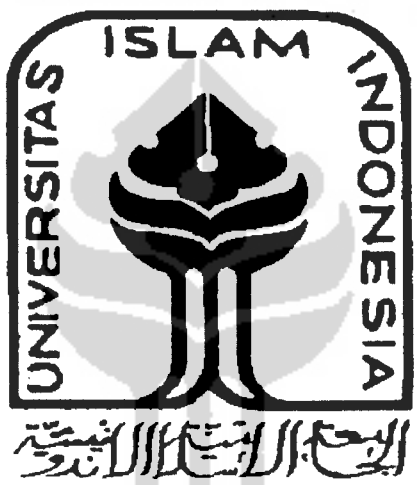
UJI TOKSISITAS AKUT DAUN KEMBANG BUGANG (*Clerodendrum calamitosum* L.) DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (*BST*) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI PALING AKTIF

SKRIPSI



Oleh :

UMI ULFA
01613029

JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
APRIL 2006

UJI TOKSISITAS AKUT DAUN KEMBANG BUGANG (*Clerodendrum calamitosum* L.) DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (*BST*) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI PALING AKTIF

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Jogjakarta

Oleh :

UMI ULFA

01613029

JURUSAN FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

JOGJAKARTA

APRIL 2006

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS AKUT DAUN KEMBANG BUGANG (*Clerodendrum calamitosum* L.) DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (*BST*) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI PALING AKTIF

Yang diajukan oleh

UMI ULFA
01613029

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,	Pembimbing Pendamping,
Dr. C. J. Soegihardjo, Apt.	Farida Hayati, M.Si., Apt.

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS AKUT DAUN KEMBANG BUGANG (*Clerodendrum calamitosum* L.) DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (*BST*) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI PALING AKTIF

Oleh :

UMI ULFA

01613029

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 18 April 2006

Ketua Penguji,

Dr. C. J. Soegihardjo, Apt

Anggota Penguji,

Farida Hayati, M.Si., Apt

Anggota Penguji,

Endang Darmawan, M.Si., Apt

Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Jaka Nugraha, M.Si.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Jogjakarta, April 2006

Penulis,

Umi Ulfa

Halaman Persembahan

Bismillahirahmannirrahim

Karena sesudah kesulitan itu ada kemudahan
Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan),
Kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.
Dan hanya kepada Rabbmulah hendaknya kamu berharap.
(QS. Alam Nasyrah (94) : 5-8)

Kupersembahkan semua untukmu Ya Rabbi, terimalah ini sebagai amal ibadah hamba-Mu, dan sesungguhnya shalatku, hidupku, dan matiku semuanya hanyalah bagi Allah, Rabb semesta alam

Kupersembahkan sebuah karyaku ini kepada :

1. "Papa & Mama", atas semua kasih sayang, dukungan, kepercayaan, perhatian, pengertian serta doa' yang selalu mengiringi langkah hidup dan perjuanganku selama ini, semua tidak dapat dibalas dengan apapun jua, hanya doa' dan harapan semoga ridho dan rahmat Allah slalu menyertai dunia dan akhirat.
2. "Ibu, b' yanto, m'dewi & b'utuh, m'apok & b'sudi, m'niang, aa'& b'amru, d'mita, d'mutia, d'icha, ponakanku doni, hafiz & latief", trimakasih buat semua doa', nasehat dan dukungannya. "Smoga umie bisa m'bahagiakan dan m'banggakan kalian".
3. Anugrah t'indah yang pernah kumilki "chayank", trimakasih untuk semua doa', dukungan, perhatian dan waktunya selama ini. "cepet nyusul ya...kita wujudkan cita & cinta bersama".
4. Sahabat seperjuanganku "Hesty", thanks banget dukungan, bantuan 'n komputernya, hanya Allah yang bisa m'balasnya. "cepet nyusul ya non...,kamu baek banget".
5. "Elva"...sahabat setiaku, "Indah"...sahabat cantikku, "Lia"...sahabat baekku. Kalian adalah sahabat terbaik & warna ceria hidupku, thanks banget slalu jadi tempat curhatku 'n slalu support aku.
6. Temen2ku "agil, amalia, henny, nurul, nita, pure, rani, rury, septy" thanks buat semuanya.
7. Semua " temen-temen " yang tidak bisa umie sebutkan.....terimakasih.
8. Almamaterku....UII tercinta.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **"Uji Toksisitas Akut Daun Kembang Bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) Dengan Metode *Brine Shrimps Lethality Test* (*BST*) Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Paling Aktif".**

Penyusunan ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan pada Fakultas MIPA, Jurusan Farmasi, Universitas Islam Indonesia.

Dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan rasa hormat penulis haturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. C. J. Soegihardjo, Apt., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberi bimbingan dan saran selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Farida Hayati, M.Si., Apt., selaku Dosen Pembimbing Pendamping dan Ketua Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia serta Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberi bimbingan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Endang Darmawan, M.Si., Apt., selaku Dosen Penguji.dan Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
4. Semua Dosen Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia. Terima kasih atas semua ilmu pengetahuan yang telah diberikan dan bimbingannya selama ini.
5. Semua Staf Laboratorium Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universiats Islam Indonesia. Terima kasih atas semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah banyak membantu dalam kelancaran penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dalam skripsi ini, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Semoga skipsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan pengobatan dan dunia kesehatan.

