang tidak memiliki signifikansi. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan dosis 0,99 dan 1,32 g/kg bb memiliki kemampuan yang sama untuk menurunkan jumlah mikronukleus (63,68--68,66%). Sementara itu, terdapat perbedaan antara KE1 dengan KE3 dan KE4.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan dosis 0,99 g/kg bb (tiga kali lipat dari dosis 0,33 g/kg bb) memiliki kemampuan yang lebih tinggi dalam menurunkan jumlah mikronukleus. Namun, hasil pemberian variasi dosis ekstrak kasar tersebut belum secara optimal mampu mengurangi jumlah mikronukleus secara signifikan karena memiliki perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok KK-. Dosis ekstrak kasar *H. atra* yang optimal dapat diperoleh jika hasil uji statistik menyatakan bahwa tidak ada perbedaan nyata jumlah mikronukleus yang terbentuk antara kelompok KK- dan kelompok eksperimen. Oleh karena itu, perlu dilakukan eksperimen dengan dosis ekstrak kasar *H. atra* yang lebih tinggi untuk mencari dosis optimal yang dapat menurunkan jumlah mikronukleus secara signifikan.

#### 4.2.3. Analisis Mekanisme Penurunan Jumlah Mikronukleus oleh Ekstrak Kasar *Holothuria atra*

Triterpen glikosida yang terkandung di dalam ekstrak kasar *H. atra* diduga memegang peranan penting dalam penurunan jumlah mikronukleus. Hal tersebut karena triterpen glikosida merupakan senyawa utama dalam metabolit sekunder teripang yang memiliki aktivitas antikanker (Careaga *dkk.* 2009: 60). Triterpen glikosida dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik untuk pengobatan kanker dengan cara menghambat pertumbuhan galur sel kanker lambung MKN-45 dan galur sel kanker kolon HTC-116 secara *in vitro* (Zhang *dkk.* 2006: 813).

Penelitian Careaga *dkk.* (2009: 63) menunjukkan bahwa triterpen glikosida secara *in vitro* mampu menghambat aktivitas proliferasi galur sel tumor Hep3B, MDA-MB231, dan A549.

Triterpen glikosida memiliki efek membranotropik pada membran sel. Gugus sterol pada membran sel membentuk kompleks dengan triterpen glikosida membentuk ion channel dan menyebabkan pori-pori membran sel membesar. Efek tersebut diduga berhubungan dengan peran triterpen glikosida dalam aktivitas sitotoksik pada sel kanker. Fungsi gugus aglikon pada triterpen glikosida berhubungan dengan aktivitas membranolitik sel. Sementara itu, gugus glikosida berperan dalam aktivitas antiproliferasi (Careaga 2009: 62--67).

Selain itu, triterpen glikosida mampu menghambat pertumbuhan sel kanker melalui mekanisme penghambatan aktivitas NF- $\kappa$ B (*nucleus factor-kappa B*). Protein NF- $\kappa$ B merupakan protein transkripsi yang berperan dalam proliferasi dan penghambatan apoptosis sel. Peran NF- $\kappa$ B dalam proliferasi sel dilaporkan berasosiasi dengan kemampuan tumor untuk menginvasi jaringan sekitarnya dan bermetastasis. Sementara itu, peran NF- $\kappa$ B dalam penghambatan apoptosis sel berkorelasi terhadap pembentukan molekul antiapoptosis. Oleh karena itu, NF- $\kappa$ B menjadi target potensial dalam terapi kanker, penemuan obat antikanker, dan senyawa alami untuk menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dan mencegah proliferasi sel kanker.

Menurut Careaga *dkk.* (2009: 65) triterpen glikosida dilaporkan mampu menghambat mekanisme aktivasi protein NF- $\kappa$ B, sehingga sel tidak mampu berproliferasi dan menginduksi terjadinya apoptosis. Namun, triterpen glikosida memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi daripada efek antiproliferasi pada sel tumor. Dengan demikian, penghambatan aktivitas NF- $\kappa$ B oleh triterpen glikosida mampu menghambat pertumbuhan sel kanker melalui mekanisme apoptosis.

