

**UJI SITOTOKSIK KOMPONEN BIOAKTIF DARI
SPONGE *Pseudoceratina sp* YANG BERASAL DARI
PERAIRAN PULAU BARRANG LOMPO**



**OLEH:
ANDI ASLINDAH MAKMUR
94 03 116**



PERPUSTAKAAN FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
31-3-2001
Fah. Nijar
1 lip
01033157
13807 ✓

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2001**

SKRIPSI

OLEH:
ANDI ASLINDAH MAKMUR
94 03 116



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2001

**UJI SITOTOKSIK KOMPONEN BIOAKTIF DARI
SPONGE *Pseudoceratina sp* YANG BERASAL DARI
PERAIRAN PULAU BARRANG LOMPO**

**OLEH:
ANDI ASLINDAH MAKMUR
94 03 116**

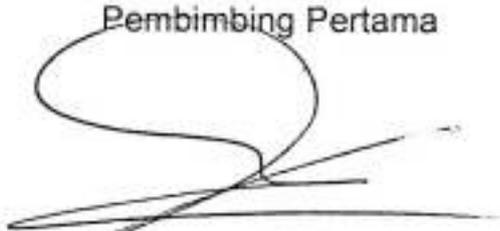
*Skripsi ini untuk melengkapi tugas akhir dan
Memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana*

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2001**

UJI SITOTOKSIK KOMPONEN BIOAKTIF DARI SPONGE
Pseudoceratina sp YANG BERASAL DARI PERAIRAN PULAU
BARRANG LOMPO

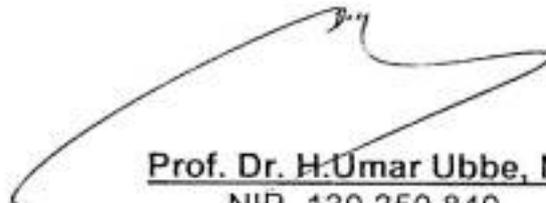
Disetujui Oleh:

Pembimbing Pertama



Drs. Damma Salama, MS.
NIP. 130 369 545

Pembimbing Utama,



Prof. Dr. H. Umar Ubbe, MS
NIP. 130 350 840

Tanggal Pengesahan: _____ Maret 2001

".....Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.

(Q.S. Alam Nasyrah : 6 – 8)

Majepu de'gaga dolangeng tenri linlangi..... (pawiscang)

.....TAK ADA SAMUDERA YANG TAK TERSEBERANGI !!

[selama ada niat dan kemauan tak ada yang susah dalam hidup]



Kudedikasikan,

Kepada Ibuku _____

Kepada Bapakku _____

Kepada Husbandku _____

Kepada Kakakku _____

Kepada Si kecil Feby _____

Yang Selalu berdoa bagi keberhasilanku _____

Semoga kudapat meraih sukses di esok hari untuk dapat kupersembahkan yang terbaik untuk kalian.

Amin _____



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkat rahmat dan hidayah-Nya-lah sehingga laporan penelitian di bidang Biokimia dalam bentuk skripsi ini dapat diselesaikan. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana Sains (strata satu) di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Dengan selesainya skripsi ini, pertama-tama penulis menyampaikan ungkapan terima kasih dan rasa hormat yang tulus kepada yang tercinta ibunda *A. Rosnani Hamid* dan Ayahanda *A. Makmur Pawiseang* atas kasih sayang, dukungan moril dan materil serta doa restu yang tiada hentinya buat penulis. Juga terima kasih yang tak terhingga kepada kakakku tersayang *Ir. A. Abd. Azis Makmur* dan yang terkasih husbandku *Ir. A. Pawennari* atas perhatian dan dukungannya yang tulus. Serta buat Ade' manjaku *A. Anugrah Fitri Sri Febriany (Febhy)*.

Tak lupa pula ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Prof. Dr. H. Umar Ubbe, MS selaku pembimbing utama dan Bapak Drs. Damma Salama, MS selaku pembimbing pertama, atas bimbingan, bantuan dan pengarahan yang diberikan sejak awal perencanaan penelitian sampai pada akhir penulisan skripsi.

2. Bapak Drs. H. Abd. Wahid Wahab, MS selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Bapak Drs. Hanapi Usman, MS (Ketua), Bapak Drs. Maming, M.Si (Sekretaris), Bapak Dr. Ir. Prastawa Budi (Anggota), selaku tim penguji ujian sarjana.
4. Seluruh staf dosen, di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
5. Ibu Dina, Ka' Anti, Ka' Eda, Ka' Misna, Ka' Fatma, Agus, dan seluruh pegawai dan analis di laboratorium di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
6. Rakhma dan Rahma Sari selaku mitra kerja atas segala motivasi, pengertian dan kerja samanya yang baik selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
7. Sahabat dan saudaraku "CITA DEWA" (Chia, Etha, Debby, Wana, Amma) atas bantuan, perhatian, dorongan serta kebersamaannya sejak penulis menuntut ilmu di Jurusan Kimia sampai selesai. *You are the best my friend*, semoga persahabatan yang telah terbina ini dapat kekal dan lebih erat lagi.
8. Sahabatku di Pondok Intan, Harda, Imo, Whandy, Rudy, Nas, Edhy, Fatma, Erni, Muhlis, Ammank, D' Kena, Intan, Ricky dan terspesial for Ka'

Icha dan Adhy yang telah dengan sabar memberikan nasehat, bantuan, semangat dan kasih sayangnya kepada penulis. *Thanks for everything.*

9. Teman-teman di Jurusan Kimia, Uke + Iyan, Uces, Dillah + BQ, Dindin, Erna, Mimid + Athy, Lolo, Evi, Usman, Yustin, Muel, Agus, Arbi, Lenynda, T, Kama serta de' Tina, Anti, Ayu, Yaya, Ira, Ophie, Erni, Wiwi, Dj, Bahja, Nuning, serta ade-ade' angkatan lain sejurusan kimia yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
10. Keluarga Om Rudi dan keluarga di Manuruki serta seluruh keluarga yang lain atas bantuan moril maupun materil yang begitu besar sampai saat ini.
11. Teman "Cibolaku" di Tello 370, Om Tat-tha, Ade' Uniezt, Abo, Ani, Icha, serta saudaraku tersayang "Uny" yang selama ini begitu setia menemani hari-hari penulis dalam banyak hal, baik itu dalam bertukar pikiran, canda, tawa, suka, duka serta telah banyak berkorban baik moril maupun materil.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan taufik-Nya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama ini. Akhir kata tak lepas dari kekurangan yang ada pada skripsi ini, segala kritik dan saran akan penulis terima dengan tangan terbuka demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya terutama buat penulis sendiri.

Makassar, Maret 2001

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan analisis komponen bioaktif sponge *Pseudoceratina sp* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan tujuan untuk menentukan komponen bioaktif dari sponge yang bersifat sitotoksik. Pada penelitian ini, *Pseudoceratina sp* diekstraksi secara maserasi dengan methanol p.a kemudian difraksinasi dengan n-heksana, etil asetat dan air. Tiap fraksi diuji toksisitasnya terhadap larva *Artemia salina* dengan waktu paparan 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi yang paling toksik adalah fraksi etil asetat dengan $LC_{50(24 \text{ jam})} = 82,61 \mu\text{g/mL}$. Pemisahan komponen bioaktif dari fraksi etil asetat secara Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dengan eluen kloroform : methanol (8 : 2) menunjukkan bahwa fraksi aktif III yang paling aktif membunuh larva udang *Artemia salina*. Selanjutnya fraksi III dianalisis dengan spektrofotometer ultraviolet memberikan panjang gelombang 254 nm. Identifikasi komponen bioaktif tersebut dengan berbagai pereaksi penampak noda pada plat Kromatografi Lapis Tipis maka diduga bahwa komponen bioaktif sponge tersebut adalah terpenoid.

ABSTRACT

A research component bioactive sponge *Pseudoceratina sp* at the Brine Shrimp *Artemia salina* Leach have been conducted with for determination component bioaktif sponge the cytotoxicities. The research, *Pseudoceratina sp* was extracted by maceration with methanol p.a and fractionation with n-hexane, ethyl acetate and water. It's fraction was tested toxicity on *Brine Shrimp Artemia salina* with 24 hours explanation, afterwards followed by determination $LC_{50(24h)}$. The result of research indicated that most toxic fraction was ethyl acetate with $LC_{50(24h)} = 82,61 \mu\text{g/mL}$. Separation of component bioactive from fraction ethyl acetate using eluent chloroform : metanol (8 : 2), by Preparation Thin Layer Chromatography showed fraction III is most active killed the *brine shrimp Artemia salina*. Analysis by spectrophotometer ultraviolet showed wave length 254 nm. Identification component bioactive with some spray reagents on plate Thin Layer Chromatography (TLC), result of the research estimated that component bioactive sponge is terpenoid.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR SIMBOL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Maksud dan Tujuan	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Uraian tentang Sponge	4
2.1.1 Klasifikasi Sponge	6
2.2 Hewan Uji yang Digunakan	8
2.3 Uraian tentang Terpenoid	10
2.4 Uji Toksisitas	12
2.5 Siklofosfamid	14
2.6 Metode Ekstraksi Bahan Alam	15

2.6.1	Tujuan Ekstraksi	15
2.6.2	Jenis-jenis Ekstraksi	16
2.6.3	Ekstraksi secara Maserasi	16
2.7	Metode Isolasi atau Pemurnian	17
2.7.1	Kromatografi Lapis Tipis.....	18
2.7.2	Kromatografi Lapis Tipis,Preparatif	20
2.8	Spektrofotometer Ultraviolet	21
BAB III	METODE PENELITIAN	23
3.1	Alat-alat yang Digunakan	23
3.2	Bahan-bahan yang Digunakan	24
3.3	Prosedur Penelitian	24
3.3.1	Pengambilan Sampel	24
3.3.1	Pengolahan dan Ekstraksi Sampel.....	25
3.3.2.1	Ekstraksi Maserasi dengan Metanol	25
3.3.2.2	Ekstraksi dengan n-heksana	25
3.3.2.3	Ekstraksi dengan Etilasetat	25
3.4	Penyiapan Larva	26
3.5	Pembuatan Sampel Uji	26
3.6	Pelaksanaan Uji	27
3.7	Pemisahan dan Pemurnian	27
3.7.1	Analisis Kromatografi Lapis Tipis	27
3.7.2	Analisis Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	28

3.8	Analisis Komponen Bioaktif	28
3.8.1	Spektrofotometer Ultraviolet	29
3.8.2	Kromatografi Lapis Tipis	29
3.9	Pengumpulan dan Analisa Data	29
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1	Hasil Penelitian	30
4.2	Pembahasan	31
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1	Kesimpulan	37
5.2	Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41

DAFTAR SIMBOL DAN ARTINYA

1. °C = Derajat Celsius
2. KLT = Kromatografi Lapis Tipis
3. KLTP = Kromatografi Lapis Tipis Preparatif
4. mL = Milliliter
5. µg = Mikrogram
6. µL = Mikroliter
7. LC₅₀ = Lethal Concentration
8. LD₅₀ = Lethal Dose
9. ED₅₀ = Effective Dose
10. mg = Milligram
11. Rf = Rate of Flow
12. v/v = Volume per volume
13. UV = Ultraviolet
14. % = Persen
15. p.a = Pro analisis
16. pH = Power of Hidrogen
17. cm = Centimeter

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kromatografi Lapis Tipis	19
2. Bentuk Noda KLT	20
3. Grafik Nilai $LC_{50(24 \text{ jam})}$ dan Jumlah Rata-rata Larva Udang yang Mati Terhadap Beberapa Sampel Uji	34

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ dan Jumlah Rata-rata Larva Udang yang Mati Terhadap Beberapa Sampel Uji	33
2. Hasil Uji Sitotoksik Fraksi Etil Asetat dari KLT Preparatif Terhadap Udang <i>Artemia salina</i> , dengan waktu pemaparan 24 jam	35
3. Warna Noda Fraksi III dengan Berbagai Pereaksi Semprot di atas Pelat KLT	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Maserasi Sponge	41
2. Bagan Pemisahan Fraksi Aktif Komponen Bioaktif Sponge	42
3. Bagan Produser Uji Toksisitas	43
4. a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ Siklofosfamid (pembanding positif) Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	44
4. b. Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Prosentasi Kematian (probit) Siklofosfamid (pembanding positif)	45
5. a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ Ekstrak Metanol Sponge <i>Pseudoceratina sp</i> Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	46
5. b. Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Prosentasi (probit) Ekstrak Metanol Sponge <i>Pseudoceratina sp</i>	47
6. a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ Ekstrak n-heksana Sponge <i>Pseudoceratina sp</i> Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	48
6. b. Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Prosentasi (probit) Ekstrak n-heksana Sponge <i>Pseudoceratina sp</i>	49
7. a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ Ekstrak Etilasetat Sponge <i>Pseudoceratina sp</i> Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	50
7. b. Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Prosentase Kematian (probit) Ekstrak Etilasetat Sponge <i>Pseudoceratina sp</i>	51

8. a. Perhitungan LC50(24 jam) Fraksi Air Sponge Pseudoceratina sp Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi 52	
8. b. Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Prosentase Kematian (probit) Fraksi Air Sponge <i>Pseudoceratina sp</i>	53
9. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol	54
10. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Etilasetat	55
11. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dari Fraksi Etilasetat	56
12. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Aktif III Dari Hasil KLT Preparatif	57
13. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Aktif III dengan Berbagai Pereaksi Penampak Noda.....	58
14. Data Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach Setelah 24 jam Perlakuan Dengan Masing- masing Ekstrak Sponge <i>Pseudoceratina sp</i>	59
15. Siklus Hidup <i>Artemia salina</i> Leach	60
16. Harga Probit Sesuai Dengan Prosentasenya	61
17. Foto Sponge <i>Pseudoceratina sp</i>	62

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di daerah tropis seperti Indonesia mempunyai keanekaragaman hayati baik di darat maupun di laut yang sangat berlimpah. Namun selama ini penelitian lebih banyak diarahkan pada sumber alam yang ada di darat, mengingat lebih mudah memperolehnya dibanding yang ada di laut. Padahal keanekaragaman yang ada di laut yang belum dieksplorasi merupakan sumber yang potensial untuk diteliti. Sumber daya laut yang jumlahnya sangat beragam ini terdiri dari flora dan fauna seperti alga, sponge, karang lunak, moluska, ikan, lamun dan lain-lain yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber penghidupan masyarakat.

Prospek pemanfaatan sumber daya hayati laut di samping dapat memenuhi kebutuhan pangan juga banyak mendapat perhatian para ahli yang akhir-akhir ini penelitian lebih banyak diarahkan dengan mengisolasi dari bahan alam untuk mencari senyawa bioaktif dari organisme laut untuk mengatasi berbagai penyakit infeksi dan non infeksi yang disebabkan oleh kelainan fisiologi atau kelainan fungsi organ. Banyak senyawa bioaktif dari organisme laut yang diketahui mempunyai aktivitas antibakteri, antivirus, antijamur, atau sitotoksik (cytotoxic) yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antitumor atau kanker. (Sudiro, 1995).