Jogjakarta, April 2006

Penulis,

Umi Ulfa

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR..... vi
DAFTAR ISI..... viii
DAFTAR GAMBAR..... xi
DAFTAR TABEL..... xii
DAFTAR LAMPIRAN..... xiv
INTISARI..... xiv
ABSTRACT..... xv
BAB. I PENDAHULUAN..... 1
A. Latar Belakang Masalah..... 1
B. Perumusan Masalah..... 3
C. Tujuan Penelitian..... 3
BAB. II STUDI PUSTAKA..... 4
A. Tinjauan Pustaka..... 4
1. Uraian tanaman..... 4
a. Klasifikasi..... 4
b. Nama daerah..... 4
c. Morfologi..... 4
d. Efek farmakologi..... 5
e. Khasiat..... 5
f. Kandungan kimia..... 5
2. Uraian kandungan senyawa tanaman..... 5
a. Flavonoid..... 5
b. Alkaloid..... 6
c. Saponin..... 6
d. Senyawa fenol..... 6
3. Metode penyarian..... 7
a. Maserasi..... 7
b. Perkolasi..... 8
c. Penyarian berkesinambungan..... 8
d. Infundasi..... 9

e. Destilasi uap..... 10
4. Toksisitas..... 10
a. Mekanisme efek toksik..... 11
b. Metode uji toksisitas..... 11
c. *Median Lethal Concentration*..... 12
5. *BST* (*Brine Shrimps Lethality Test*)..... 12
6. *Artemia salina* Leach..... 13
a. Klasifikasi..... 13
b. Morfologi..... 14
c. Lingkungan hidup..... 15
d. Perkembangan dan siklus hidup..... 15
e. Penetesan telur Artemia..... 17
f. Penggunaan *Artemia salina* Leach..... 17
7. Kromatografi..... 18
a. Kromatografi Lapis Tipis..... 19
b. Fase diam..... 19
c. Fase gerak..... 19
d. Bejana pemisah dan penjenuhan..... 20
e. Awal dan jumlah cuplikan..... 20
f. Pengembangan..... 21
g. Larutan pembanding..... 21
h. Deteksi senyawa yang dipisah..... 21
8. Kanker..... 22
a. Obat anti kanker..... 23
b. Uji aktivitas anti kanker..... 23
B. Keterangan Empiris..... 25
BAB. III METODE PENELITIAN..... 26
A. Bahan dan Alat..... 26
1. Bahan..... 26
2. Alat..... 26
B. Cara Penelitian..... 27

1. Determinasi..... 27
2. Penyiapan bahan utama..... 27
3. Ekstraksi daun kembang bugang..... 27
4.Uji toksisitas..... 29
a. Penyiapan air laut..... 29
b. Penyiapan sampel uji..... 29
c. Penetasan telur *Artemia salina* Leach..... 29
d. Pemeriksaan toksisitas terhadap Artemia salina Leach.... 30
e. Cara analisis data..... 31
f. Profil kromatografi lapis tipis..... 32
C. Analisis hasil..... 32
BAB. IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN..... 34
A. Determinasi Tanaman..... 34
B. Pengumpulan Bahan..... 34
C. Penyarian Bahan..... 35
D. Penetesan *Artemia salina* Leach..... 38
E. Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimps Lethality Test*... 39
F. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis..... 44
BAB. V KESIMPULAN DAN SARAN..... 54
A. Kesimpulan 54
B. Saran..... 55
DAFTAR PUSTAKA..... 56
LAMPIRAN..... 59

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Morfologi *Artemia salina* Leach..... 15
Gambar 2. Siklus hidup *Artemia salina* Leach..... 16
Gambar 3. Skema cara fraksinasi..... 28
Gambar 4. Skema uji toksisitas akut dengan metode *BST*..... 30
Gambar 5. Kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform..... 46
Gambar 6. Kromatogram uji senyawa flavonoid fraksi kloroform..... 48
Gambar 7. Kromatogram uji senyawa fenol fraksi kloroform..... 50
Gambar 8. Kromatogram uji senyawa saponin fraksi kloroform..... 52

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel I.	Kriteria ketoksikan LC_{50}.....	11
Tabel II.	Penyiapan larutan sampel dari larutan induk 5 µg/ml.....	29
Tabel III.	Rendemen masing-masing ekstrak dari 50 gram serbuk daun kembang bugang.....	38
Tabel IV.	Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi petroleum eter setelah 24 jam.....	41
Tabel V.	Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi kloroform setelah 24 jam.....	42
Tabel VI.	Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi etanol setelah 24 jam.....	42
Tabel VII.	Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi akuades setelah 24 jam.....	42
Tabel VIII.	Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach.....	43
Tabel IX.	Persamaan garis lurus hasil uji *BST* terhadap fraksi daun kembang bugang.....	43
Tabel X.	Harga LC_{50} pada uji toksisitas fraksi daun kembang bugang terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *BST*.....	43
Tabel XI.	Data uji KLT senyawa alkaloid dari fraksi kloroform.....	45
Tabel XII.	Data uji KLT senyawa flavonoid dari fraksi kloroform.....	47
Tabel XIII.	Data uji KLT senyawa fenol dari fraksi kloroform.....	49
Tabel XIV.	Data uji KLT senyawa saponin dari fraksi kloroform.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1.	Surat keterangan determinasi.....	59
Lampiran 2.	Foto tanaman *Clerodendrum calamitosum* L.....	60
Lampiran 3.	Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach.....	61
Lampiran 4.	Hasil analisis probit fraksi petroleum eter.....	62
Lampiran 5.	Hasil analisis probit fraksi kloroform.....	66
Lampiran 6.	Hasil analisis probit fraksi etanol.....	70
Lampiran 7.	Hasil analisis probit fraksi akuades.....	74
Lampiran 8.	Tabel Probit.....	78
Lampiran 9.	Foto kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV366	79
Lampiran 10.	Foto kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorf	80
Lampiran 11.	Foto kromatogram uji senyawa flavonoid fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV366.....	81
Lampiran 12.	Foto kromatogram uji senyawa flavonoid fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Aluminium (III) klorida....	82
Lampiran 13.	Foto kromatogram uji senyawa fenol fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV366.....	83
Lampiran 14.	Foto kromatogram uji senyawa fenol fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Besi (III) klorida.....	84
Lampiran 15.	Foto kromatogram uji senyawa saponin fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV366.....	85
Lampiran 16.	Foto kromatogram uji senyawa saponin fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard	86
Lampiran 17.	Foto alat-alat yang digunakan dalam uji toksisitas dengan Metode *BST*.....	87
Lampiran 18.	Foto telur dan nauplius *Artemia salina* Leach.....	88