Berdasarkan hasil penelitian secara keseluruhan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kasar *H. atra* dengan dosis 0,33; 0,66; 0,99 dan 1,32 g/kg bb mampu menurunkan jumlah mikronukleus sehingga berpotensi sebagai obat anti kanker. Namun, belum ditemukan dosis optimal dan mekanisme pasti ekstrak kasar *H. atra* dalam mengobati sel kanker.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

Pemberian ekstrak kasar *Holothuria atra* selama tujuh hari dengan variasi dosis 0,33; 0,66; 0,99; dan 1,32 g/kg bb yang sebelumnya telah diinduksi kolkisin dengan dosis 0,66 mg/kg bb pada hari pertama, mampu menurunkan jumlah mikronukleus pada sumsum tulang femur mencit secara berurutan yaitu sebesar 51,24%; 59,70%; 63,68%; dan 68,66% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

#### **5.2. Saran**

1. Perlu dilakukan uji toksisitas lanjutan dengan rentang dosis yang lebih tinggi untuk mendapatkan dosis optimal.
2. Perlu dilakukan purifikasi triterpen glikosida dari ekstrak kasar *Holothuria atra* untuk mengetahui efek triterpen glikosida terhadap sel kanker secara *in vivo*.
3. Perlu dilakukan studi yang lebih jauh untuk mengetahui mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker oleh triterpen glikosida.

## DAFTAR REFERENSI

- Ade, R. & M.K. Rai. 2010. Review: Colchicine, current advances and future prospects. *Nusantara Bioscience* **2**(2): 90--96.
- Arnold, P. W. & R. A. Birtles. 1989. *Soft-sediment marine invertebrates of Southeast Asia and Australia: a guide to identification*. Australian Institute of Marine Science, Townsville: xxi + 272 hlm.
- Aziz, A. 1995. Beberapa catatan tentang teripang bangsa Aspidochirotida. *Oseana* **20**(4): 11--23.
- Aziz, A. 1996. Makanan dan cara makan berbagai jenis teripang. *Oseana* **21**(4): 43--59.
- Ballenger, L. 1999. *Mus musculus*: 5 hlm. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus\\_musculus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.html). 2 Oktober 2011, pk. 13.45.
- Careaga, V. P., C. Bueno, C. Muniain, L. Alche & M. S. Maier. 2008. Antiproliferative, cytotoxic and hemolytic activities of a ariterpene glycoside from *Psolus patagonicus* and its desulfated analog. *Chemotherapy* **55**: 60--68.
- Ciccheti, R., M. Bari & G. Argetin. 1999. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: in vivo study in mice. *Mutation Research* **439**: 239--248.
- Chemical Book. 2010. Holothurin A: 1 hlm. [http://www.chemicalbook.com/Search\\_EN.aspx?keyword=holothurin%20a](http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=holothurin%20a). 02 Desember 2011, pk. 10.51.
- Dahlan, M.S. 2004. *Statistika untuk kedokteran dan kesehatan: Uji hipotesis dengan menggunakan SPSS*. Arkans, Jakarta: xvi + 180 hlm.
- Dang, N.H., N.V. Thanh, P.V. Kiem, L.M. Huong, C.V. Minh & Y.H. Kim. 2007. Two new triterpene glycosides from the vietnamese sea cucumber *Holothuria scabra*. *Architecture Pharmacal Research* **30**(11): 1387--1391.
- Darsono, P. 1998. Pengenalan secara umum tentang teripang (holothurians). *Oseana* **23**(1): 1--8.