Suatu laporan hasil penelitian bahan alam laut 1977-1989 menyatakan bahwa dari 632 senyawa yang berhasil diisolasi terdapat 220 senyawa berasal dari sponge (Faulkner, D.J., 1991). Selain itu, suatu laporan mengenai senyawa antitumor dan sitotoksik dari 1986-1991 menyebutkan bahwa metabolit dari sponge merupakan senyawa yang potensial dalam penelitian obat antikanker (Schmitz, F.J.; et al, 1993). Sebab dari 434 senyawa dari semua bahan alam laut yang sitotoksik terdapat 45% berasal dari sponge.

Penyakit kanker makin dikenal sebagai salah satu ancaman terbesar bagi kesehatan dan diperkirakan bahwa 60% dari semua penyebab kanker adalah dikarenakan infeksi virus. Walaupun banyak usaha yang dilakukan oleh penderita untuk mengobati penyakit tersebut, namun hingga saat ini belum ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan. Oleh karena itu masih dicari obat yang efektif untuk mengobati penyakit kanker, termasuk obat dari bahan alam laut.

Dari uraian di atas maka perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengidentifikasi sponge *Pseudoceratina sp* yang diperoleh dari pulau Barrang Lompo yang diduga mengandung suatu senyawa bioaktif terpenoid yang bersifat sitotoksik dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji yang nantinya dapat dikembangkan sebagai sumber baru obat antitumor/kanker.

1.2 Maksud dan Tujuan

1.2.1 Maksud

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui komponen bioaktif sponge yang bersifat sitotoksik.

1.2.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan LC_{50} komponen bioaktif sponge yang bersifat sitotoksik.

1.3 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dihasilkan komponen bioaktif yang efektif sebagai sitotoksik dan dapat memberikan informasi baru dalam usaha memanfaatkan sponge sebagai sumber bahan baku obat antitumor/kanker.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Uraian tentang Sponge

Sponge merupakan biota laut yang termasuk dalam golongan invertebrata yang hidup dalam ekosistem terumbu karang. Sponge merupakan nama umum sekelompok biota dari filum porifera dengan bentuk badan membulat, merumpun pada arus kuat dan membentuk percabangan pada arus lemah.

Sponge terdiri dari sekumpulan sel yang sangat sederhana yang tidak mempunyai jaringan sejati atau organ. Struktur sponge terdiri dari flagella dan sel lengkung. Semua sponge hidup di air dan melekat pada batu, kerangka atau benda padat, beberapa di antaranya hidup di atas pasir halus dan dasar lumpur. Sebagian besar spesiesnya hidup di laut mulai dari garis pasang sampai kedalaman 7,3 km.

Hewan berpori ini hidup dengan memanfaatkan makanan di sekelilingnya dengan cara mengisap dan menyaring sehingga dikategorikan sebagai "*filter feeder*". Sponge mempunyai semacam perisai yang serupa susunan spikula yang berbentuk seperti duri atau jarum dengan ujung runcing. Spikula ini berbentuk dari senyawa silika dan kalsium karbonat. Sponge memproduksi senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang bermanfaat dalam proses pencernaan secara enzimatik, terutama untuk

mencerna bakteri sebagai sumber nutrisi baginya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh sponge tidak hanya bermanfaat untuk proses pencernaan makanan dan tetapi kandungan kimianya juga dapat menyangkal dan menghambat pertumbuhan patogen pengganggu.

Sistem reproduksi sponge terjadi secara seksual dan aseksual. Pada reproduksi seksual, hewan ini membutuhkan air yang mengalir untuk membantu pertemuan sperma dan sel telur, sedangkan secara aseksual umumnya dengan fragmentasi, di mana potongan-potongan dari sponge yang patah dapat hidup dengan cadangan makanan yang ada di tubuhnya. Kemudian beregenerasi membentuk tunas baru.

Pada umumnya sponge berwarna putih, kuning, merah, atau ungu tergantung dari intensitas cahaya yang diterimanya.

Bioaktif sponge diduga mengandung peptida, terpenoid, glikosida, saponin, steroid, amina, asam fenolat, dan squalen serta turunan-turunannya yang merupakan hasil metabolisme sekunder. Suatu laporan mengenai senyawa anti tumor dan sitotoksik dari 1986 – 1991 menyebutkan bahwa metabolit dari sponge merupakan senyawa yang potensial dalam penelitian obat anti kanker (Ischmitz, F. J.; et. al, 1993). Dalam jangka waktu tersebut telah diisolasi sekitar 434 senyawa sitotoksik dari bahan alam laut. Dari jumlah tersebut terdapat 193 senyawa yang berasal dari metabolit sponge atau sekitar 45 % dari jumlah senyawa sitotoksik dari bahan laut. Sponge

yang telah berhasil diisolasi mengandung sterol yang telah diidentifikasi dari sponge seperti *clionasterol*, *poritersterol*, dan *chendrillasterol*.

Beberapa jenis sponge yang dilaporkan memiliki bioaktif antara lain *Hyxatella intestinalis* (Karuso et. al., 1989), *Alqilus flabellifynus* (Gunasekara et. al., 1989), *Hippospongia communis*, *Spongia afficinalis*, *Ireinia vibrabilis*, *Spongia gracillis* (Madaio et. al., 1989) dan *Dysidea avara* yang dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi untuk pengobatan penyakit pada manusia dan hewan seperti obat anti tumor, anti jamur, antivirus, dan anti bakteri.

2. 1. 1 Klasifikasi Sponge

Martyn (1989) mengklasifikasikan sponge sebagai berikut:

a. Berdasarkan bahan dasar pembentuk spikulanya:

1. Kelas Calcarea

Bangsa : Hemocoela

- Lapisan dalam sel-sel berflagella berkesinambungan

Jenis : *Leucosoleina*

Bangsa : Heterococla

- Sel-sel berflagella berada dalam bintik-bintik

Jenis : *Sycon* – *Granfia*

2. Kelas Hexaactinellid

Bangsa : Hexasterflora

- Mempunyai heksaster (spikula dengan jurus bercabang) tidak mempunyai amphidic (spikula dengan poros tunggal) dengan ujung-ujung seperti jamur payung.

Jenis : *Eupletella*

b. Berdasarkan tipe rangkanya:

1. Kelas Calcarea

Spesies yang termasuk dalam kelas ini mempunyai spikula yang terdiri dari kalsium karbonat. Mempunyai tinggi kurang dari 10 cm dan umumnya hidup di laut.

2. Kelas Hexactinellida

Kelas ini umumnya dikenal dengan sponge kaca, karena mempunyai kerangka yang terdiri dari spikula-spikula silika. Tingginya rata-rata 10 – 30 cm, dan semua spesies dalam kelas ini hidup di laut terutama di perairan laut dalam.

3. Kelas Demospongiae

Kelas ini meliputi lebih dari 90 % dari semua spesies sponge yang ada, mempunyai kerangka dari spikula yang mengandung silika atau sponging maupun campuran keduanya.

Tinggi serta diameter dapat mencapai lebih dari 1 meter dan mempunyai warna yang cemerlang. Sebagian besar hidup di laut dan sedikit di air tawar.

4. Kelas Sclerospongiae

Kelas ini mempunyai jumlah spesies yang sangat sedikit, terutama ditemukan dalam gua dan terowongan karang laut. Bentuknya mirip dengan Demospongiae, akan tetapi kerangkanya terdiri dari serabut-serabut sponging dan spikula silika.

2.2 Hewan Uji yang Digunakan

2.2.1 Udang *Artemia salina*

a. Klasifikasi

- Filum : Arthropoda
- Kelas : Crustacea
- Subkelas : Branchiopoda
- Bangsa : Anostraca
- Suku : Artimiidae
- Marga : Artemia
- Jenis : *Artemia salina* Leach

b. Sifat dan Morfologi

Udang *Artemia salina* adalah suatu binatang yang mempunyai kulit keras, hidup dalam air mulai dari air payau sampai yang berkadar garam tinggi, range toleransi kadar garam yang luas (dari 10 sampai 220 g/L) sehingga menyebabkan hewan ini mudah dipelihara dan dipelajari.

Artemia Salina mengalami beberapa tingkatan hidup tetapi secara jelas dapat dilihat dalam tiga bentuk yang sangat berlainan, yaitu bentuk telur, nauplius, (larva) dan *Artemia* dewasa. Telur yang baru dipanen dari alam berbentuk bulat dengan ukuran 0,2 – 0,3 mm. Telur yang menetas akan berubah menjadi nauplius. Nauplius yang baru menetas ini berukuran \pm 300 mikron.

Di antara antenula terdapat bintik merah yang disebut oselus yang berfungsi sebagai mata nauplius. Dalam pertumbuhannya nauplius mengalami 15 kali perubahan bentuk yang merupakan satu tingkatan hidup. Setelah itu berubah menjadi *Artemia* dewasa. Waktu yang diperlukan sampai menjadi dewasa umumnya sekitar 2 – 3 minggu.

Artemia dewasa berbentuk silinder dengan panjang 12 – 15 mm. Tubuh terbagi atas bagian kepala, dada, dan perut. Pada bagian kepala terdapat 2 tangkai mata, 2 antena, dan 2 antenula. Dada terbagi atas 12 segmen yang masing-masing mempunyai sepasang kaki renang. Perut terbagi atas 8 segmen. *Artemia* dapat hidup pada air laut dengan salinitas 10 – 220 per mil dengan suhu 25 – 30 °C dengan pH berkisar antara 7,3 sampai 8,4. *Artemia* dapat tumbuh cepat pada perairan dengan salinitas yang masih layak bagi kehidupan organisme karnivora. Namun demikian *Artemia* mempunyai mekanisme pertahanan ekologi yang sangat

efisien melalui adaptasi fisiologik terhadap media bersalinitas tinggi di mana predator tidak dapat hidup.

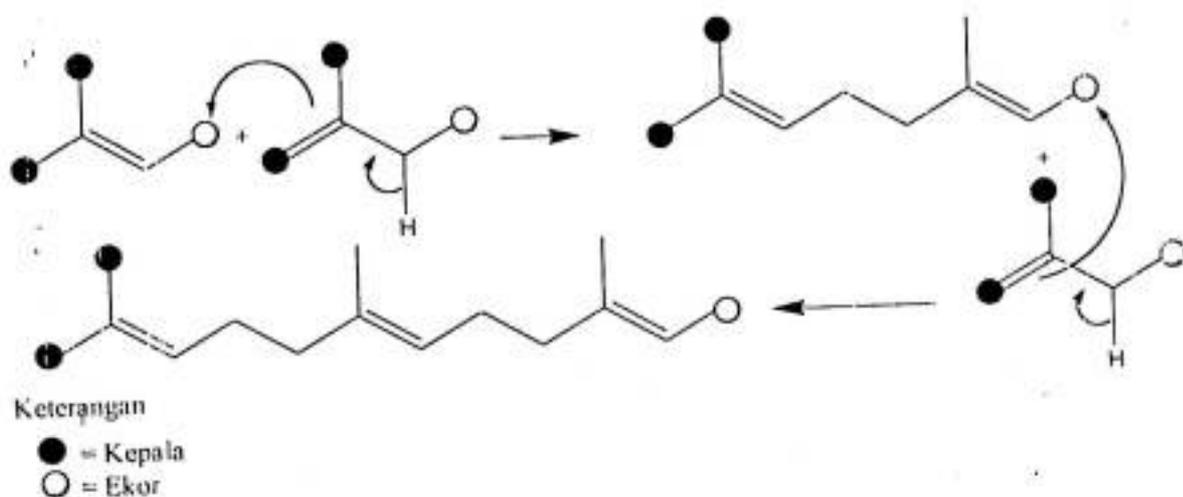
Artemia dikenal mempunyai 2 macam cara reproduksi yaitu secara avovipar di mana telur yang telah dibuahi menetas menjadi nauplius dan kemudian dilepas oleh induknya di dalam air. Cara lainnya adalah ovipar yaitu telur yang telah mencapai stadium gastrula yang terbungkus dengan kulit luar yang relatif tebal dikeluarkan oleh induknya dalam bentuk kista atau telur. Pergantian reproduksi ini dimungkinkan oleh jumlah klorofil dalam makanannya dan faktor oksigen dalam lingkungannya, konsentrasi oksigen yang rendah dan klorofil yang tinggi dalam makanannya menyebabkan reproduksi dengan telur dan sebaliknya akan menyebabkan reproduksi dengan melahirkan anak.

2.3 Uraian Tentang Terpenoid

Terpen merupakan suatu kelompok senyawa kimia dari golongan hidrokarbon organik yang banyak tersebar secara meluas dalam makhluk hidup, banyak di antaranya telah diisolasi dan diketahui mempunyai manfaat fisiologis maupun manfaat farmakologis. Senyawa ini umumnya ditemukan dalam minyak esensial atau minyak atsiri dan tumbuh-tumbuhan yang berdaun halus seperti skaliptus atau dalam bentuk terpenin dari sebangsa pinus, damar, karet dan sebagainya. Senyawa ini berbau harum dan sering

digunakan dalam industri farmasi terutama dalam pembuatan obat-obat antibiotika, anti jamur dan anti tumor.

Meskipun senyawa-senyawa terpen terdapat dalam jumlah yang sangat besar dengan berbagai struktur yang berbeda, senyawa-senyawa ini dapat didefinisikan sebagai suatu kelompok senyawa bahan alam yang strukturnya dapat dipilah-pilah menjadi unit isopren. Penyelidikan yang lebih seksama mengenai struktur molekul terpenoid telah mengungkapkan betapa unit-unit isoprene tersebut saling berkaitan secara teratur, di mana "kepala" dari unit yang satu berkaitan dengan ekor dari unit yang lain.



Berdasarkan jumlah atom karbonnya dan jumlah satuan isopren penyusunnya maka terpenoid dikelompokkan sebagai berikut: Homoterpen (C_5), Monoterpen (C_{10}), Seskiterpen (C_{15}), Diterpen (C_{20}), Triterpen (C_{30}), Tetraterpen (C_{40}), Polyterpen ($C > 40$). Masing-masing golongan terpenoid itu penting, baik pada pertumbuhan dan metabolisme maupun pada ekologi tumbuhan.

J. W. Cornforth (1959) melakukan suatu penelitian dalam usaha menemukan senyawa isoprene biologis yang digunakan oleh organisme dalam sintesa terpenoid. Selanjutnya Cornforth menemukan dua bentuk isopren yang aktif, yakni isopentenil pirofosfat (IPP) dan dimetilalil pirofosfat (DMAPP). Kedua isopren aktif ini harus ada untuk keperluan sintesa terpenoid oleh organisme.