UJI TOKSISITAS AKUT DAUN KEMBANG BUGANG (*Clerodendrum calamitosum* L.) DENGAN METODE *Brine Shrimps Lethality Test* (*BST*) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI PALING AKTIF

INTISARI

Pemanfaatan tanaman obat semakin berkembang, salah satu tanaman yang banyak dimanfaatkan yaitu, *Clerodendrum calamitosum* L atau yang biasa dikenal dengan kembang bugang. Tanaman suku Verbenaceae ini banyak digunakan masyarakat sebagai penghenti pendarahan, penghancur batu ginjal serta sebagai obat untuk penyakit demam, wasir, digigit ular, kencing batu, *gonorrhea*, *syphilis*, disentri dan *menorrhagia*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas fraksi dari *Clerodendrum calamitosum* L terhadap *Artemia salina* Leach. Uji toksisistas dengan metode fraksinasi (petroleum eter, kloroform, etanol, air) dalam pelarut yang sesuai, dan dibuat satu seri konsentrasi bagi tiap-tiap fraksi (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml dan 1000 µg/ml). Kontrol negatif dibuat sama dengan sampel tetapi tanpa ekstrak uji. Pada masing-masing flakon yang telah berisi sampel dengan konsentrasi tertentu dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach yang telah berumur 48 jam, dan ditambah air laut sampai volume 5 ml. Perhitungan larva yang mati dilakukan 24 jam setelah perlakuan. Identifikasi kandungan senyawa kimia dalam fraksi aktif dilakukan dengan KLT. Uji dengan organisme ini dapat digunakan untuk menentukan aktivitas farmakologi ekstrak tumbuhan yang ditujukan sebagai toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hasil uji toksisitas akut fraksi daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BST menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter memiliki nilai LC_{50} 142,33 µg/ml, fraksi kloroform memiliki LC_{50} 74,97 µg/ml, fraksi etanol memiliki nilai LC_{50} 114,45 µg/ml dan fraksi akuades memiliki nilai LC_{50} 139,89 µg/ml. Fraksi kloroform merupakan fraksi yang paling aktif. Fraksi paling aktif dari daun kembang bugang mengandung senyawa fenol dan saponin.

Kata kunci : Daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.), *Artemia salina* Leach, *Brine Shrimps Lethality Test* (*BST*), LC_{50}.

ACUTE TOXICITY TEST OF *Clerodendrum calamitosum* L. FOLIUM WITH BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST (BST) METHODS AND THE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY PROFILE OF THE MOST ACTIVE FRACTION

ABSTRACT

Taking the advantage of medicinal plants has rapidly increased; one of the plants is *Clerodendrum calamitosum* L. or usually is acquainted with "kembang bugang". The family of Verbenaceae is used to stopped blooding, to crush stone in the kidney, also as a medicine for fever, hemorrhoids, to bite the snake, dysuria, gonorrhea, syphilis, dysentery, and menorrhagia. This research purposes the find out acute toxicity fraction of *Clerodendrum calamitosum* L. on *Artemia salina* Leach. Examined toxicity with methods of *Brine Shrimps Lethality Test* (BST), was conducted by dissolving each fraction (petroleum ether, chloroform, ethanol and aquadest) in appropriate solvent, and structured in one concentrated series for each fraction (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml). The negative control was made up equal to sample without tested fraction. Each flacon containing sample witch certain concentration was fill in ten larva of *Artemia salina* Leach of 48 hours after treatment. Identification of chemical compounds content in the most active fraction was carried out by thin layer chromatography (TLC). Test by mean of organism can used to determine the bio activities of fraction herb referred as toxicity for larva of *Artemia salina* Leach. This result of BST was expected that it could be used to asses effectiveness and potency of herbal extract that may be used for cure. The tested results reveals that the fraction is toxic to larva *Artemia salina* Leach if the herbal fraction contains $LC_{50} < 1000$ µg/ml. Results of the acute toxicity test of fraction *Clerodendrum calamitosum* L. folium to larva *Artemia salina* Leach with methods brine shrimps lethality test (BST) represent that petroleum ether fraction have value of LC_{50} is 142,33 µg/ml, chloroform fraction have value of LC_{50} is 74,97 µg/ml, ethanol fraction value of LC_{50} is 114,45 µg/ml, and aquadest fraction have value of LC_{50} is 139,89 µg/ml. Chloroform extract is the most active fraction. The most active fraction of folium is identified that the fraction contains the phenolics and saponin.

Key word : *Clerodendrum calamitosum* L. folium, *Artemia salina* Leach, Brine Shrimps Lethality Test (BST), LC_{50}.

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan salah satu ancaman yang utama dalam dunia kesehatan. Penyakit ini ditakuti oleh sebagian besar manusia karena sifatnya yang mematikan dan belum ada obat yang poten. Kanker adalah jenis tumor yang ganas (Kuswibawati, 2000). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), setiap tahun penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta dan 10 tahun mendatang diperkirakan 9 juta meninggal akibat kanker. Di Indonesia diperkirakan setiap tahun terdapat 100 penderita baru dari setiap 100.000 penduduk dan penyakit kanker menduduki urutan ke-3 penyebab kematian sesudah penyakit jantung dan paru-paru (Nuratmi dkk, 2000).