- Dewi, K.H., D. Silsia, L. Susanti, M. Markom, & H. Mendra. 2010. Ekstraksi teripang pasir (*Holothuria Scabra*) sebagai sumber testosteron pada berbagai kecepatan dan lama pengadukan. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia, Yogyakarta: 1--7.
- Elyakov, G.B, V.A. Stonik, E.V. Levina, V.P. Slanke, T.A. Kuznetsova & V.S. Levin. 1973. Glycosides of marina invertebrates – I. A comparative study of the glycoside fractions of pacific sea cucumber. *Comparative Biochemistry and Physiology* **44B**: 325--336.
- Fenech, M. 1997. The advantages and disadvantages of cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research* **392**: 11--18.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* **2**(5): 1084--1104.
- Fox, J.G., Davisson, M.T., Quimby, F.W., Barthold, S.W., Newcomer, C.E. & Smith, A.L. 2007. *The mouse in biomedical research*. Vol. 3. 2nd ed. Elsevier, San Diego: xvi + 757 hlm.
- Harriott, V., 1982. Papers from the Echinoderm Conference. 4. Sexual and asexual reproduction of *Holothuria atra* Jaeger at Heron Island Reef, Great Barrier Reef. *Australian Museum Memoir* **16**: 53--66.
- Haryanti, S., R.B. Hastuti, N. Setiari & A. Banowo. 2009. Pengaruh kolkisin terhadap pertumbuhan, ukuran sel metafase dan kandungan protein biji tanaman kacang hijau (*Vigna radiata* (L) Wilczek). *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi* **10**(2): 112--120.
- Hayes, J., A.T. Doherty, D.J. Adkins, K. Oldman & M.R. O'Donovan. 2009. The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power. *Mutagenesis* **24**(5): 419--424.
- Heddle, J.A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J.T. MacGregor, G.W. Nevvel & M.F. Salamone. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research* **123**: 61--118.
- Kamboj, M., & S. Mahajan. 2006. Micronucleus an upcoming marker of genotoxic damage. *Clinal Oral Investigations* **11**:121--126.

- Khrisna, G., G. Urda & J.C. Theiss. 1994. Comparatives mouse micronucleus in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa. *Mutation Research* **323**: 11--20.
- MacGregor, J.T., J.A. Heddle, M. Hite, B.H. Margolin, C. Ramel, M.F. Salamone, R.R. Tice & D. Wild. 1987. Guidelines of the conduct of micronuclei assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research* **189**: 103--112.
- Maidona, S. 2003. Telaah mutagenik infus rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) melalui uji mikronukleus pada sumsum tulang mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY. Skripsi Universitas Indonesia. Depok: ix + 71 hlm.
- Maier, M.S., A.J. Roccatagliata, A. Kuriss, H. Chludil, A.M. Seldes, C.A. Pujol & E.B. Damonte. 2000. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*. *Journal of Natural Product* **64**(6): 732--736.
- Matter, B.E & T. Tsuchimoto. 1980. Mutagenicity test system for the detection of chromosome aberrations *in vivo*. *Archives of Toxicology* **46**: 89--98.
- Mayer, A.M.S., K.R. Gustafson. 2008. Marine pharmacology in 2005--2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* **44** (2008) 2357--2387.
- Pechenik, J. A. 1996. *Biology of the invertebrates*. 3rd ed. McGraw-Hill Companies. Boston: xvii + 554 hlm.
- Purwadiwarsa, D. J., A. Subarnas, C. Hadiansyah & Supriyatna. 2000. Aktivitas anitumutagenik dan antioksidan daun puspa (*Schima wallichii* kort.). *Cermin Dunia Kedokteran* **2000**(127): 18--21.
- Purwati, P. 2001. Ekspresi fision dan konsekuensinya bagi populasi *fisiparus* holothuroidea (echinodermata). *Oseana* **26**(4): 33--41.
- Purwati, P. 2005. Teripang Indonesia: Komposisi jenis dan sejarah perikanan. *Oseana* **30**(2): 11--18.
- Rohani, S. 2009. Budidaya Teripang dan Prospeknya di Masa Mendatang: 4 hlm. [http://www.ubb.ac.id/fppb/?Page=artikel\\_ubb&&Nama\\_menu=&&id=37](http://www.ubb.ac.id/fppb/?Page=artikel_ubb&&Nama_menu=&&id=37)  
6. 02 Desember 2011, pk. 12.08.