Secara kimia, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat di dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpenoid diekstraksi dari jaringan tumbuhan dengan memakai eter minyak bumi, eter atau kloroform, dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada silika gel atau alumina dengan memakai pelarut tersebut.

2.4 Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah efek berbahaya dari suatu bahan kimia atau suatu bahan obat pada organ target. Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dan keberbahayaan zat yang diuji. Adapun sumber zat toksis dapat berasal dari alam ataupun dari bahan industri. Setiap zat kimia pada dasarnya bersifat racun ditentukan oleh dosis dan cara pemberian. Paracelsus (1954) telah meletakkan dasar penilaian toksikologi dengan menyatakan bahwa dosis menentukan apakah suatu zat kimia bersifat racun atau tidak.

Toksisitas diukur dengan mengamati kematian hewan percobaan, kematian dari hewan percobaan dianggap sebagai respon dari pengaruh

senyawa yang diuji. Sehingga hubungan dari respon dengan menggunakan kematian sebagai jawaban adalah merupakan titik awal untuk mempelajari toksisitas.

Angka kematian hewan percobaan dihitung sebagai Lethal Dose (LD_{50}) atau Median Lethal Concentration (LC_{50}). Penggunaan LC_{50} dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan uji secara inhalasi atau menggunakan media air. Kematian pada hewan percobaan digunakan sebagai pedoman untuk memperkirakan dosis kematian pada manusia.

Pengertian yang sederhana untuk LD_{50} adalah dosis dari suatu senyawa yang dapat menyebabkan 50 % kematian hewan uji. Pengertian yang tepat adalah dosis tunggal yang diperoleh secara sitotoksik dari suatu bahan yang dapat menyebabkan 50 % kematian hewan uji. Nilai LD_{50} yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan tingkat toksisitas suatu bahan kimia dan menentukan indeks terapinya yaitu dengan membagi LD_{50} dengan ED_{50} . Dosis tunggal yang diperoleh secara statistik yang dapat menimbulkan efek yang diharapkan pada 50% hewan percobaan disebut Median Effective Dose (ED_{50}). Makin tinggi indeks terapinya maka makin besar batas keamanan suatu obat atau bahan kimia tersebut. Di samping itu nilai LC_{50} yang dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksis suatu senyawa sehingga dapat juga untuk memprediksi potensinya sebagai antikanker yang umumnya bersifat sitotoksik.

Salah satu efek toksik yang berkaitan dengan potensi bioaktif suatu bahan sebagai anti kanker adalah dengan menggunakan metode "*Brine Shrimp Lethality Test*" yang menggunakan larva udang sebagai hewan sebagai hewan uji dengan keuntungan hasil yang diperoleh lebih cepat (24 jam), tidak mahal, mudah pengerjaannya.

Efek toksik dapat diketahui atau diukur dari kematian larva karena pengaruh bahan yang diuji, hewan yang digunakan adalah *Artemia salina* yang merupakan udang-udang primitif, sederhana dan efektif dalam ilmu biologi dan toksilogi.

Pengujian efek toksik dengan larva udang *Artemia salina* di hitung dengan metode LC_{50} yang mana kematian setelah 6 jam pemaparan dimasukkan ke dalam kategori LC_{50} akut dan pemaparan setelah 24 jam digolongkan LC_{50} kronis, dan dalam pengerjaan biasanya digunakan perhitungan LC_{50} setelah 24 jam mengingat kelarutan ekstrak yang sukar larut membutuhkan waktu yang lebih panjang. Penunjukan efek toksik yang dihasilkan memberikan indikasi terganggunya proses pembentukan sel, dan dalam hal ini diasumsikan sebagai sel kanker. Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan mekanisme pengatur multipikasi oleh fungsi homeostatis lainnya pada organ multi seluler.

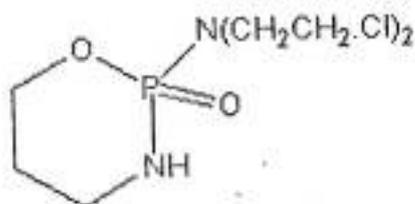
2.5 Siklofosfamid

Nama lain : N,N - bis (2 - chloroethyl) tetrahydro - 2H - 1, 3, 2 -oxaza phosphorin - 2 - amine - 2 - oxide, cytoxan, Endoxan, Procytox, Sendoxan, Neosar.

Rumus bangun : $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$

Berat molekul : 261,10

Rumus bangun :



Pemerian : bentuk monohidrat

Titik lebur : 41 - 45 °C

Kelarutan : 40 g/L dalam air, agak larut dalam alkohol, benzen, etilenglikol, kloroform, dioksan, eter dan aseton.

Khasiat terapi : sebagai anti kanker yang bersifat alkilator, yang mana bereaksi dengan cara yang sedemikian rupa sehingga gugus alkilnya tersubstitusi berikatan secara kovalen dengan konstituen seluler.

Siklofosfamid merupakan salah satu alkilator yang paling banyak digunakan, umumnya dalam bentuk monohidrat. Obat ini merupakan obat non spesifikasi terhadap siklus sel. Berbagai alkilator menunjukkan cara kerja yang sama yaitu melalui pembentukan intermediet yang sangat reaktif

yang selanjutnya membentuk ikatan kovalen (alkilasi) dengan berbagai nukleofilik penting tubuh misalnya fosfat, amino, sulfhidrat, hidroksil, karboksil atau gugus emidazol. Efek sitotoksik maupun efek sampingnya berhubungan dengan gugus yang terjadi alkilasi DNA ini.

2.6 Metode Ekstraksi Bahan Alam

2.6.1 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam sampel. Proses ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen-komponen kimia yang terdapat dalam simplisia ke dalam cairan penyari. Di mana cairan penyari akan menembus lapisan permukaan dinding sel sampai terjadi perubahan tekanan antara di luar dan di dalam sel yang menyebabkan terjadinya proses penyarian (Suryawira, 1992).

2.6.2 Jenis-jenis Ekstraksi

Jenis-jenis ekstraksi yang sering digunakan adalah ekstraksi secara panas dan ekstraksi secara dingin. Ekstraksi secara panas dilakukan dengan metode refluks, soxhlet dan destilasi uap air, sedangkan ekstraksi secara dingin dilakukan dengan metode maserasi dan perkolasi. Umumnya cara yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa alam bioaktif adalah dengan ekstraksi secara dingin, karena senyawa-senyawa alam bioaktif tersebut umumnya bersifat kurang stabil terhadap panas. (Sutaryadi *et, al.*, 1981)

2.6.3 Ekstraksi Secara Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam simplisia ke dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat aktif di dalam sel dan di luar sel, maka larutan yang berdekatan didesak keluar. Peristiwa tersebut akan terulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan yang di luar dan larutan di dalam sel. Metode maserasi merupakan proses ekstraksi secara dingin yang pada prinsipnya tidak memerlukan pemanasan.

Ekstraksi secara maserasi dilakukan dengan menempatkan simplisia di dalam wadah tertutup dan ditambahkan dengan pelarut yang cocok, perendaman dilakukan berulang kali sampai pelarut sudah jernih. Pelarut yang sering digunakan dalam maserasi adalah metanol atau etanol, karena pelarut ini dapat melarutkan komponen polar dan non polar, atau dapat pula menggunakan pelarut lain yang sesuai dengan komponen yang ingin diambil.

2.7 Metode Isolasi atau Pemurnian

Isolasi adalah proses pemisahan komponen kimia yang terdapat dalam suatu ekstrak. Pemisahan ini didasarkan atas sifat absorpsi dan partisi dari setiap senyawa yang dipisahkan terhadap absorban yang merupakan cairan penyari tertentu. Isolasi biasanya dilakukan dengan cara ekstraksi, fraksinasi dan pemisahan secara kromatografi. Fraksinasi dilakukan untuk

memisahkan senyawa berdasarkan kepolaran yang disesuaikan dengan kelarutan senyawa tersebut. Pemurnian yang dilakukan dengan kromatografi dan kristalisasi. Pemisahan terjadi karena komponen cuplikan yang dalam jarak berbeda disebabkan oleh perbedaan partisi dari cuplikan yang dipisahkan. Pemisahan dan pemurnian komponen terjadi karena adanya perbedaan distribusi di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Sebagai penyerap berpori digunakan aluminium oksida, silica gel dan selulosa dan harse sintetik. Kromatografi kertas dan KLT pada umumnya digunakan untuk identifikasi karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk memisahkan komponen dalam jumlah yang sedikit. Sedangkan kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan komponen dalam jumlah banyak. Teknik kromatografi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi lapis tipis dan kromatografi lapis tipis preparatif.

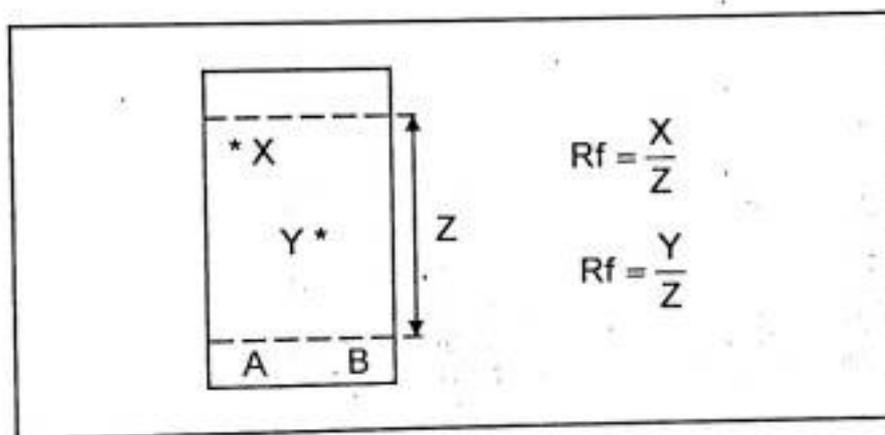
2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu kromatografi yang sederhana dan banyak digunakan untuk memisahkan komponen secara cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi.

Kromatografi ini menggunakan lempeng kaca atau aluminium yang dilapisi penyerap dengan ketebalan antara 0,1 – 0,25 mm. Lempeng kaca ini dianggap sebagai kromatografi kolom terbuka yang pemisahannya didasarkan pada penyerapan, pembagian atau keduanya. Perpindahan komponen suatu senyawa pada kromatografi ini tergantung dari jenis pelarut,

zat penyerap dan sifat daya serap penyerap terhadap masing-masing komponen. Komponen yang larut terbawa oleh fase gerak melalui penyerap sebagai fase diam dengan kecepatan yang berbeda-beda. Kecepatan bergerak pada permukaan penyerap dari pelarut inilah yang merupakan dasar untuk mengidentifikasi komponen-komponen yang dipisahkan. Perbandingan kecepatan ini disebut dengan *rate of flow* (R_f), yaitu perbandingan antara jarak yang ditempuh oleh cairan pengelusi yang dapat dituliskan dengan persamaan:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terelusi}}{\text{Jarak yang ditempuh senyawa pengelusi}}$$



Gambar1. Kromatografi Lapis Tipis

Beberapa faktor yang mempengaruhi harga R_f , antara lain:

1. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
2. Ukuran partikel penyerap
3. Derajat keaktifan lapisan penyerap
4. Tebal dan kerataan dari lapisan penyerap

5. Kemurnian dan konsentrasi pelarut
6. Kejenuhan ruang elusi
7. Ketelitian pengamatan
8. Terdapatnya pengotoran pada ekstrak
9. Jumlah cuplikan yang digunakan

Selain nilai R_f , bentuk noda memberikan keterangan tentang keadaan pemisahan yang dilaksanakan. Penotolan cuplikan dalam jumlah yang berlebih memberikan tendensi penyebaran noda-noda dengan kemungkinan terbentuknya ekor. Pada umumnya ada 7 tipe bentuk noda seperti dalam gambar berikut:



Gambar 2. Bentuk noda KLT

Keterangan:

- A : Normal, ideal
- B : Kecepatan elusi tinggi
- C : Kecepatan elusi rendah
- D : - Contoh terlalu kental
- KLT terlalu tebal
- Contoh mengalami reaksi
- E : Lapisan tidak homogen
- F : Ada pelarut yang tersisa (waktu penotolan)
- G : pelarut (eluen) tidak cocok

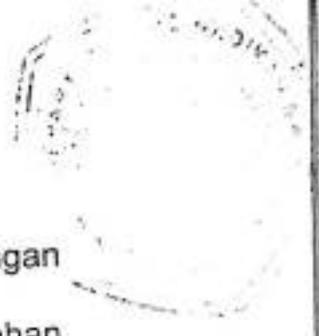
2.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Salah satu metode pemisahan yang memerlukan pembiayaan yang murah dan juga memakai peralatan yang sederhana. Walaupun KLT preparatif dapat memisahkan bahan dalam jumlah gram, namun sebagian pemakaiannya hanya dalam jumlah milligram.

Pemisahan komponen kimia dengan metode KLT preparatif pada dasarnya sama dengan prinsip KLT biasa yaitu berdasarkan pada prinsip absorpsi dan partisi.

Namun perbedaan yang nyata, pada KLT Preparatif menggunakan lempeng yang besar dengan ukuran 20 x 20 cm dan sampel ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi lempeng tersebut. Lempeng yang sudah ditotolkan, dikembangkan pada *chamber* yang sudah dijenuhkan dengan cawan pengembang yang cocok secara tegak lurus dengan komponen kimia akan terpisah membentuk pita-pita berupa garis horizontal yang tampak dibawa sinar ultraviolet.

Pita yang tampak dengan lampu ultraviolet yang diharapkan mengandung senyawa murni kemudian dikerok dari plat kaca dengan spatula, silet atau pengaduk karet pipih ditampung pada lembaran logam tipis. Kemudian hasil kerokan ditempatkan dalam corong kaca yang telah diberi kertas saring, lalu didekantasi beberapa kali dengan pelarut yang cocok. (Hostetmannk,1995).



Pemilihan sistem pelarut untuk memisahkan suatu campuran dengan KLT Preparatif didasarkan atas studi sistematis analisis pemisahan campuran dengan KLT .

2.8 Spektrofotometer Ultraviolet

Spektrum UV disebut juga spektrum elektronik, karena terjadi sebagai hasil interaksi radiasi UV terhadap molekul yang mengakibatkan molekul tersebut mengalami transisi elektronik. Informasi yang diperoleh antara lain adalah adanya gugus berikatan rangkap atau terkonyugasi yang mengabsorpsi radiasi elektromagnetik di daerah UV.

Pada spektrometri UV, radiasi ultraviolet yang dipakai adalah radiasi ultraviolet dekat : 200 – 380 nm. Sedangkan ultraviolet jauh : 100 – 190 nm tidak dipakai sebab radiasi ultraviolet jauh diabsorpsi oleh udara, sehingga diperlukan kondisi tanpa udara bila dikehendaki pengukuran di daerah ultraviolet jauh. Spektrum ultraviolet adalah suatu gambaran antara panjang gelombang atau frekuensi radiasi terhadap intensitas absorpsi.