Kanker adalah penyakit dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme mutiseluler. Sel kanker mengganggu tuan rumah karena menyebabkan desakan akibat pertumbuhan tumor, penghancuran jaringan tempat tumor berkembang atau bermetastasis dan gangguan sistemik lain sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker (Nafrialdi dan Gan, 1995).

Pengobatan kanker yang saat ini dilakukan yakni radiasi, kemoterapi, pembedahan, terapi hormonal, dan penggunaan obat-obat sintetik yang dapat memberikan efek samping yang cukup besar. Oleh karena itu penggunaan obat yang berasal dari tumbuhan merupakan salah satu alternatif pilihan yang terus dikembangkan dalam upaya menemukan obat kanker dengan efek samping yang lebih kecil, selain itu penggunaan obat tradisional biayanya lebih murah, lebih mudah didapat dan diramu sendiri (Anonim, 2001). Indonesia sendiri merupakan negara yang kaya akan berbagai jenis tanaman yang banyak digunakan sebagai obat tradisional, namun sebagian besar tanaman obat Indonesia belum diketahui dengan pasti kandungan kimianya, apalagi kandungan kimia yang berkhasiat. Penggunaan obat tradisional masih banyak yang belum didasarkan atas penelitian ilmiah. Dalam program pembinaan penggunaan tanaman obat tradisional,

B. Perumusan Masalah

Berdasar permasalahan yang diuraikan pada latar belakang masalah, hal-hal yang perlu dikaji dalam penelitian ini adalah :

1. Seberapa besar potensi ketoksikan dari *Clerodendrum calamitosum* L. dengan menggunakan metode kematian *Artemia salina* Leach ?
2. Golongan senyawa apa saja yang terkandung dalam fraksi yang paling aktif ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan :

1. Untuk mengetahui ketoksikan akut dari *Clerodendrum calamitosum* L. terhadap *Artemia salina* Leach.
2. Untuk mengetahui kemungkinan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak *Clerodendrum calamitosum* L.

D. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa fraksi daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) mempunyai sifat toksisitas akut terhadap *Artemia salina* Leach sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji bioaktivitas antitumor ekstrak daun kembang bugang dengan menggunakan biakan sel kanker untuk mengetahui apakah fraksi daun kembang bugang dapat digunakan sebagai obat sitotoksik. Serta mengetahui kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam daun kembang bugang yang dapat berkhasiat sebagai obat sitotoksik.

BAB II
STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Uraian tanaman

a. Klasifikasi

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Anak kelas : Dialypetalae
Bangsa : Tubiflorae
Suku : Verbenaceae
Jenis : *Clerodendrum calamitosum* L.

(Backer and Bakhuizen van den Brink, 1965)

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA PERPUSTAKAAN FMIPA

b. Nama daerah

Melayu : kayu gambir
Sunda : kembang bugang
Jawa : keji beling
Bahasa Inggris : Clerodendron calamitosum L.

c. Morfologi

Menurut Anonim (2006) di Jawa, terdapat dari dataran rendah sampai 750 m dpl, terutama pada daerah dengan musim kemarau yang panjang ditemukan dan di tempat-tampat yang ternaungi. Tanaman ini dapat ditemukan disekitar kampung, di kebun, tepi hutan dan jalan, kadang ditanam di pekarangan sekitar rumah sebagai tanaman hias atau tanaman obat. Perdu, tumbuh tegak, tinggi 0,5 – 1 m, berakar tunggang dengan tunas akar menjalar dibawah tanah, bagian yang muda berambut pendek dan rapat. Batang berkayu, bercabang, diameter sekitar 1 cm, warnanya putih kehijauan. Daun tunggal, bertangkai, letak berhadapan, bentuknya bulat telur, tepi bergerigi, ujung dan pangkal meruncing, panjang 4-9 cm, lebar 1,5-4 cm, pertulangan menyirip, warnanya hijau. Bunganya bunga majemuk berkumpul dalam malai yang keluar dari ketiak daun, dengan 5 mahkota

bunga berwarna putih yang bercangap sampai pada pangkalnya. Benangsari dan tangkai putik menjulang diluar mahkota. Buahnya buah batu, bentuknya bulat pipih berwarna hitam mengkilat, diameter sekitar 1 cm, dengan kelopak buah berwarna merah tua mengkilat. Bijinya keras, kecil, warnanya hitam. Perbanyakan dengan menggunakan biji atau stek batang. Pemeliharaan mudah, perlu cukup air dengan cara penyiraman yang cukup, menjaga kelembaban dan pemupukan terutama pupuk dasar.

d. Efek farmakologi

Tanaman ini memiliki sifat menghentikan pendarahan, penghancur batu ginjal.

e. Khasiat

Penyakit yang dapat disembuhkan antara lain demam, wasir, digigit ular, kencing batu, g*onorrhea*, *syphilis*, disentri dan *menorrhagia*.

f. Kandungan kimia

Daun dan akar kembang bugang mengandung saponin dan flavonoid. Pada daun juga ditemukan senyawa fenol dan pada akar terdapat alkaloid.

2. Uraian kandungan senyawa tanaman

a. Flavonoid

Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C_6-C_3-C_6. Artinya, kerangka karbonnya terdiri dari dua gugus C_6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida (Robinson, 1995).

Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh tetapi beberapa kelas lebih tersebar daripada yang lainnya, flavon dan flavonol terdapat semesta, sedangkan isoflavon dan biflavonol hanya terdapat pada beberapa suku tumbuhan. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu, sering terdapat campuran yang terdiri dari flavonoid yang berbeda kelas (Harborne, 1987).

b. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari siklik. Alkaloid biasanya tanwarna, sering kali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar. Secara kimia, alkaloid merupakan suatu golongan heterogen. Fungsi alkaloid dalam tumbuhan masih sangat kabur, meskipun masing-masing senyawa telah dinyatakan terlibat sebagai pengatur tumbuh, atau penghalau atau penarik serangga (Harborne, 1987).

c. Saponin

Saponin mula-mula diberi nama demikian karena sifatnya yang menyerupai sabun (bahasa latin *sapo* berarti sabun). Saponin adalah senyawa aktif permukan yang kuat yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah (Robinson, 1995).

Dalam larutan yang sangat encer saponin sangat beracun untuk ikan, dan tumbuhan yang mengandung saponin telah digunakan sebagai racun ikan selama beratus-ratus tahun. Pada beberapa tahun terakhir ini saponin tertentu menjadi penting karena dapat diperoleh dari beberapa tumbuhan dengan hasil yang baik dan digunakan sebagai bahan baku untuk sintesis hormon steroid yang digunakan dalam bidang kesehatan (Robinson, 1995).

d. Senyawa fenol

Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya mereka sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1987). Kelarutan dalam air bertambah jika gugus hidroksil makin banyak, tetapi kelarutan dalam pelarut organik yang polar umumnya tinggi (Robinson, 1995).

Aktivitas senyawa fenolik tumbuhan banyak dan beragam. Sekurang-kurangnya ada dugaan bahwa beberapa senyawa mempunyai fungsi penting pada fisiologi-dalam dari tumbuhan pembuatnya, sementara senyawa yang lain berperan penting dalam hubungan ekologi (Robinson, 1995).

3. Metode penyarian

Ekstraksi adalah proses penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan terdiri dari campuran yang heterogen, ada beberapa mempunyai efek farmakologi (dibutuhkan) ada juga yang inert (tidak dibutuhkan). Untuk itu sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak digunakan. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ansel, 1989; Voight, 1984).

Cara penyarian dapat dibedakan menjadi maserasi, perkolasi, penyarian berkesinambungan, infundasi, destilasi uap.

a. Maserasi

Istilah maserasi berasal dari bahasa latin *macerase* yang artinya merendam. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat Farmakope Indonesia (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) direndam dalam bahan pengekstraksi yang selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dikocok kembali. Waktu lamanya berbeda-beda menurut Farmakope antara 4-10 hari. Selesainya masa maserasi ditandai dengan terjadinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan telah tercapai maka proses difusi segera berakhir, sehingga perlu dikocok berulang-ulang untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat didalam cairan. Pada tahap akhir rendamam diperas dan selesainya juga diperas lagi. Cairan maserasi dan cairan yang diperoleh dari hasil perasan disatukan, selanjutnya diatur sampai mencapai pada kadar dan jumlah yang diinginkan dengan cairan hasil pencucian sisa perasan dengan menggunakan bahan pengekstraksi. Hasil ekstraksi disimpan dalam kondisi dingin selama beberapa hari, lalu cairannya dituang dan disaring. Secara teoritis pada metode maserai

dihubungkan dengan labu melalui pipa. Labu tersebut berisi bahan pelarut yang menguap dan mencapai ke dalam pendingin aliran balik melalui pipet, berkondensasi di dalamnya, menetes keatas bahan yang diekstraksi dan menarik bahan yang diekstraksi keluar. Larutan berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimal secara otomatis dipindahkan kedalam labu. Dengan demikian zat yang terekstraksi terakumulasi melalui penguapan bahan pelarut murni berikutnya. Pada cara ini diperlukan bahan pelarut dalam jumlah kecil, juga simplisia selalu baru artinya suplai bahan pelarut bebas bahan aktif, berlangsung secara terus menerus (pembaharuan pendekatan konsentrasi secara kontinue) keburukannya adalah waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi cukup lama sampai beberapa jam sehingga kebutuhan energinya tinggi (listrik, gas). Selanjutnya simplisia di bagian tengah alat pemanas langsung berhubungan dengan labu, dimana bahan pelarut menguap. Pemanasan bergantung dari lama ekstraksi. Khususnya dari titik didih bahan pelarut yang digunakan dapat berpengaruh negatif terhadap bahan tumbuhan yang peka suhu (glikosida, alkaloida). Demikian pula bahan terekstraksi yang terakumulasi dalam labu mengalami beban panas dalam waktu yang lama. Meskipun cara soxhlet sering digunakan dalam laboratorium penelitian untuk pengekstraksi tumbuhan namun peranannya dalam pembuatan sediaan obat dari tumbuhan kecil artinya (Voight, 1984).

d. Infundasi

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90 ^{0}C selama 15 menit. Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kapang dan kuman. Oleh karena itu sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Anonim, 1989).Infus dibuat dengan cara membasahi bahan baku, biasanya dengan air 2 kali bobot bahan, untuk bunga 4 kali dan karagen 10 kali bobot bahan, dan bahan baku ditambuh air dan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 90 – 98 ^{0}C.

e. Destilasi uap

Untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen dengan titik didih tinggi pada tekanan udara normal. Untuk mencegah kemungkinan kerusakan zat aktif akibat pemanasan biasa.

4. Toksisitas

Toksisitas merupakan istilah relatif yang dipergunakan dalam memperbandingkan satu zat kimia dengan zat yang lain. Perbandingan antara zat kimia seperti ini sangat tidak informatif , kecuali jika pernyataan tersebut melibatkan tentang mekanisme biologi yang sedang dipermasalahkan dan juga dalam kondisi mana zat kimia tersebut berbahaya. Karena itu pendekatan toksikologi adalah dari segi studi tentang berbagai efek zat kimia itu dan berbagai kondisi dimana efek itu terjadi (Loomis, 1978).