- Sahu, R.K., R. Basu & A. Sharma. 1981. Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by micronucleus test. *Mutation Research* **89**: 69--74.
- Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Dalam*: Hollaender, A. (ed.). 1976. Chemical mutagen: Principles and methods for their detection. **4**: 31--52.
- Schupp, P. J. 2000. Structure elucidation, biological activity and ecology of secondary metabolites from micronesian marine invertebrates. Dissertation of Universitas Wurzburg. Jerman: viii + 202 hlm.
- Siena, K. 1996. Inventarisasi jenis-jenis teripang (Echinodermata, Holothuroidea) di rataan terumbu Pulau Penjaliran Barat, Teluk Jakarta. Skripsi Universitas Indonesia. Depok: ix + 111 hlm.
- Skillings, D. J., C. E. Bird & R. J. Toonen. 2010. Gateways to Hawai'i: Genetic population structure of the tropical sea cucumber *Holothuria atra*. *Journal of Marine Biology* **2011**: 1--16.
- Sumpena, Y., R. Sofyan, R. Rusilawati. 2009. Uji mutagenisitas benzo ( $\alpha$ ) piren dengan metode mikronukleus pada sumsum tulang mencit albino (*Mus musculus*). *Cermin Dunia Kedokteran* **36**(1): 33--36.
- Wu, J., Y. H. Yi, H. F. Tang, H. M. Wuk & Z. R. Zhou. 2007. Hillasides A and B, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria hilla* Lesson. *Journal of Asian Natural Products Research* **9**(7): 609--615.
- Zhang, S-Y., Y-H. Yi & H.F. Tang. 2006. Cytotoxic sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Pseudocolochirus violaceus*. *Chemistry & Biodiversity* **3**(2006): 807--817.

## Lampiran 1

Perhitungan dosis ekstrak kasar *Holothuria atra* untuk *Mus musculus***Tujuan:**

Mengetahui dosis ekstrak kasar *Holothuria atra* yang akan diberikan pada *Mus musculus* dalam tiap kelompok perlakuan.

**Diketahui:**

Dosis pada manusia dewasa (per 70 kg bb)	= 15--22,5 g
Faktor konversi dosis dari manusia ke <i>Mus musculus</i> (per 20 g bb)	= 0,0026
Volume maksimum pencekokan untuk <i>Mus musculus</i>	= 1 ml

**Perhitungan:**

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis ekstrak untuk } \textit{Mus musculus} &= 0,0026 \times 22500 \text{ mg} \\
 &= 58,5 \text{ mg}/20 \text{ g bb} \\
 &= 2925 \text{ mg}/\text{kg bb} \\
 &= 2,925 \text{ g}/\text{kg bb}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis ekstrak untuk } \textit{Mus musculus} &= 0,0026 \times 15000 \text{ mg} \\
 &= 39 \text{ mg}/20 \text{ g bb} \\
 &= 1950 \text{ mg}/\text{kg bb} \\
 &= 1,95 \text{ g}/\text{kg bb}
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan, rentang dosis yang digunakan menjadi 1; 2; 3 dan 4 g/kg bb. Karena keterbatasan ekstrak yang ada, dosis diubah menjadi sepertiganya yaitu 0,33; 0,66; 0,99 dan 1,32 g/kg bb.