Pelarut yang dipakai spektrometri UV harus memenuhi persyaratan, yaitu tidak mengabsorpsi radiasi pada panjang gelombang pengukuran sampel. Oleh sebab itu pelarut harus tidak mengandung sistem terkonyugasi, pada struktur molekulnya, tidak berinteraksi dengan molekul senyawa yang diukur dan harus mempunyai kemurnian yang tinggi.

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Alat-Alat yang Digunakan

1. Blender 250 mL National
2. Bejana maserasi
3. Gelas ukur 100 mL (Pyrex)
4. Erlenmeyer 250 mL (Pyrex)
5. Corong Pisah 500 mL (Pyrex)
6. Pipet skala
7. Seperangkat alat kromatografi lapis tipis
8. Pelat KLT Preparatif
9. Rotavapor
10. Aerator
11. Corong
12. Labu ukur 50 mL (Pyrex)
13. Mikropipet 25 μ L, 250 μ L, 2500 μ L (Socorex)
14. Termometer
15. Timbangan Analitik (Sartorius)
16. Timbangan kasar (Ohaus)
17. Vial

3.2 Bahan-Bahan yang Digunakan

1. Metanol p.a
2. n-heksana p.a
3. Etil asetat p.a
4. Air suling
5. Kloroform
6. Asam sulfat pekat
7. Biakan murni *Artemia salina*
8. Air laut
9. Sponge *Pseudoceratina sp*
10. Asam sulfat 10 %
11. Vanilin – sulfat
12. Antimon (III) klorida

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

Bahan yang digunakan sebagai sampel adalah jenis sponge *Pseudoceratina sp* segar yang diambil dari perairan sekitar pulau Barrang Lompo Sulawesi selatan pada kedalaman kurang lebih 1-2 m dari permukaan laut.

3.3.2 Pengolahan dan Ekstraksi Sampel

3.3.2.1 Ekstraksi Secara Maserasi dengan Metanol

Sampel dikeringkan dengan mengangin-anginkan pada suhu kamar. Selanjutnya sampel dipotong-potong kecil lalu ditimbang 200 g, dihaluskan kemudian direndam dengan methanol sebanyak 200 mL dalam bejana maserasi. Ditutup dan dibiarkan selama 24 jam terlindung dari cahaya matahari, kemudian disaring. Ampas direndam lagi dengan metanol dan dibiarkan selama 24 jam. Penyaringan dilakukan sampai 3 kali. Ekstrak metanol yang diperoleh dipekatkan dengan alat rotavapor hingga diperoleh ekstrak kering bebas methanol. Sebagian ekstrak metanol ditimbang untuk pembuatan sampel uji. Dan sisanya kemudian diekstraksikan dengan n-heksana.

3.3.2.2 Ekstraksi dengan n-heksana

Ekstraks metanol ditambah 50 mL air kemudian diekstraksi dengan n-heksana sebanyak 50 mL dalam corong pisah. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali. Lapisan n-heksana dipisahkan dan ditampung kemudian diuapkan hingga bebas n-heksana. Kemudian ditimbang sesuai kebutuhan untuk pembuatan sampel uji.

3.3.2.3 Ekstraksi Dengan Etilasetat

Lapisan air dari pemisahan n-heksana diekstraksi dengan etil asetat dalam corong pisah sebanyak 50 mL yang diulang 3 kali. Lapisan etil asetat

dipisahkan dan ditampung kemudian diuapkan hingga bebas etil asetat. Kemudian ditimbang sesuai kebutuhan untuk pembuatan sampel uji. Fraksi air yang diperoleh juga diuapkan hingga kental dan ditimbang sesuai kebutuhan sebagai sampel uji.

3.4 Penyiapan Larva

Telur udang *A. Salina* sebanyak 1 gram direndam dalam wadah yang berisi air laut 1 liter pada kondisi pH 7 – 8, di bawah cahaya lampu pijar 60 watt dan pada suhu kamar 25 °C. Yang dilengkapi dengan aerator. Telur udang akan menetas selama 24 jam menjadi larva, dan larva udang tersebut siap diujikan.

3.5 Pembuatan Sampel Uji

Ekstrak metanol, n-heksana, etil asetat dan fraksi air sponge yang telah ditimbang dilarutkan dengan pelarutnya masing-masing, hingga diperoleh konsentrasi 2 mg/mL sebanyak 10 mL sebagai stok. Kemudian dibuat masing-masing dari stok tersebut kadar 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL dengan menggunakan mikropipet 25 µL, 250 µL, 2500 µL, lalu pelarutnya diuapkan dan ditambahkan air laut masing-masing 5 mL, sehingga konsentrasinya 10, 100, 1000 ppm. Untuk ekstrak yang tidak larut dalam air laut, sebelumnya dilarutkan dengan metanol sebanyak 1 %. Untuk kontrol positif digunakan injeksi Siklofosfamid (Neosar[®], 200 mg) dan dibuat

konsentrasi dan perlakuan yang sama dengan sampel, sedangkan untuk kontrol negatif digunakan metanol 1 %.

3.6 Pelaksanaan Uji

Larva udang *Artemia salina* dimasukkan ke dalam vial-vial yang berisi ekstrak metanol, n-heksana, etil asetat dan fraksi airnya dengan berbagai konsentrasi sebanyak masing-masing 10 ekor. Kemudian volume diimpitkan hingga 10 ml dengan menggunakan air laut. Setelah 24 jam diamati jumlah larva udang yang mati. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk tiap sampel uji.

3.7 Pemisahan dan Pemurnian

Pada penelitian ini pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan cara kromatografi yaitu kromatografi lapis tipis (KLT) dan KLT Preparatif.

3.7.1 Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi etil asetat (fraksi yang paling aktif) ditotolkan pada pelat KLT ukuran (8 x 2) dengan menggunakan pipa kapiler. Ekstrak ditotolkan kira-kira 1 cm dari tepi bawah lempeng kemudian dibiarkan beberapa saat hingga kering. Setelah itu lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi berisi cairan pengelusi metanol: kloroform (2 : 8) v/v yang telah dijenuhkan. Lempeng dibiarkan terelusi hingga batas 1 cm dari tepi atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari bejana dan diangin-anginkan hingga cairan pengelusnya menguap. Kromatogram yang dihasilkan diamati nodanya di

bawah sinar ultraviolet pada panjang gelombang 366 m. Noda-noda yang memberikan fluoresensi ditandai pada lempeng.

3.7.2 Analisis Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Setelah dilakukan analisis dengan kromatografi lapis tipis dan ditemukan pelarut dengan perbandingan yang sesuai, di mana noda yang tampak terpisah dengan baik, maka analisis selanjutnya dilakukan dengan KLT Preparatif dengan pelat ukuran 20 x 20 cm.

Fraaksi etilasetat ditotolkan pada plat KLT Preparatif. Penotolan cuplikan berupa garis atau pita yang sempit. Selanjutnya pengembangan KLTP dilakukan dalam bejana yang sudah dijenuhkan terlebih dahulu. Eluen yang dipakai adalah eluen dari hasil orientasi dengan KLT yaitu kloroform: metanol (2 : 8) v/v. Setelah dielusi, pelat dikeringkan dan dideteksi dengan lampu ultraviolet, pita yang nampak ditandai dengan pensil, kemudian dikeruk lalu didekantasi beberapa kali dengan pelarut etilasetat. Isolat yang dihasilkan diuapkan kemudian diujikan pada *Artemia salina*. Selanjutnya isolat paling aktif di kromatografi lapis tipis lagi untuk memastikan kemurniannya.

3.8 Analisis Komponen Bioaktif

Isolat yang paling aktif bersifat toksik diidentifikasi dengan spektrofotometer ultraviolet dan KLT.

3.8.1 Spektrofotometer Ultraviolet

Diambil 1 mL isolat aktif kemudian dimasukkan ke dalam kuvet yang telah diisi dengan pelarut etilasetat, dikocok, kemudian didiamkan lalu diukur spektrumnya pada spektrofotometer ultraviolet.

3.8.2 Kromatografi Lapis Tipis

Isolat aktif dianalisis dengan pereaksi yang disemprotkan di atas plat KLT yang telah dikembangkan dengan eluen kloroform : methanol (8 : 2). Kromatogram yang diperoleh diamati dengan menggunakan pereaksi penampak nada yaitu:

- Vanilin sulfat (1 gram vanillin dilarutkan dalam 100 mL H_2SO_4 50 %). Kromatogram dipanaskan pada suhu 110 °C selama 5 – 10 menit diamati dengan munculnya warna coklat.
- Antimon (III) klorida dalam kloroform (dilarutkan 10 gram antimon (III) klorida dalam 50 mL kloroform). Kromatogram dipanaskan pada 110 – 120 °C selama 5 – 10 menit diamati dengan timbulnya warna merah jingga.

3.9 Pengumpulan dan Analisa Data

Data dikumpulkan dari hasil perhitungan jumlah larva udang yang mati untuk tiap konsentrasi dan tiap ekstrak. Data yang diperoleh kemudian ditabulasi dianalisis secara analisa probit untuk memperoleh LC_{50} (24 jam).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Setelah sponge *Pseudoceratina sp* diekstraksi secara maserasi dengan metanol kemudian pemisahan selanjutnya dilakukan dalam pelarut n-heksana, etil asetat dan air sehingga diperoleh ekstrak heksana, ekstrak etil asetat dan fraksi air.

Masing-masing ekstrak dari fraksi di atas diujikan terhadap hewan uji larva udang *Artemia salina*, diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Perlakuan terhadap pembanding negatif (metanol 1 %) tidak memberikan respon kematian.
2. Perlakuan terhadap pembanding positif (siklofosamid) menunjukkan LC_{50} (24 jam) 51,48 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 4a).
3. Perlakuan terhadap ekstrak metanol menunjukkan LC_{50} (24 jam) 145,35 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 5a).
4. Perlakuan terhadap ekstrak n-heksana menunjukkan LC_{50} (24 jam) 318,12 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 6a).
5. Perlakuan terhadap ekstrak etil asetat menunjukkan LC_{50} (24 jam) 82,61 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 7a).
6. Perlakuan terhadap fraksi air menunjukkan LC_{50} (24 jam) 151 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 8a)

- Hasil kromatogram kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat (yang memberikan respon toksisitas paling tinggi) menggunakan eluen kloroform : metanol (8 : 2) v/v dengan penampak noda vanillin sulfat dan antimon (III) klorida dalam kloroform, masing-masing diperoleh 1 bercak yang berwarna coklat ($R_f = 0,56$) dan warna merah jingga ($R_f = 0,55$).
- Data spektrofotometer ultraviolet yang memberikan serapan maksimum pada 254 nm.

4.2 Pembahasan

Sampel sponge yang diperoleh dari perairan pulau Barrang Lompo menunjukkan populasi yang cukup besar pada kedalaman 1 – 2 meter. Hal ini disebabkan karena permukaan laut biasanya mengandung banyak unsur organik yang dimanfaatkan sebagai bahan makanan bagi kebanyakan biota laut.

Preparasi sampel untuk ekstraksi berupa sampel basah tanpa didahului proses pengeringan sinar matahari langsung dimaksudkan untuk menghindari rusaknya kandungan aktif dari sponge. Pada penelitian ini proses ekstraksi digunakan metode maserasi karena jenis sponge ini mempunyai struktur tubuh yang lunak sehingga dinding selnya mudah ditembus oleh cairan penyari. Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi ini adalah metanol karena mempunyai kemampuan untuk melarutkan senyawa polar dan non polar. Kemudian untuk pemisahan selanjutnya digunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana, etil asetat

dan air sehingga diperoleh 3 fraksi yaitu ekstrak n-heksana, etil asetat dan fraksi air.

Penentuan LC_{50} untuk mengetahui efek toksik ekstrak metanol, ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan fraksi air sponge *Pseudoceratina* sp dengan kontrol negatif (metanol 1 %) dan kontrol positif (siklofosfamid) dilakukan terhadap larva udang *A. salina*. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva udang yang mati. Adapun keuntungan menggunakan larva udang sebagai hewan uji dalam uji efek toksik karena murah, cepat, mudah pelaksanaannya dan mempunyai korelasi yang positif terhadap efek sitotoksiknya. Anderson *et. al.* (1991) telah melakukan penelitian secara statistik dan memperoleh hasil korelasi yang signifikan antara uji ketoksikan *A. salina* dan pengujian antitumor P-388 (*in vivo*, leukemia pada tikus).

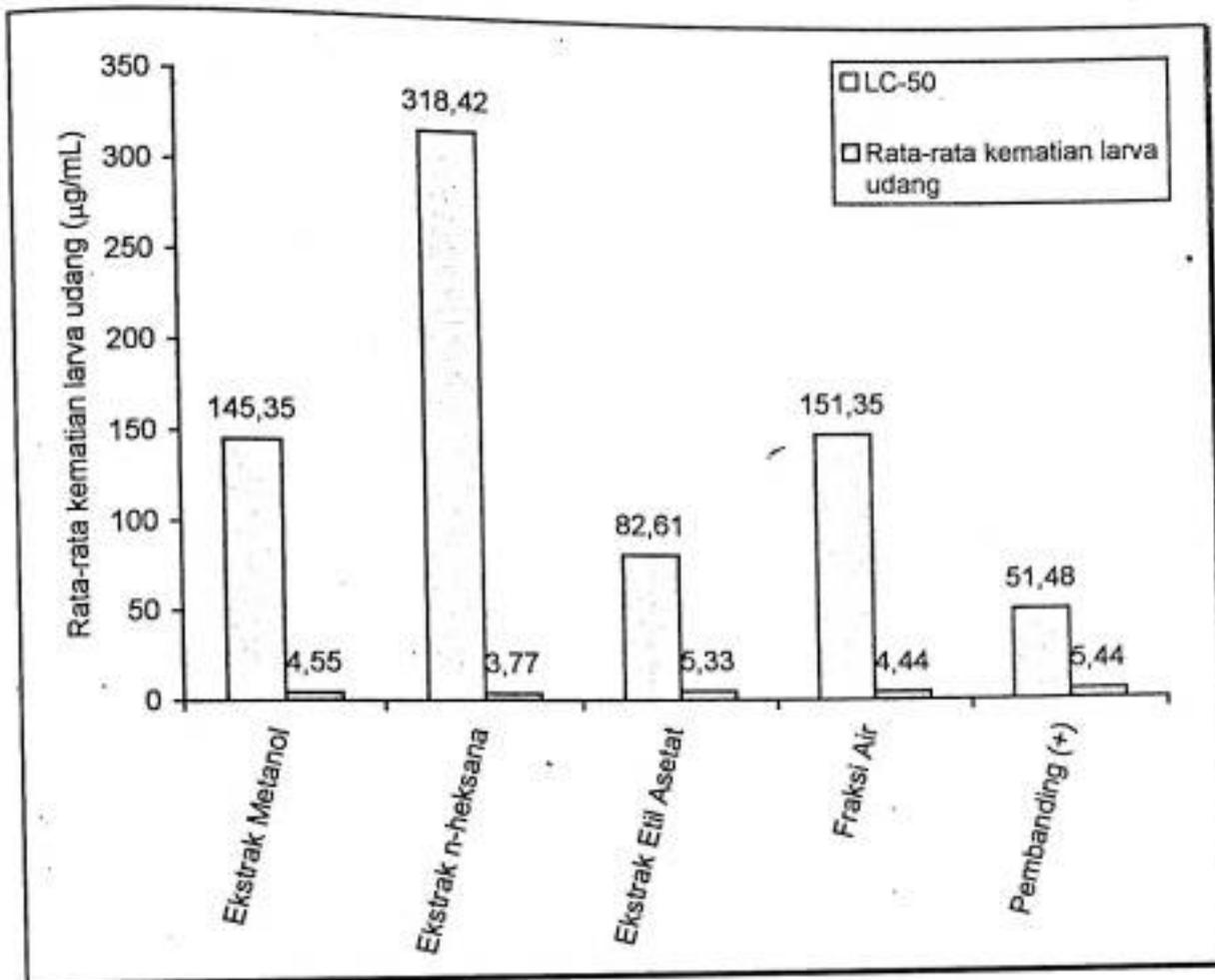
Penggunaan pembanding negatif (metanol 1 %) dimaksudkan untuk mengontrol pengujian ini, sebagai hasil yang diperoleh berupa respon kematian benar-benar dihasilkan oleh perlakuan dengan sampel bukan disebabkan oleh penambahan metanol 1 %, di mana digunakan untuk membantu kelarutan ekstrak yang tidak larut dalam air laut. Sedangkan pembanding positif (siklofosfamid) merupakan obat antikanker yang banyak digunakan dalam pengobatan kanker. Penggunaannya dalam penelitian ini dengan maksud untuk melihat respon kematian dari hewan uji benar-benar disebabkan oleh bahan kimia yang berkhasiat antikanker tersebut.