Sumber zat toksik banyak dan bervariasi serta terdiri dari berbagai klasifikasi. Secara sederhana dapat dibedakan menjadi zat toksik yanng berasal dari sumber alam (tanaman, hewan atau sumber mineral) dan zat toksik buatan atau sintesis (Cassarett and Doull, 1975). Untuk senyawa baru (belum dikenal), kriteria awal yang biasa digunakan adalah dengan mempergunakan kematian sebagai indeks untuk memperkirakan dosis lethal yang mungkin terjadi pada manusia.

Kematian merupakan salah satu diantara beberapa kriteria toksisitas yaitu dengan menggunakan senyawa dosis maksimal, kemudian kematian hewan percobaan dicatat. Harga *median lethal concentration* (LC_{50}) atau *median lethal dose* (LD_{50}). Paling banyak digunakan untuk mengukur kematian.

Kematian hewan percobaan digunakan sebagai pedoman untuk memperkirakan dosis kematian pada manusia. Perkiraan ini biasanya dari pengalaman pada manusia LD_{50} atau LC_{50} pada hewan percobaan (Cassarett and Doull, 1975). Kriteria ukuran ketoksikan menurut Loomis (1978) dapat dilihat pada tabel I.

tahun atau senyawa kimia uji diberikan selama sebagian besar massa makhluk hidup uji (Burger, 1970).

c. *Median Lethal Concentration*

Median Lethal Concentration (*MLC*) yaitu konsentrasi yang dapat membunuh 50 % hewan uji (Paget, 1970). *Median lethal concentration* merupakan indikator untuk toksisitas senyawa (Mulyani, 1995).

Harga LC_{50} yang mencerminkan toksisitas terhadap hewan uji. Semakin tinggi nilai LC_{50} berarti semakin rendah toksisitasnya, karena nilai LC_{50} yang rendah mencerminkan tingginya toksisitas. Pada tingkat konsentrasi *lethal*, satuan yang digunakan dapat berupa berat per volume atau volume per volume (Sumantri dan Martono, 1996, cit Farmiati, 1998).

Metode penetapan aktivitas dengan menggunakan *Artemia salina* yang kini banyak digunakan. Metode ini banyak digunakan untuk mendeteksi dan mengisolasi senyawa tumbuhan yang berefek sitotoksik. Adapun caranya menentukan harga LC_{50} dari senyawa aktif, ekstrak dan fraksi tumbuhan dengan cara membuat macam-macam kadar dari senyawa, ekstrak, fraksi tumbuhan kemudian diperlakukan terhadap *Artemia salina*. Jumlah *Artemia salina* yang mati dan yang masih hidup pada tiap kadar dihitung untuk menentukan harga LD_{50} (Meyer *et al*., 1982).

Keunggulan metode ini adalah pelaksanaannya sederhana, relatif singkat, dapat dipercaya dan cukup memerlukan dosis kecil maka digunakan untuk penetapan aktivitas biologis pada penelitian bahan alami.

5. BST (*Brine Shrimps Lethality Test*)

Brine Shrimps Lethality Test (*BST*) merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan ketoksikan suatu ekstrak ataupun senyawa. Metode ini kemudian berkembang sebagai salah satu metode "bioassay" dalam mengisolasi senyawa zat aktif yang terdapat dalam suatu ekstrak tanaman. Lebih jauh lagi bahwa bioassay ini sering dikaitkan dengan metode dalam isolasi senyawa anti kanker dari tumbuhan (Wahyuono dan Radiman, 1995, cit Farmiati, 1998).

Metode *BST* merupakan metode pengujian toksisitas suatu bahan dengan organisme uji berupa nauplii (larva) *Artemia salina* Leach. Untuk keperluan ini

digunakan larva udang *Artemia salina* yang berumur 48 jam (2 hari). Artemia merupakan hewan laut golongan crustacea dengan ukuran dewasa $\leq$ 2 mm. Penggunaan yang luas metode ini pada mulanya adalah untuk mengetahui tingkat toksisitas suatu sediaan (bahan kimia) (Dwiatmaka, 2000).

BST merupakan suatu metode untuk menguji ketoksikan suatu senyawa dengan menggunakan larva udang A. salina L. uji toksisitas ini dapat dilihat dari jumlah kematian larva udang. Metode ini memiliki keuntungan yaitu : cepat, murah, sederhana karena tidak memerlukan teknik aseptis, keterulangannya tinggi. Untuk menjalankannya tidak memerlukan alat-alat khusus atau latihan khusus dan membutuhkan relatif sedikit sampel untuk tes (Meyer *et al.*, 1982).

Uji ketoksikan dengan metode *BST* termasuk uji ketoksikan akut. Uji ini dirancang untuk menentukan efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah pemberian dosis uji. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam.

Secara umum suatu senyawa yang bersifat sitotoksis juga menunjukkan sifat toksiknya terhadap artemia (Dwiatmaka, 2000). Uji toksisistas akut dengan hewan uji *artemia salina* learch dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah ke uji sitototoksik, karena ada kaitan antara uji toksisitas akut dengan uji sitotoksik jika harganya LC_{50} dari uji toksisitas akut < 1000 mg/ml (Meyer *et al.*, 1982). Dengan menghasilkan nilai LC_{50} kurang dari 1000 mg/ml, pantas untuk dilanjutkan dengan pengujian anti kanker (sitotoksitas) dengan biakan sel kanker (Dwiatmaka, 2000).