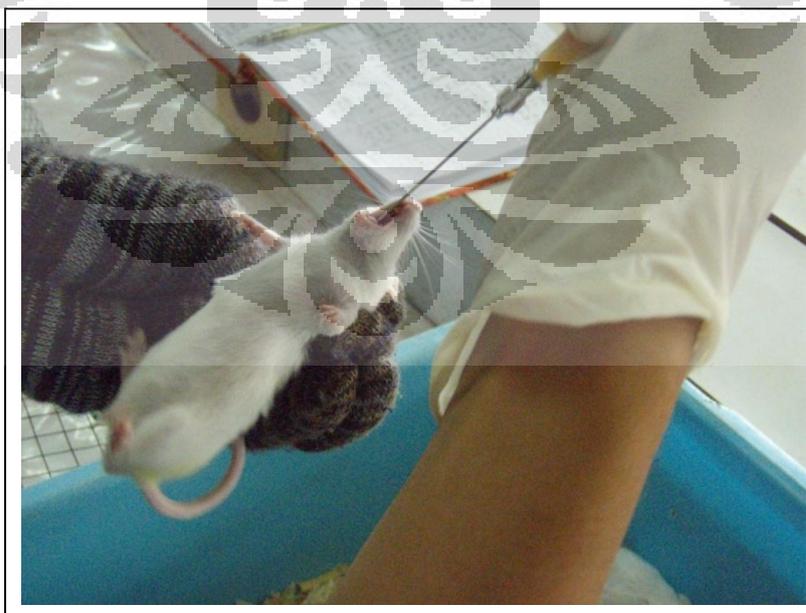
## Lampiran 2

Penyuntikan kolkisin pada mencit secara intraperitoneal



[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## Lampiran 3

Pencekohan ekstrak kasar *H. atra* pada mencit secara oral

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## Lampiran 4

Pengorbanan mencit dengan cara dislokasi vertebrae servikalis



[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## Lampiran 5

Pengambilan sumsum tulang dari tulang femur mencit



[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## Lampiran 6

Persentase mikronukleus per 2000 PCE pada tiap perlakuan

Perlakuan	Jumlah rata-rata mikronukleus	Persentase mikronukleus/2000 PCE
KK+	40,20	2,01%
KK-	1,40	0,07%
KE1	19,60	0,98%
KE2	16,20	0,81%
KE3	14,60	0,73%
KE4	12,60	0,63%

Keterangan:

KK+ : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok akuabides (10 ml/kg bb).

KK- : kelompok mencit yang dicekok akuabides (10 ml/kg bb).

KE1 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,33 g/kg bb.

KE2 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,66 g/kg bb.

KE3 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,99 g/kg bb.

KE4 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 1,32 g/kg bb.

## Lampiran 7

## Persentase penurunan mikronukleus (MN) tiap perlakuan

Perlakuan	Jumlah rata-rata MN	Selisih rata-rata MN dengan KK+	Persentase penurunan jumlah MN
KK+	40,20	0,00	0,00%
KK-	1,40	38,80	96,52%
KE1	19,60	20,60	51,24%
KE2	16,20	24,00	59,70%
KE3	14,60	25,60	63,68%
KE4	12,60	27,60	68,66%

## Keterangan:

KK+ : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok akuabides (10 ml/kg bb).

KK- : kelompok mencit yang dicekok akuabides (10 ml/kg bb).

KE1 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,33 g/kg bb.

KE2 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,66 g/kg bb.

KE3 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 0,99 g/kg bb.

KE4 : kelompok mencit yang disuntik kolkisin (0,66 mg/kg bb) dan dicekok dengan larutan ekstrak teripang dengan dosis 1,32 g/kg bb.

## Lampiran 8

## Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov

**Tujuan:**

Mengetahui kenormalan distribusi data hasil uji mikronukleus.

**Kriteria:**

Jika  $p > 0,05$  maka data memiliki distribusi data yang normal.

Jika  $p < 0,05$  maka data memiliki distribusi data yang tidak normal.

**Hasil:**

	Kelompok perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Statistic	df	Sig.
Jumlah mikronukleus	KP	.215	30	.001

**Kesimpulan:**

Nilai  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ) maka data memiliki distribusi data yang tidak normal.

Data kemudian ditransformasi dan diuji normalitas kembali.

## Lampiran 9

## Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov data transformasi

**Tujuan:**

Mengetahui kenormalan distribusi data hasil transformasi.

**Kriteria:**

Jika  $p > 0,05$  maka data memiliki distribusi data yang normal.

Jika  $p < 0,05$  maka data memiliki distribusi data yang tidak normal.

**Hasil:**

	Kelompok perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Statistic	df	Sig.
Log mikronukleus	KP	.40	30	.000

**Kesimpulan:**

Nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) maka data memiliki distribusi data yang tidak normal.

## Lampiran 10

## Hasil uji non-parametrik Kruskal-Wallis

**Tujuan:**

Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nyata pada kelompok data.

**Kriteria:**

Jika  $p > 0,05$  maka tidak ada perbedaan nyata antar kelompok data.

Jika  $p < 0,05$  maka terdapat perbedaan nyata antar kelompok data.