Efek toksik dari masing-masing sampel dapat ditentukan dengan melihat LC_{50} -nya dari perhitungan data kematian larva *A. salina* (Tabel 1) dengan menggunakan metode grafik probit log – konsentrasi. Apabila harga LC_{50} (24 jam) lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan toksik dan sebaliknya bila harga LC_{50} (24 jam) lebih besar dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan tidak toksik (Anderson, et. al., 1991). Efek toksik tersebut akan memberikan makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor. Dan dari hasil perhitungan diperoleh:

Tabel 1. Hasil perhitungan LC_{50} (24 jam) dan jumlah rata-rata larva udang yang mati terhadap beberapa sampel uji

Ekstrak / fraksi	LC_{50} (24 jam) $\mu\text{g/mL}$	Rata-rata kematian larva udang
Metanol	145,35	4,55
n-heksana	318,42	3,77
Etil asetat	82,61	5,33
Air	151,35	4,44
Siklofosfamid (pembeding +)	51,48	5,44
Metanol 1 % (pembeding -)	-	0



Gambar 3. Grafik nilai LC₅₀ dan jumlah rata-rata larva udang yang mati terhadap beberapa sampel uji.

Nilai LC₅₀ (24 jam) yang diperoleh tersebut (Tabel 1 dan Gambar 3) menunjukkan bahwa tingkat toksisitas sampel uji berada dalam interval toksik dan fraksi etil asetat memberikan respon yang paling toksik dan mendekati nilai respon pembanding positif terhadap larva udang *A. salina*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena senyawa yang bersifat toksik terhadap larva udang sukar larut dalam pelarut non polar dan polar. Atau walaupun ada senyawa yang larut dalam pelarut non polar dan polar tetapi dalam jumlah yang sangat kecil sehingga dosisnya tidak mampu untuk

dapat mematikan larva udang *Artemia salina*, sehingga hal ini dapat memberikan gambaran bahwa senyawa yang bersifat sitotoksik larut pada pelarut semi polar.

Fraksi etil asetat dianalisis lebih lanjut dengan Kromatografi Lapis Tipis untuk mencari eluen yang cocok pada Kromatografi Lapis Tipis Preparatif, dengan menggunakan eluen kloroform – metanol (8 : 2) menghasilkan 3 noda di bawah sinar ultraviolet.

Selanjutnya hasil analisis kromatografi lapis tipis preparatif menghasilkan 3 pita atau 3 fraksi yang selanjutnya masing-masing diujikan terhadap larva udang *Artemia salina*. Dari hasil uji ternyata fraksi III yang paling aktif membunuh larva udang dengan waktu pemaparan 24 jam (Tabel 2). Fraksi III selanjutnya dianalisis lebih lanjut dengan kromatografi lapis tipis diperoleh satu noda tunggal dengan penampakan noda lampu ultraviolet dengan $R_f = 0,55$.

Tabel 2 : Hasil uji sitotoksik fraksi etil asetat dari KLT preparatif terhadap *Artemia salina*.

No.	Fraksi	Jumlah larva udang yang diujikan	Jumlah larva udang yang mati
1.	I	10	7
2.	II	10	5
3.	III	10	8

Berdasarkan data warna noda hasil kromatografi lapis tipis dengan menggunakan pereaksi semprot vanillin-sulfat dan antimon (III) klorida (Tabel 3) menunjukkan bahwa komponen bioaktif sponge *Pseudoceratina sp* yang bersifat sitotoksik diperkirakan terpenoid. Hal ini ditunjang oleh data spektrofotometer ultraviolet yang memberikan serapan maksimum pada 254 nm.

Tabel 3 : Warna noda fraksi III dengan berbagai pereaksi semprot di atas pelat KLT

No.	Pereaksi Semprot	Warna Noda	Dugaan	Rf
1.	Vanilin – asam sulfat	Coklat	Terpenoid	0,68
2.	Antimon (III) klorida	Merah jingga	Terpenoid	0,55

Meskipun uji efek toksik dengan larva udang ini tidak memberikan hasil yang spesifik untuk antikanker, namun demikian beberapa peneliti terdahulu menunjukkan adanya korelasi yang berarti terhadap beberapa bahan, baik berupa ekstrak tanaman maupun ekstrak sampel laut atas aksinya sebagai antikanker. Oleh karena itu metode ini dapat memonitoring potensi antikanker terhadap senyawa-senyawa aktif dari ekstrak sponge. Begitu pula halnya dalam penentuan terpenoid sebagai komponen bioaktif sitotoksik belum dapat dituntaskan secara menyeluruh, karena masih dibutuhkan data spektrofotometer lainnya sebagai pembanding.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan hasil analisa data penentuan LC_{50} (efek toksik) dari ekstrak metanol, n-heksana, etil asetat dan fraksi air sponge *Pseudoceratina sp* menggunakan larva udang *Artemia salina* dengan parameter kematian setelah 24 jam, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak metanol, ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan fraksi air dari sponge *Pseudoceratina sp* bersifat toksik terhadap *Artemia salina* dan memiliki LC_{50} (24 jam) lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$.
2. Ekstrak etil asetat memiliki LC_{50} (24 jam) = 82,61 $\mu\text{g/mL}$ yang paling mendekati LC_{50} (24 jam) pembanding positif (siklofosfamid) = 51,48 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dapat dikatakan paling berpotensi sebagai antitumor/antikanker.
3. Setelah diidentifikasi dengan pereaksi spesifik vanillin-sulfat dan antimon (III) klorida menunjukkan bahwa komponen bioaktif sponge *Pseudoceratina sp* yang bersifat sitotoksik diperkirakan terpenoid di mana warna noda yang ditunjukkan berwarna coklat dan merah jingga dengan harga R_f = 0,56 dan 0,55 dan panjang gelombang 254 nm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut terhadap komponen bioaktif sponge ini dengan metode spektrofotometer IR dan NMR.

DAFTAR PUSTAKA

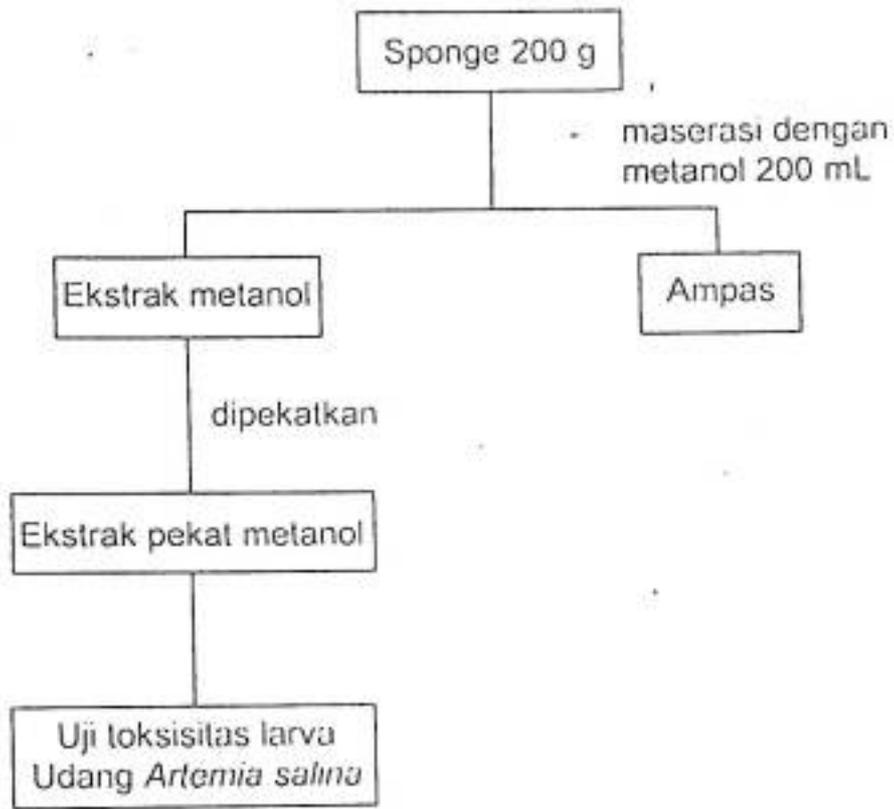
1. Anderson, J. E., Goetz, C. M., and Mc Laughlin, J.L., (1991), A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens, *Pytochem Anal*, Vol 2,107-111.
2. Bambang, S, (1993), *Pereaksi Kromatografi Lapis Tipis*, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta.
3. Barnes, R. D., (1990) *Invertebrata Zoologi*, 4th. Holt Saunders International Edition, Gettysburg College, Pennsylvania,104-106.
4. Caraan, G. B. Lazaro, J. E. Concepcion G. P.,(1994), *Biological Assays for Screening of Marine Samples*, Second marine Natural Product Workshop, Marine Science Institute of Chemistry, University of Philippines.
5. Cappucino, J. G dan Sherman, N. (1983), *Microbiology a Laboratory Manual*, Addison Wesley Publishing Company, California,57-67
6. Darise, M, dkk, (1996), *Komponen Kimia dalam Praktek*, Laboratorium Fitokimia Farmasi, FMIPA UNHAS, Ujungpandang.
7. Departemen Pendidikan dan Kesehatan, (1993), *Proseding Seminar Nasional Hasil Penelitian Perguruan Tinggi*, Direktorat Pembinaan dan Pengabdian Pada Masyarakat, Ujungpandang
8. Gritter. J. Roy, (1991), *Pengantar Kromatografi*, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung
9. Hanafi Usman, (2000), *Kimia Bahan Alam*, FMIPA, Universitas Hasanuddin, Ujungpandang
10. Harbone, J. B.,(1987),*"Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan"*, Penerbit ITB, Bandung
11. Hayes, A.,(1983),*"Principles and Methods of Toxilogy"*, Raven Press, New York, 4-23.
12. Hubert, I. J., Carter. E. M.,(1990), *Probity A Program in Pascal for Univariate Probity Analysis with Exact confidence Limits for LD₅₀* ,1-9

13. Iwang Sudiro, (1995), *Organisme Bahan Sebagai Sumber Bahan Bioaktif*, Jurusan Farmasi, FMIPA, Institut Teknologi Bandung
14. Jumalon, N. A., Figueron, R. F., Mabaylon, A. G. and Estenor, D. G., (1982), *Use and Culture of Artemia*, Training Course on Growing Food Organisme for fish Matheries, Lecture Notes,4
15. Leblanc, M., (1997), *Papers on Guide to Sponge Collection and Identification*, University of British Columbia, Canada in Corporation with Faculty of Marine Science and Fishery, University of Hasanuddin, Ujungpandang, Printed from Website
16. Loomis, T.A., (1978), *Toksikologi Dasar*, Edisi III, Penerjemah Imono Argo, IUP Semarang Press,4,16-21
17. Martyn Haywood, Sue Wells Salamander books, (1989), *The Manual of Marine Invertebrata*, London
18. Munro, M. H. G. Luibrand. R., Blunt, J. W., (1987), *The Search for Antiviral and Anticancer Compound from Marine Organism*, Vol I, Springer Verlag Berlin Heidelberg,107
19. Mujiman, (1988), *Udang Renik Air Asin*, Bharatara Karya Aksara, Jakarta, 15-25.
20. Nybakken, J. V., (1993), *Marine biology an Ecological Approach*, Editions, Harper Collins College Publisher, New York.
21. Sastromihardjojo H., (1991), *Spectroscopy*, Liberty Yogyakarta, Edisi kedua.
22. Satari. R., (1996), *Produk Alam Laut Sebagai Lead Compound untuk Farmasi dan Pertanian*, Seminar Sehari Perspektif Baru dalam Drug Discovery,26 Oktober 1996, Ujungpandang, 5
23. Sthal, E.,(1969), *Thin Layer Chromatography. Laboratory Hand Book*, Second Edition Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.
24. Steven, M., Colegate and Rusel, J., Molyneux, (1993), *Bioactive Natural Product, Detection, Isolation and Structural-Determination*, CRC Press, Inc., London. 442-451
25. Sorgelos, P.,(1980), *Technological Aspects of Batch Culturing of Artemia in High Density*, Artemia Reference Center State University of Gent Plantenstraat, Belgium.