6. *Artemia Salina* Leach

Udang renik air asin (Brine shrimp) atau artemia merupakan sejenis udang-udangan primitif. Pada tahun 1819 nama tersebut diubah oleh leach menjadi artemia salina.

a. Klasifikasi

Kingdom : Animal
Sub kingdom : Metozoa
Phylum : Arthropoda
Sub phylum : Mandibulata
Classis : Crustaceae

Sub classis : Branchiopoda
Ordo : Anostraca
Family : Artemiidae
Genus : Artemia
Species : *Artemia salina* Leach

(Mudjiman, 1995).

b. Morfologi

Artemia salina L diperdagangkan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista ini apabila dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter berkisar antara 224,7 – 267,0 mm dan beratnya rata-rata 4,885 mg (Harefa, 2003).

Bentuk artemia dewasa menyerupai udang kecil. Ukurannya hanya 10-20 mm. Bagian kepala berukuran lebih besar dan kemudaian mengecil hingga ke bagian ekor. Panjang ekor besar dan lebih sepertiga dari total panjang tubuh. Pada bagian kepala terdapat sepasang mata dan sepasang antenula (sungut). Pada bagian tubuh terdapat sebelas pasang kaki atau secara khusus disebut torakopoda. Jumlah kakinya inilah yang membedakan artemia dengan spesies dari kelas Crustacea. (Harefa, 2003).

Gambar 1. Morfologi *Artemia salina* Leach (Harefa, 2003)

c. Lingkungan hidup

Artemia salina hidup di planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 40-300 permil). Untuk pertumbuhan artemia yang baik maka suhu yang dikehendaki berkisar antara 25^0 C – 30^0 C, oksigen larut sekitar 3 ml/L dan pH 7,3 – 8,4. Diperairan alam makanannya terdiri dari detritus bahan organik (sisa-sisa jasad hidup yang sedang menghancur), ganggang-ganggang renik (ganggang hijau, biru, diatomae), bakteri dan cendawan (ragi laut). Artemia dapat menelan makanan yang berukuran kecil yaitu kurang lebih 50 μ atau yang lebih kecil (Mudjiman, 1995).

d. Perkembangan dan siklus hidup

Artemia salina Leach dapat dibedakan antara individu yang berkelamin jantan dan betina. Perkembangbiakan *Artemia salina* Leach dilakukan secara generatif dan dihasilkan kista yang berbentuk butir-butir halus. Apabila kista tersebut direndam ke dalam air laut dengan salinitas 30-35 pupuk maka akan terjadi hidrasi. Setelah 24 jam, membran luar akan pecah dan kista menetas

menjadi embrio. Beberapa jam kemudian embrio berkembang menjadi nauplus dan mampu berenang bebas di dalam air (Harefa, 2003).

Berdasarkan cara perkembangannya dikenal dua golongan artemia yaitu : jenis biseksual dan jenis partenogenik. Artemia jenis biseksual dan partenogenesis perkembangbiakannya terjadi secara ovovivipar dan ovivar. Pada ovovivipar yang keluar dari induknya sudah berupa anak atau burayak yang dikenal nauplius, karena bisa langsung hidup sebagai artemia muda. Sedangkan pada cara ovipar yang keluar dari induknya berupa telur yang disebut siste, untuk dapat menjadi banyak masih harus melalui proses penetasan dahulu (Mudjiman, 1995).

Perkembangan artemia jenis biseksual harus melalui proses perkawinan induk jantan dan betina. Sedangkan jenis partenogenesis tidak ada perkawinan, karena tidak ada pejantan, jadi betina akan beranak dengan sendirinya tanpa perkawinan.

Artemia mulai dewasa sekitar dua minggu, artemia dewasa dapat hidup sampai 6 bulan. Sementara itu induk betina akan beranak atau bertelur 4-5 kali sehari, setiap kali dihasilkan 50-300 telur atau nauplius. Nauplius akan menjadi dewasa setelah berumur 14 hari dan siap untuk berkembang biak (Mudjiman, 1995).

Gambar 2. Siklus hidup *Artemia Salina* Leach (Harefa, 2003)

e. Penetasan telur artemia

Untuk menetaskan telur artemia, kita memerlukan wadah yang bening. Telur dapat ditetaskan dalam air laut biasa (kadar garam kuran g lebih 30 permil). Untuk mencapai hasil penetasan yang baik, perlu penggunaan air laut berkadar 15 permil. Suhu air yang baik selama proses penetasan adalah antara 29-30 °C. Sebelum telur ditetaskan sebaiknya dicuci dalam air tawar selama satu jam. Kemudian disaring dengan kain saring 125 mikro sambil disemprotkan air. Setelah itu ditiriskan sampai airnya tuntas baru diteteskan. Jumlah kepadatan telur antara 5-7 g/l (Mudjiman, 1995).

Ada beberapa tahapan proses penetasan artemia, yaitu tahap hidrasi, tahap cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul dengan tahap payung yang terjadi beberapa saat nauplius keluar dari cangkang (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

Nauplius berwarna orange berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron dan berat 0,002 mg. Nauplius berangsur-angsur mengalami perkembangan dan perubahan morfologis dengan 15 kali pergantian kulit hingga dewasa biasanya berukuran 8-10 mm yang ditandai dengan adanya mata yang jelas terlihat pada kedua sisi bagian kepala, antena sebagai alat sensori,saluran pernafasan terlihat jelas dan 11 pasang thorakopoda. Pada artemia jantan antena berubah menjadi alat penjepit. Sepasang penis terdapat di bagian belakang tubuh, sedangkan pada artemia betina antena mengalami penyusutan. Sepasang indung telur atau ovari terdapat di kedua sisi pencernaan di belakang thorakopada (Mudjiman, 1995).

f. Penggunaan *Artemia salina* Leach

Banyak sumber bahan alam di Indonesaia yang telah digunakan secara tradisional sebagai bahan obat, namum pada umumnya penggunaannya belum diuji secara ilmiah. Oleh karena itu, diperlukan penelitian-penelitian, baik penelitian aktivitas spesifik maupun aktivitas umum kandungan aktif bahan obat tersebut.