**Hasil:**

	Jenjang			Uji Statistik	
	Inisial	N	Mean Rank		Jumlah Mikronukleus
Jumlah Mikronukleus	KK+	5	28.00	Chi-Square	23.861
	KK-	5	3.00	df	5
	KE1	5	21.20	Asymp. Sig.	.000
	KE2	5	15.90		
	KE3	5	13.90		
	KE4	5	11.00		
	Total	30			

**Kesimpulan:**

Nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) maka terdapat perbedaan nyata antar kelompok data.

## Lampiran 11

Hasil uji Fisher's *least significance density* (LSD)**Tujuan:**

Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nyata pada tiap pasangan kelompok data.

**Kriteria:**

Jika  $p > 0,05$  maka tidak ada perbedaan nyata antar kelompok data.

Jika  $p < 0,05$  maka terdapat perbedaan nyata antar kelompok data.

**Hasil:**

Inisial (I)	Inisial (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	38.80000*	2.00167	.000	34.6688	42.9312
	3.00	20.60000*	2.00167	.000	16.4688	24.7312
	4.00	24.00000*	2.00167	.000	19.8688	28.1312
	5.00	25.60000*	2.00167	.000	21.4688	29.7312
	6.00	27.60000*	2.00167	.000	23.4688	31.7312
2.00	1.00	-38.80000*	2.00167	.000	-42.9312	-34.6688
	3.00	-18.20000*	2.00167	.000	-22.3312	-14.0688
	4.00	-14.80000*	2.00167	.000	-18.9312	-10.6688
	5.00	-13.20000*	2.00167	.000	-17.3312	-9.0688
	6.00	-11.20000*	2.00167	.000	-15.3312	-7.0688
3.00	1.00	-20.60000*	2.00167	.000	-24.7312	-16.4688
	2.00	18.20000*	2.00167	.000	14.0688	22.3312
	4.00	3.40000	2.00167	.102	-.7312	7.5312
	5.00	5.00000*	2.00167	.020	.8688	9.1312
	6.00	7.00000*	2.00167	.002	2.8688	11.1312

## Lanjutan

4.00	1.00	-24.00000*	2.00167	.000	-28.1312	-19.8688
	2.00	14.80000*	2.00167	.000	10.6688	18.9312
	3.00	-3.40000	2.00167	.102	-7.5312	.7312
	5.00	1.60000	2.00167	.432	-2.5312	5.7312
	6.00	3.60000	2.00167	.085	-.5312	7.7312
5.00	1.00	-25.60000*	2.00167	.000	-29.7312	-21.4688
	2.00	13.20000*	2.00167	.000	9.0688	17.3312
	3.00	-5.00000*	2.00167	.020	-9.1312	-.8688
	4.00	-1.60000	2.00167	.432	-5.7312	2.5312
	6.00	2.00000	2.00167	.328	-2.1312	6.1312
6.00	1.00	-27.60000*	2.00167	.000	-31.7312	-23.4688
	2.00	11.20000*	2.00167	.000	7.0688	15.3312
	3.00	-7.00000*	2.00167	.002	-11.1312	-2.8688
	4.00	-3.60000	2.00167	.085	-7.7312	.5312
	5.00	-2.00000	2.00167	.328	-6.1312	2.1312
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.						