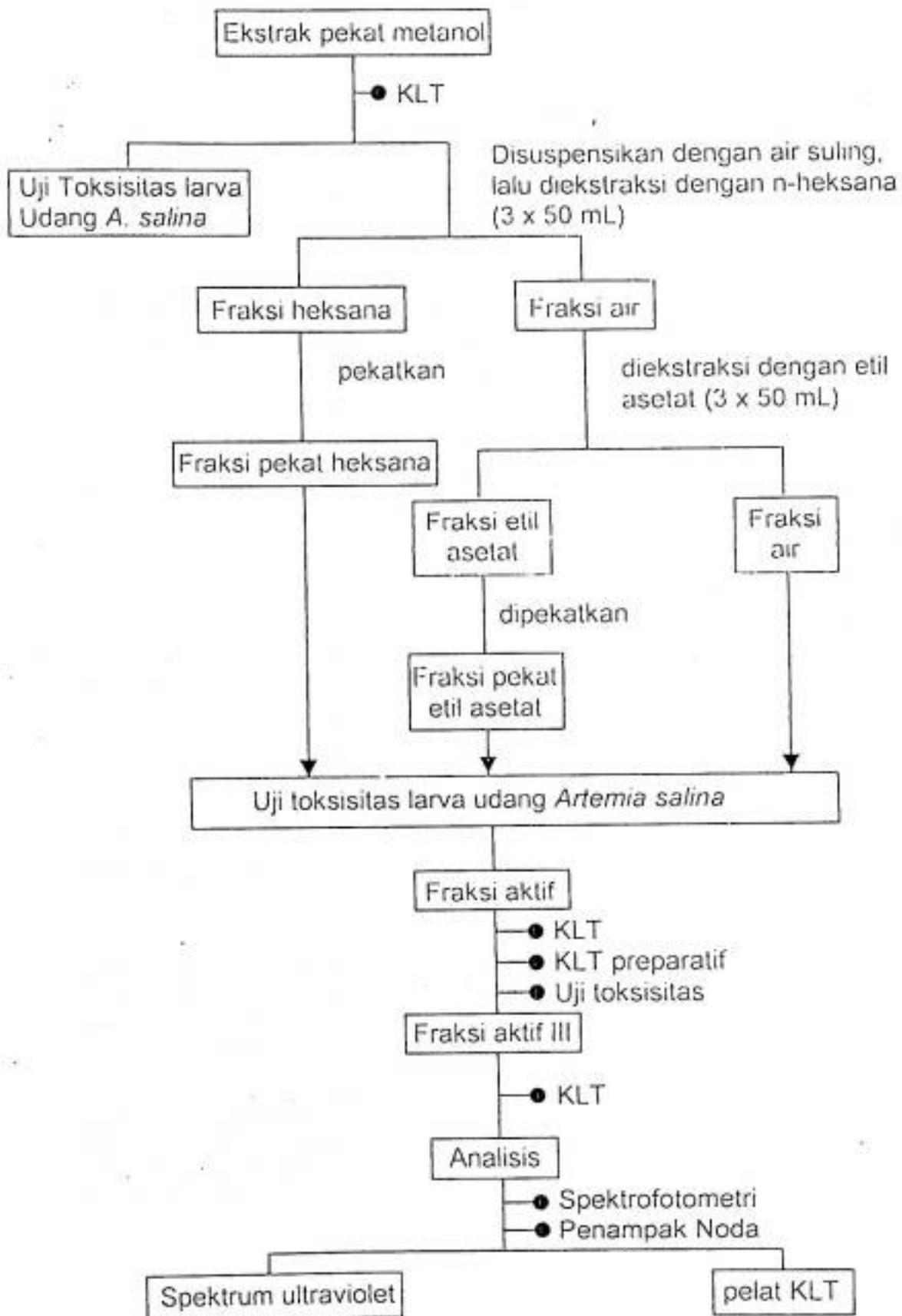
26. Suryati, E., Ahmad T., (1986). **Peluang Pemanfaatan Bioaktif Spons untuk Bakterisida**, Tema Ilmiah Veteriner, Maret, Bogor, 5 – 7.
27. Suryawira, U., (1992), **pengantar Kromatografi Umum**, Penerbit Angkasa, Bandung.
28. Schmitz, F.J., 1977 **Chemistry Related to The Search for Drugs From The Sea in Marine Natural Products Chemistry**, Faulkner, D.J and Fenical W.H Eds.; Plenum Press. N. Y and Lond, 293-309.
29. Wiryowidagdo, S, Moka, W., (1996), **Identifikasi dan Eksplorasi Organisme Laut Sebagai Sumber Bahan Baku Obat Baru di Kepulauan Spermonde Sulawesi Selatan**, Seminar Sehari Perspektif Baru dalam "Drug Discovery", 26 Oktober 1996, Ujungpandang, 1 – 3.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

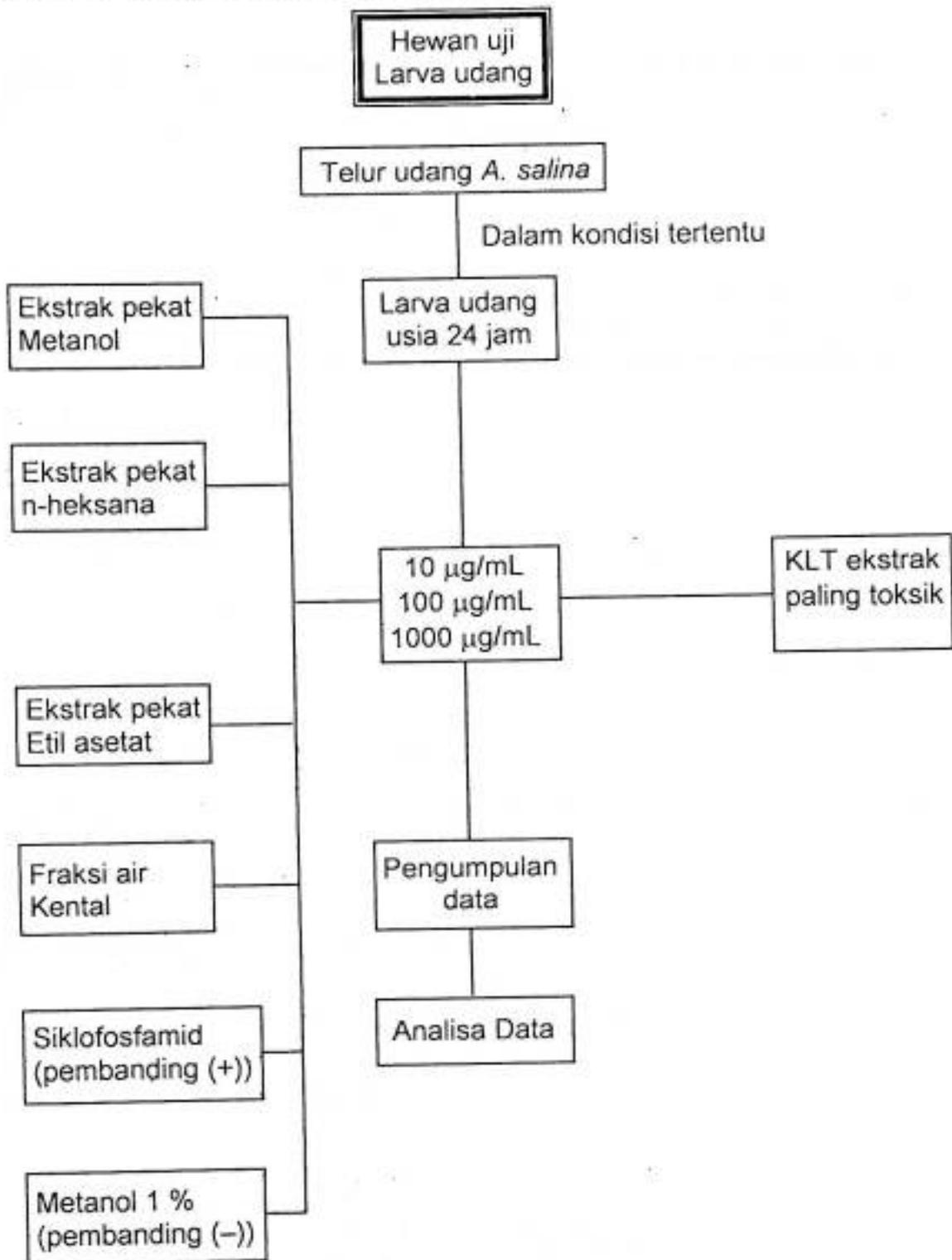
Lampiran 1. Bagan maserasi sponge



Lampiran 2. Bagan pemisahan fraksi aktif komponen bioaktif sponge



Lampiran 3. Bagan prosedur uji toksisitas



Lampiran 4a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ siklofosfamid (pembanding positif) menurut metode grafik probit log konsentrasi

Log-Konsentrasi		Probit		XY
X	X ²	Y	Y ²	
1	1	3,72	13,84	3,72
2	4	5,08	25,81	10,16
3	9	8,09	65,45	24,27
$\Sigma = 6$	$\Sigma = 14$	$= 16,89$	$\Sigma = 105,10$	$\Sigma = 38,15$

Persamaan regresi:

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum X^2 \cdot \sum Y) - (\sum X \cdot \sum XY)}{(n \cdot \sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{(14 \cdot 16,89) - (6 \cdot 38,15)}{(3 \cdot 14) - (6)^2}$$

$$= \frac{7,56}{6} = 1,26$$

$$b = \frac{(n \cdot \sum XY) - (\sum X \cdot \sum Y)}{n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2} = \frac{(3 \cdot 38,15) - (6 \cdot 16,89)}{(3 \cdot 14) - (6)^2}$$

$$= \frac{13,11}{6} = 2,185$$

Persamaan regresinya: $Y = 1,26 + 2,185 X$

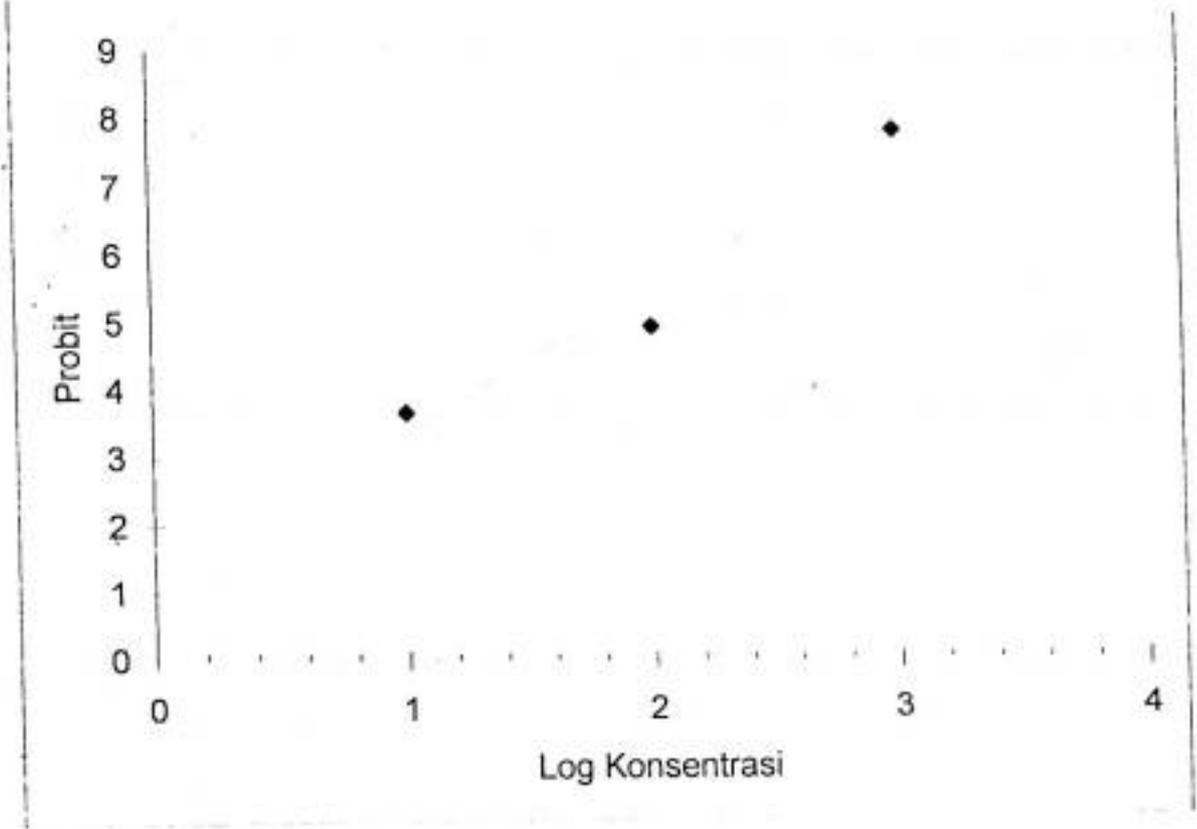
Untuk $\log LC_{50(24 \text{ jam})}$ $Y = 5$, maka $X = \frac{5 - 1,26}{2,185} = 1,712$

Sehingga $LC_{50(24 \text{ jam})} = 51,48 \mu\text{g/mL}$

Keterangan:

- X = log konsentrasi siklofosfamid (pembanding +)
- Y = persentase respon kematian dalam satuan probit
- a = panjang sumbu tegak antara titik asal dan titik potong garis regresi dengan sumbu tegak
- b = slope atau gradien

Lampiran 4.b Kurva hubungan antara log konsentrasi dan prosentasi kematian (probit) siklofosfamid (pembanding +)



Lampiran 5a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ ekstrak metanol sponge *Pseudoceratina sp* menurut metode grafik probit log konsentrasi

Log-Konsentrasi		Probit		XY
X	X ²	Y	Y ²	
1	1	3,87	14,98	3,87
2	4	4,82	23,23	9,64
3	9	5,84	34,11	17,52
$\Sigma = 6$	$\Sigma = 14$	$\Sigma = 14,53$	$\Sigma = 72,32$	$\Sigma = 31,03$

Persamaan regresi:

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum X^2 \cdot \sum Y) - (\sum X \cdot \sum XY)}{(n \cdot \sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{(14 \cdot 14,53) - (6 \cdot 31,03)}{(3 \cdot 14) - (6)^2} = \frac{17,24}{6} = 2,87$$

$$b = \frac{(n \cdot \sum XY) - (\sum X \cdot \sum Y)}{n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2} = \frac{(3 \cdot 31,03) - (6 \cdot 14,53)}{(3 \cdot 14) - (6)^2} = \frac{5,91}{6} = 0,985$$

Persamaan regresinya: $Y = 2,87 + 0,985 X$

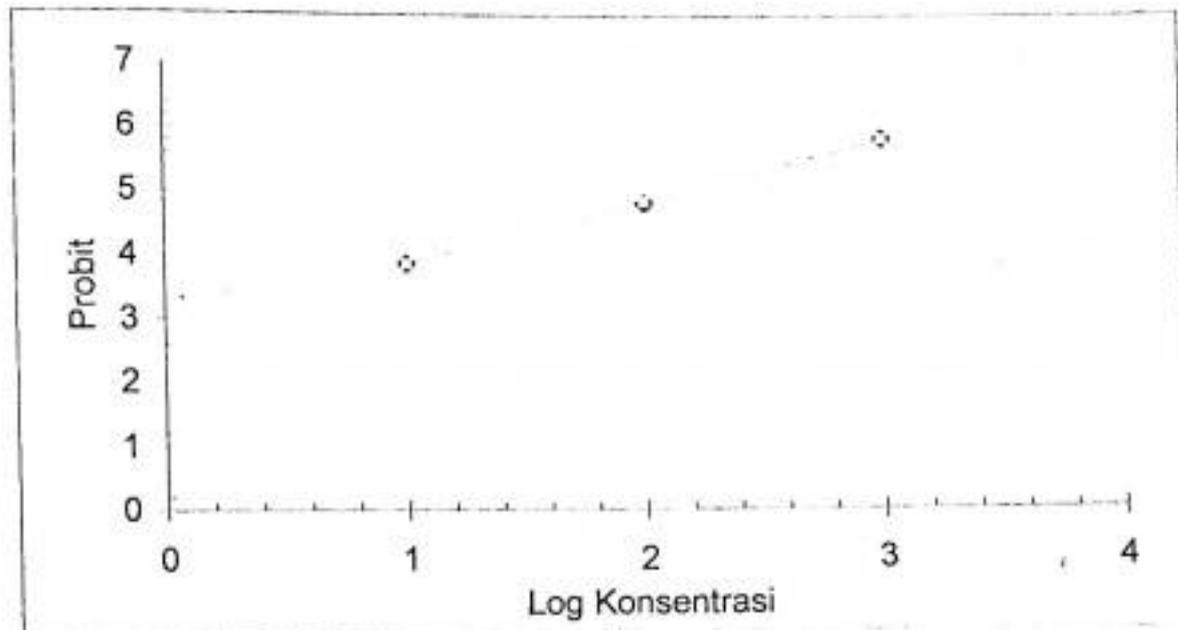
Untuk $\log LC_{50(24 \text{ jam})}$ $Y = 5$, maka $X = \frac{5 - 2,87}{0,985} = 2,162$

Sehingga $LC_{50(24 \text{ jam})} = 145,35 \mu\text{g/mL}$

Keterangan:

- X = log konsentrasi ekstrak metanol sponge
- Y = persentase respon kematian dalam satuan probit
- a = panjang sumbu tegak antara titik asal dan titik potong garis regresi dengan sumbu tegak
- b = slope atau gradien

Lampiran 5.b Kurva hubungan antara log konsentrasi dan prosentasi kematian (probit) ekstrak metanol sponge *Pseudoceratina sp*



Lampiran 6a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ ekstrak n-heksana sponge *Pseudoceratina sp* menurut metode grafik probit log konsentrasi

Log-Konsentrasi		Probit		XY
X	X ²	Y	Y ²	
1	1	3,87	14,98	3,87
2	4	4,56	20,79	9,12
3	9	5,41	29,27	16,23
$\Sigma = 6$	$\Sigma = 14$	$\Sigma = 13,84$	$\Sigma = 65,04$	$\Sigma = 29,22$

Persamaan regresi:

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum X^2 \cdot \sum Y) - (\sum X \cdot \sum XY)}{(n \cdot \sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{(14 \cdot 13,84) - (6 \cdot 29,22)}{(3 \cdot 14) - (6)^2}$$

$$= \frac{18,44}{6} = 3,073$$

$$b = \frac{(n \cdot \sum XY) - (\sum X \cdot \sum Y)}{n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2} = \frac{(3 \cdot 29,22) - (6 \cdot 13,84)}{(3 \cdot 14) - (6)^2}$$

$$= \frac{4,62}{6} = 0,77$$

Persamaan regresinya: $Y = 3,073 + 0,77 X$

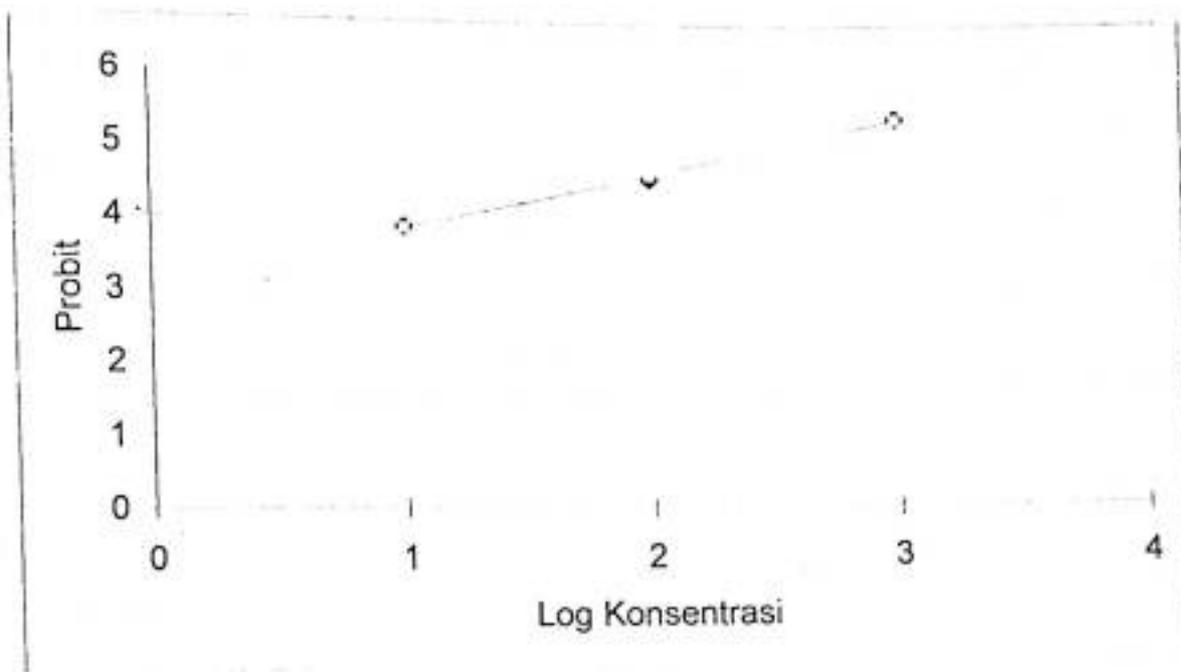
Untuk log $LC_{50(24 \text{ jam})}$ $Y = 5$, maka $X = \frac{5 - 3,073}{0,77} = 2,503$

Sehingga $LC_{50(24 \text{ jam})} = 318,12 \mu\text{g/mL}$

Keterangan:

- X = log konsentrasi ekstrak n-heksana sponge
- Y = persentase respon kematian dalam satuan probit
- a = panjang sumbu tegak antara titik asal dan titik potong garis regresi dengan sumbu tegak
- b = slope atau gradien

Lampiran 6.b Kurva hubungan antara log konsentrasi dan prosentasi kematian (probit) ekstrak n-heksana sponge *Pseudoceratina sp*



Lampiran 7a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ ekstrak etil asetat sponge *Pseudocerotina* sp menurut metode grafik probit log konsentrasi

Log-Konsentrasi		Probit		XY
X	X ²	Y	Y ²	
1	1	3,87	14,98	3,87
2	4	5,15	26,52	10,3
3	9	6,28	39,44	18,84
$\Sigma = 6$	$\Sigma = 14$	$\Sigma = 15,3$	$\Sigma = 80,94$	$\Sigma = 33,01$

Persamaan regresi:

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum X^2 \cdot \sum Y) - (\sum X \cdot \sum XY)}{(n \cdot \sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{(14 \cdot 15,3) - (6 \cdot 33,01)}{(3 \cdot 14) - (6)^2} = \frac{16,14}{6} = 2,69$$

$$b = \frac{(n \cdot \sum XY) - (\sum X \cdot \sum Y)}{n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2} = \frac{(3 \cdot 33,01) - (6 \cdot 15,3)}{(3 \cdot 14) - (6)^2} = \frac{7,23}{6} = 1,205$$

Persamaan regresinya: $Y = 2,69 + 1,205 X$

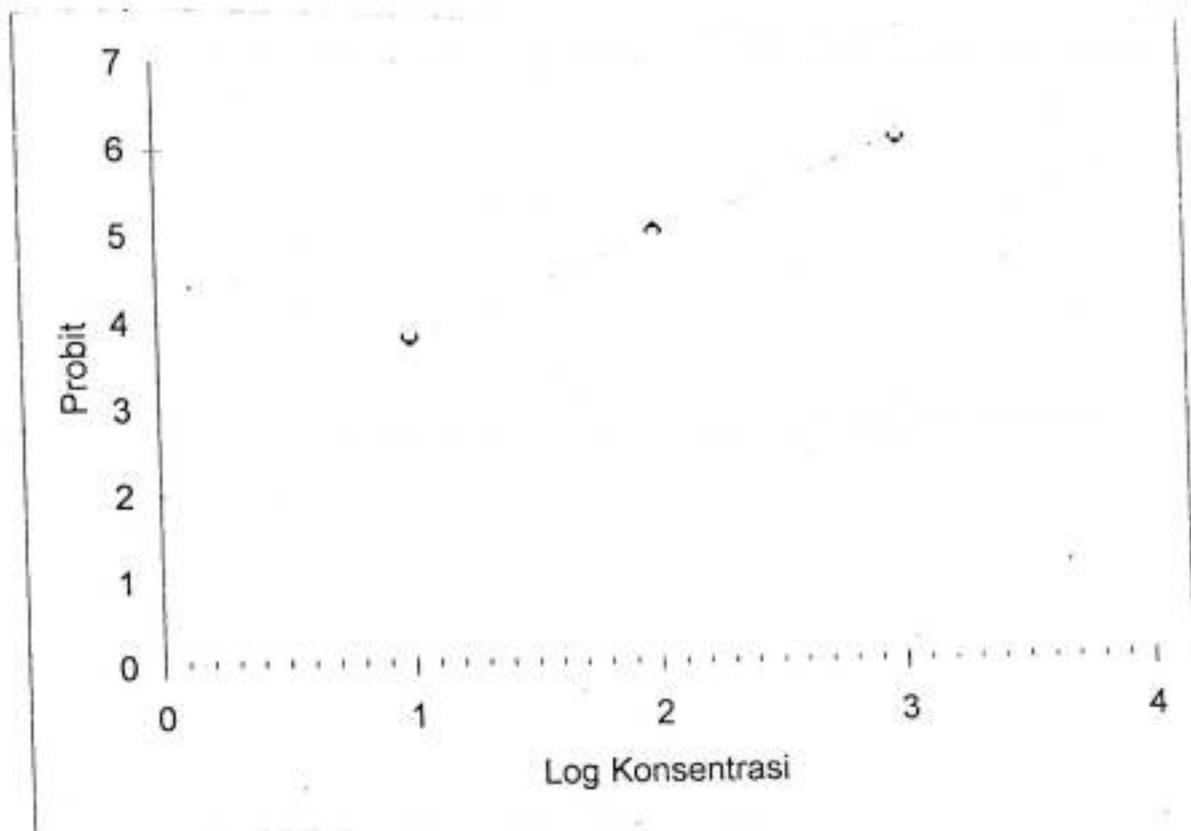
Untuk $\log LC_{50(24 \text{ jam})}$ $Y = 5$, maka $X = \frac{5 - 2,69}{1,205} = 1,917$

Sehingga $LC_{50(24 \text{ jam})} = 82,61 \mu\text{g/mL}$

Keterangan:

- X = log konsentrasi ekstrak etil asetat sponge
- Y = persentase respon kematian dalam satuan probit
- a = panjang sumbu tegak antara titik asal dan titik potong garis regresi dengan sumbu tegak
- b = slope atau gradien

Lampiran 7.b Kurva hubungan antara log konsentrasi dan prosentasi kematian (probit) ekstrak etil asetat sponge *Pseudoceratina sp*



Lampiran 8a. Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ ekstrak fraksi air sponge *Pseudoceratina sp* menurut metode grafik probit log konsentrasi

Log-Konsentrasi		Probit		XY
X	X ²	Y	Y ²	
1	1	4,01	16,08	4,01
2	4	4,82	23,23	9,64
3	9	5,71	32,60	17,13
$\Sigma = 6$	$\Sigma = 14$	$\Sigma = 14,54$	$\Sigma = 71,91$	$\Sigma = 30,78$

Persamaan regresi:

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum X^2 \cdot \sum Y) - (\sum X \cdot \sum XY)}{(n \cdot \sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{(14 \cdot 14,54) - (6 \cdot 30,78)}{(3 \cdot 14) - (6)^2} = \frac{18,88}{6} = 3,147$$

$$b = \frac{(n \cdot \sum XY) - (\sum X \cdot \sum Y)}{n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2} = \frac{(3 \cdot 30,78) - (6 \cdot 14,54)}{(3 \cdot 14) - (6)^2} = \frac{5,1}{6} = 0,85$$

Persamaan regresinya: $Y = 3,147 + 0,85 X$

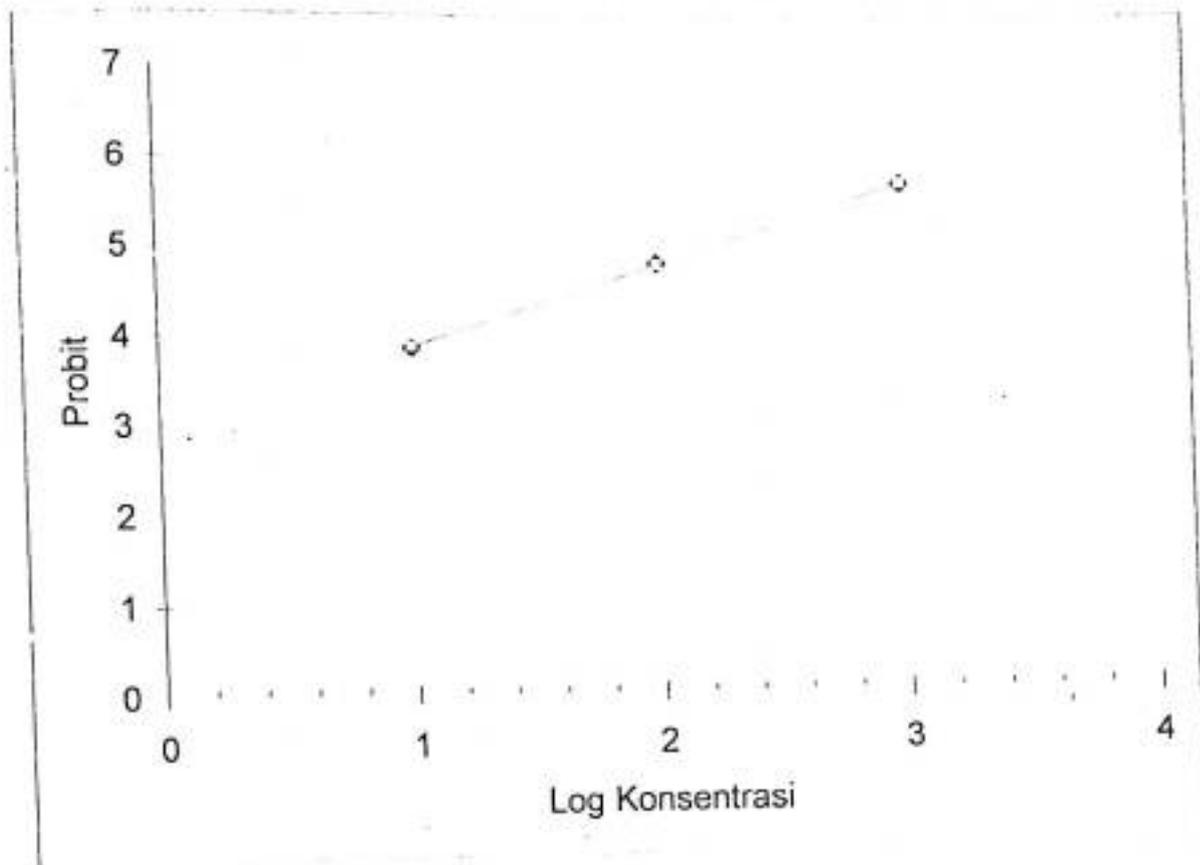
Untuk log $LC_{50(24 \text{ jam})}$ $Y = 5$, maka $X = \frac{5 - 3,147}{0,85} = 2,18$