## Lampiran 12

Data tabel hasil pengamatan jumlah mikronukleus per 2000 PCE

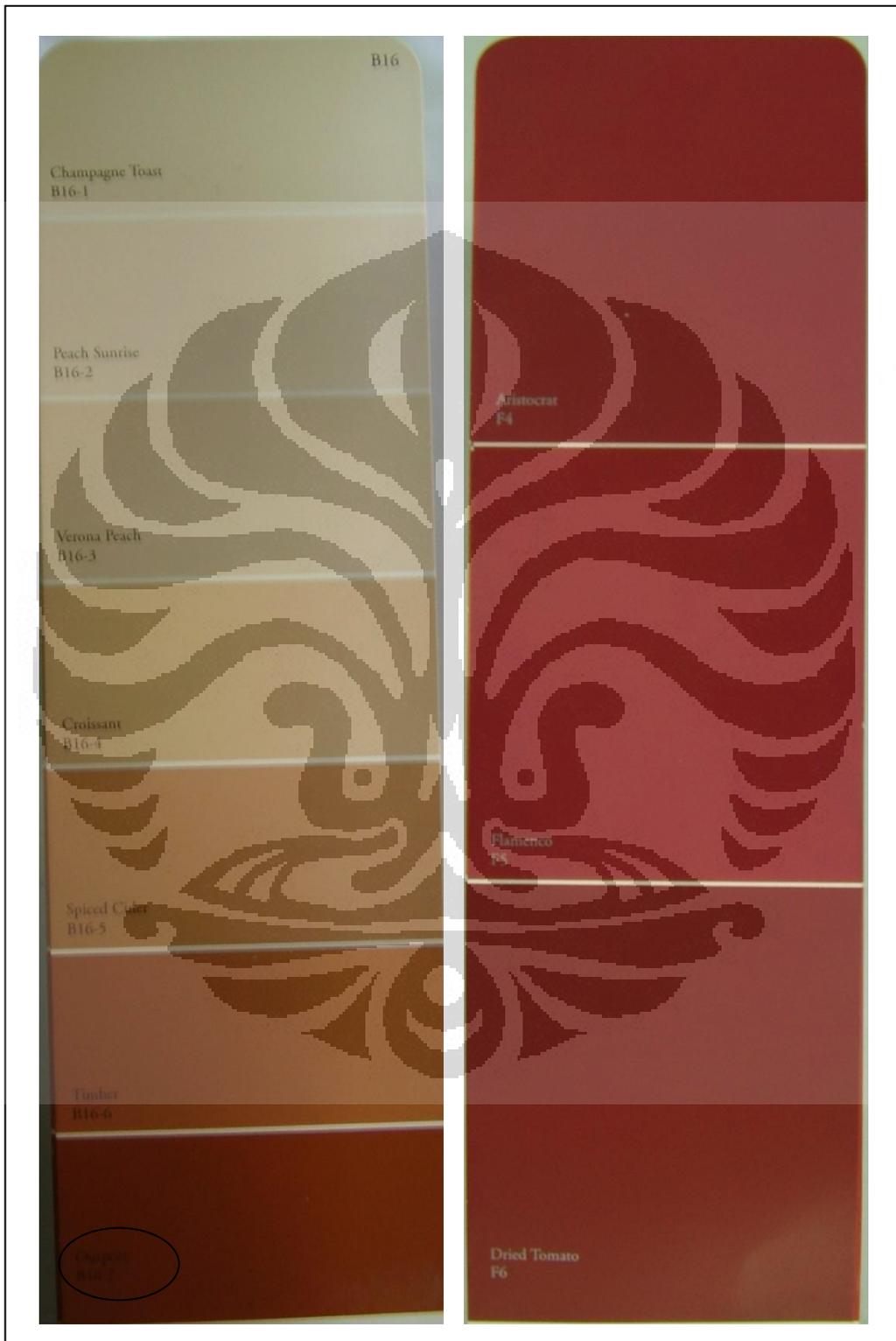
Kelompok perlakuan	Ulangan					Rata-rata	STDEV
	1	2	3	4	5		
KK+	44	40	38	38	41	40,20	2,49
KK-	2	1	2	1	1	1,40	0,55
KE1	25	16	21	18	18	19,60	3,51
KE2	13	10	18	16	24	16,20	5,31
KE3	14	15	14	12	18	14,60	2,19
KE4	9	12	16	11	15	12,60	2,88

## Lampiran 13

Data tabel hasil transformasi (*log*) jumlah mikronukleus per 2000 PCE

Kelompok perlakuan	Ulangan					Rata-rata	STDEV
	1	2	3	4	5		
KK+	1,64	1,60	1,58	1,58	1,61	1,60	0,03
KK-	0,30	0,00	0,30	0,00	0,00	0,12	0,16
KE1	1,40	1,20	1,32	1,26	1,26	1,29	0,07
KE2	1,11	1,00	1,26	1,20	1,38	1,19	0,14
KE3	1,15	1,18	1,15	1,08	1,26	1,16	0,06
KE4	0,95	1,08	1,20	1,04	1,18	1,09	0,10

Lampiran 14  
Warna ekstrak kasar berdasarkan standar warna ACE-*Paint*



[Sumber: Dokumentasi pribadi.]