Sehingga $LC_{50(24 \text{ jam})} = 151,35 \mu\text{g/mL}$

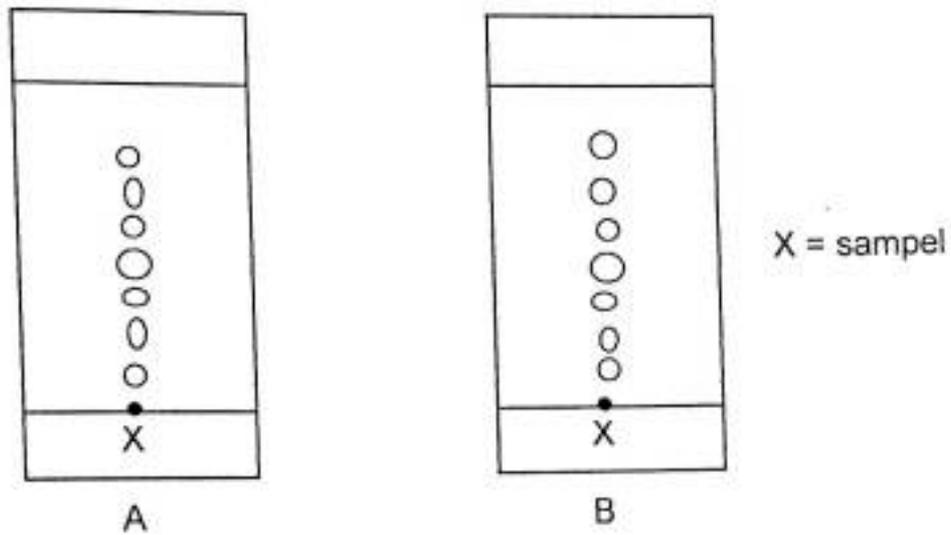
Keterangan:

- X = log konsentrasi fraksi air sponge
- Y = persentase respon kematian dalam satuan probit
- a = panjang sumbu tegak antara titik asal dan titik potong garis regresi dengan sumbu tegak
- b = slope atau gradien

Lampiran 8.b Kurva hubungan antara log konsentrasi dan prosentasi kematian (probit) fraksi air sponge *Pseudoceratina* sp



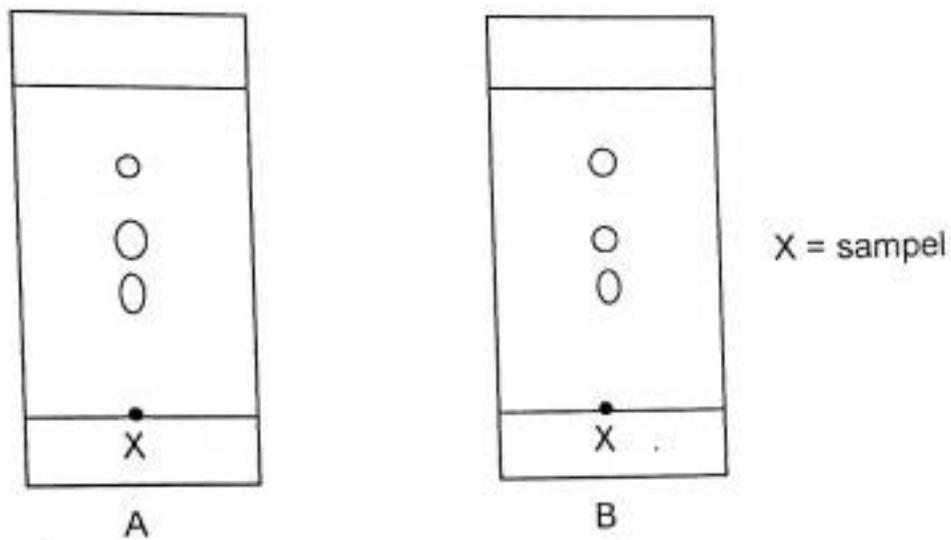
Lampiran 9. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak metanol



Keterangan:

- | | |
|------------------|--|
| Cairan pengelusi | : kloroform – metanol (8 : 2) |
| Penampak Noda | : A. Lampu ultraviolet
B. H ₂ SO ₄ 10 % |
| Ukuran lempeng | : 2 x 8 cm |
| Absorben | : Silika gel 60 G |

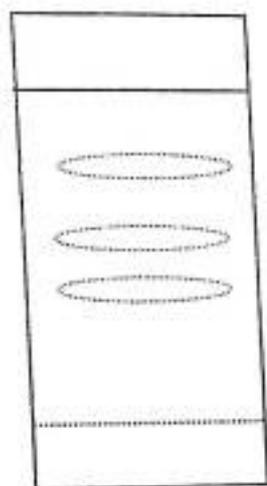
Lampiran 10. Hasil kromatografi lapis tipis fraksi etil asetat



Keterangan:

- | | |
|------------------|--|
| Cairan pengelusi | : kloroform – metanol (8 : 2) |
| Penampak Noda | : A. Lampu ultraviolet
B. H ₂ SO ₄ 10 % |
| Ukuran lempeng | : 2 x 8 cm |
| Absorben | : Silika gel 60 G |

Lampiran 11. Hasil kromatografi lapis tipis Preparatif fraksi etilasetat

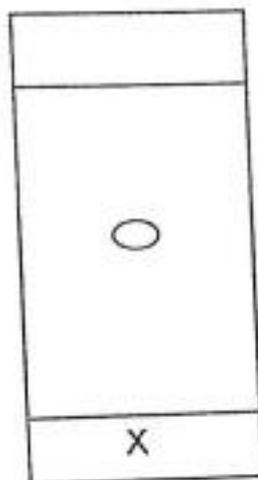


X = sampel

Keterangan :

- Cairan pengelusi : kloroform – metanol (8 : 2)
Penampak Noda : Lampu ultraviolet
Ukuran lempeng : 20 x 20 cm
Absorben : Silika gel 60 G

Lampiran 12. Hasil kromatografi lapis tipis fraksi aktif III dari hasil KLT preparatif

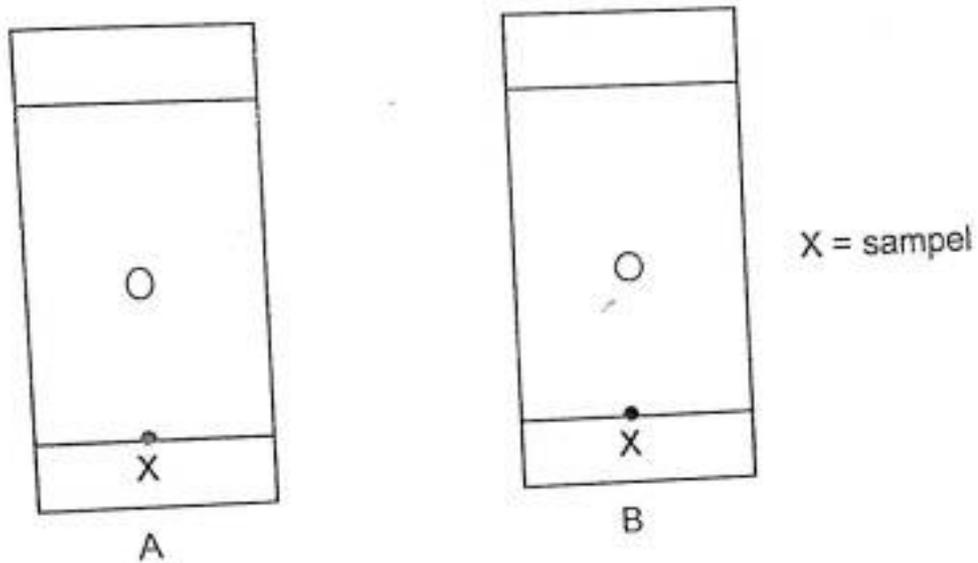


X = sampel

Keterangan:

Cairan pengelusi	: kloroform – metanol (8 : 2)
Penampak Noda	: A. Lampu ultraviolet
Ukuran lempeng	: 2 x 8 cm
Absorben	: Silika gel 60 G

Lampiran 13. Hasil kromatografi lapis tipis fraksi aktif III dengan berbagai pereaksi penampak noda



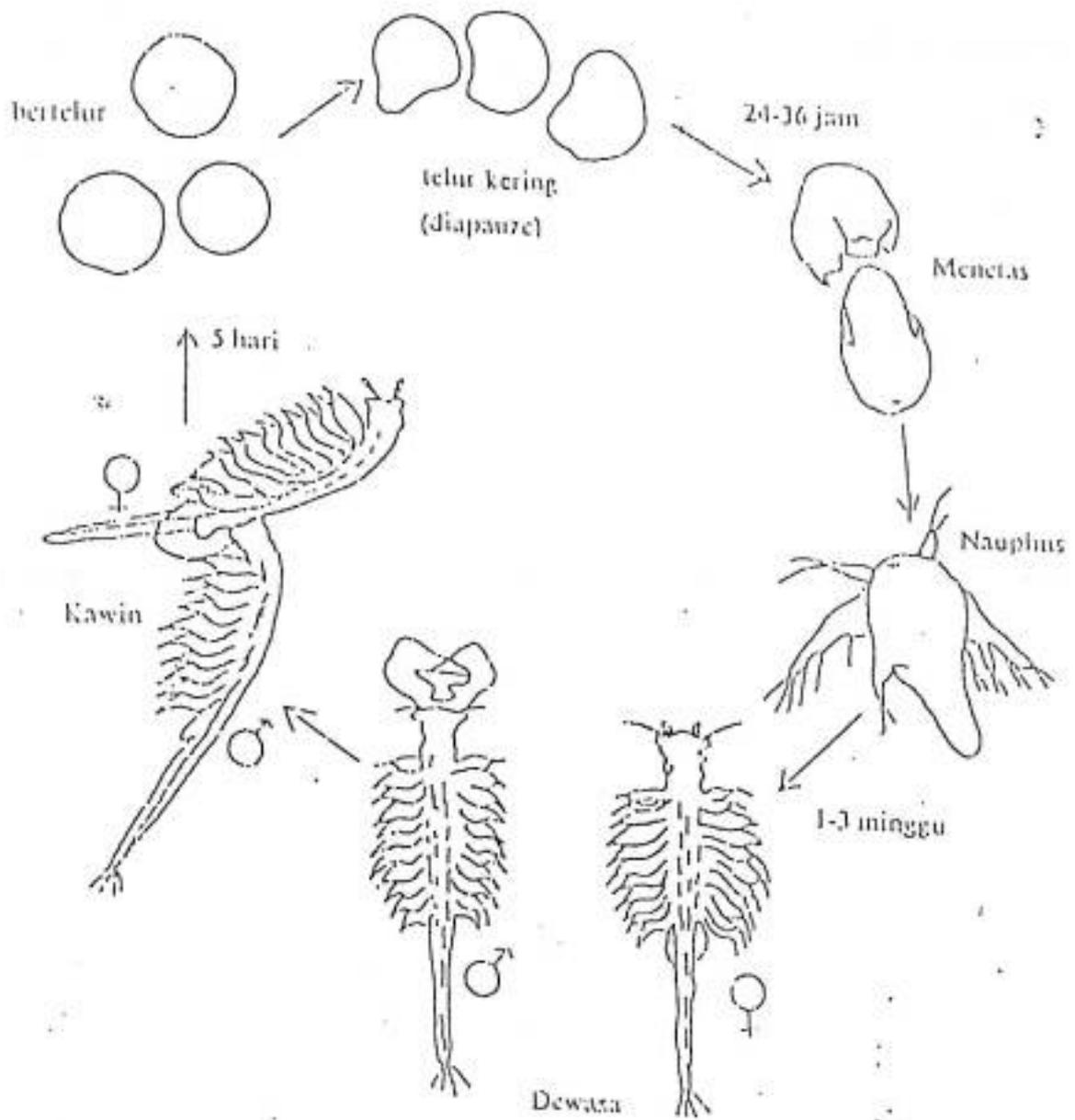
Keterangan:

Cairan pengelusi	: kloroform – metanol (8 : 2)
Penampak Noda	: A. Vanilin - sulfat B. Antimon (III) klorida
Ukuran lempeng	: 2 x 8 cm
Absorben	: Silika gel 60 G

Lampiran 14. Data hasil pengamatan kematian larva udang *Artemia salina* Leach setelah 24 jam perlakuan dengan masing-masing ekstrak sponge *Pseudoceratina* sp

Sampel	Konsentrasi $\mu\text{g/mL}$		
	10	100	1000
Ekstrak metanol	1	4	8
	2	4	8
	1	5	8
Jumlah Total	4	13	24
% Kematian	13,3	43,3	80
Ekstrak n-heksana	1	3	7
	1	3	7
	2	4	6
Jumlah Total	4	10	20
% Kematian	13,3	33,3	66,6
Ekstrak etil asetat	1	5	8
	1	6	9
	2	6	10
Jumlah Total	4	17	27
% Kematian	13,3	56,6	90
Fraksi air	2	5	7
	1	4	9
	1	4	9
Jumlah Total	4	13	25
% Kematian	13,3	43,3	76,6
Siklofosamid (pembeding +)	1	5	10
	1	6	10
	1	5	10
Jumlah Total	3	16	30
% Kematian	10	53,3	100
Metanol 1 % (Pembeding -)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
Jumlah Total	0	0	0
% Kematian	0	0	0

Lampiran 15. Siklus hidup *Artemia salina* Leach



Lampiran 16. Harga probit sesuai dengan prosentasenya

Prosen- tase	PROBIT									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.38	3.45	3.52	3.59	3.68
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.95	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.17	4.19	4.23	4.28	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.5	4.53	4.58	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.38	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	8.34	8.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
99	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.66	7.75	7.88	8.09

Lampiran 17. Gambar sponge *Pseudoceratina* sp