Meyer *et al.* (1982) melaporkan suatu metode uji hayati yang tepat dan murah untuk skrinning ekstrak tanaman aktif dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. Artemia sebelumnya telah digunakan dalam bermacam uji hayati seperti uji peptisida, polutan, mikotoksin, anestesi, komponen seperti morfin, kekarsinogen, dan toksikan dalam air laut. Uji dengan organisme ini sesuai toksisitas terhadap *artemia salina.* Penelitian dengan menggunakan *Artemia salina* Leach memiliki beberapa keuntungan antara lain cepat, mudah, murah dan sederhana (Meyer *et al.*, 1982).

Uji dengan menggunakan *Artemia salina* Leach ini banyak digunakan dan diasumsikan untuk uji sitotoksik dan anti kanker. Hasil uji ini telah dibuktikan secara *invivo* dengan menggunakan sel tumor dan sel kanker dengan hasil baik dan ternyata dalam beberapa hal terdapat ada korelasi (Rupprecht *et al.*, 1990).

7. Kromatografi

Kromatografi didefinisikan sebagai pemisahan oleh perbedaan partisi dari senyawa kimia karena distribusi antara 2 fase, fase yang satu tidak bergerak sedangkan yang lain bergerak.

Pemisahan secara kromatografi dilakukan dengan cara mengotak-atik langsung beberapa sifat fisika umumnya dari molekul. Sifat umumnya yang terlibat :

1. Kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan)
2. Kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsopsi, penyerapan),
3. Kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap (keatsirian)

Pada sistem kromatografi, campuran yang akan dipisahkan ditempatkan dalam keadaan sedemikian rupa sehingga komponen-komponennya harus menunjukkan dua dari tiga sifat tersebut (Stahl, 1985).

Kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi gas. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya lebih berguna untuk uji identifikasi karena cara khas dan mudah dilakukan (Anonim, 1979).

a. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu cara pemisahan yang berdasar pada pembagian campuran dua senyawa dalam dua fasa yaitu fasa gerak dan fasa diam yang berupa lapisan tipis. Stahl berhasil mengembangkan metode KLT dan banyak digunakan dalam berbagai bidang ilmu. Keuntungan dari metode ini antara lain alatnya sederhana, cepat, dan relatif murah. Sedangkan kerugiannya sukar disimpan, ketelitiannya dan ketepatannya kurang (Stahl, 1985).

Lapisan yang memisahkan antara fasa diam ditempatkan pada penyangga berupa pelat kaca, logam atau lapisan yang cocok maka akan terjadi pemisahan melalui perambatan kapiler (Stahl, 1985).

Untuk campuran yang tidak diketahui, lapisan pemisah dan sistem larutan pengembang harus dipilih dengan tepat. Karena keduanya bekerjasama untuk mencapai pemisah, selain itu juga penting adalah kondisi kerja optimum yang meliputi sifat pengembangan, atmosfer dan lain-lain (Stahl, 1985).

b. Fase diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT adalah bahan penyerap (adsorben). Silika gel merupakan bahan penyerap yang paling banyak digunakan dalam KLT. Umumnya ditambahkan dengan bahan pengikat untuk memberikan kekuatan pelekatan pada pendukungnya. Bahan pengikat yang sering digunakan adalah kalsium sulfat (gypsum). Silika gel yang diberi tambahan ini dikenal dengan istilah silika gel GF. Bahan penyerap lain yang sering digunakan adalah alumina, selulosa, poliamida, kieselguhr dan amilum (Sudjadi, 1989; Gandjar, 1991).

c. Fase gerak

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri dari satu atau beberapa pelarut. Fase gerak tersebut bergerak di dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori karena ada daya kapiler, sedangkan yang digunakan adalah pelarut bertingkat mutu analitik dan bila diperlukan sistem pelarut multi komponen harus berupa suatu campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimal tiga komponen (Stahl, 1985).

Pemilihan fasa gerak KLT berdasarkan polaritas komponen yang akan dipisahkan. Pada kromatografi serap, fasa gerak dapat dikelompokkan ke dalam

deret elutropik, efek eluasi akan naik dengan naiknya kepolaran fasa gerak. Misalnya heksan non polar mempunyai elusi lemah, kloroform cukup kuat, dan methanol yang bersifat polar efek eluasinya kuat (Stahl, 1985).

Selain pelarut tunggal dapat juga digunakan campuran pelarut tetapi tidak boleh lebih dari tiga jenis pelarut sebab campuran yang lebih kompleks akan cepat mengalami perubahan fasa terhadap perubahan suhu. Dalam hal ini kemurnian pelarut penting karena digunakan dalam pemisahan sampel yang jumlahnya sedikit (Gandjar, 1991). Sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin. Salah satu alasan daripada penggunaan itu ialah mengurangkan serapan dari setiap komponen dari campuran pelarut. Campuran yang baik memberikan fase-fase bergerak yang mempunyai kekuatan bergerak sedang, tetapi sebaiknya dicegah sejauh mungkin tercampur lebih dari dua komponen, terutama karena campuran yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan-perubahan fase-fase terhadap perubahan-perubahan suhu (Sastrohamidjojo, 2001).

Hasil pemisahan yang baik terlihat dari kenyataan bahwa penyerap dalam KLT mempunyai kapasitas yang lebih besar apabila dibandingkan dengan kertas (Sastrohamidjojo, 1991).

d. Bejana pemisah dan penjenuhan

Bejana harus dapat menampung pelat 200 x 200 mm dan harus tertutup rapat untuk kromatografi dalam bejana yang jenuh, secarik kertas saring bersih yang lebarnya 18 – 20 cm dan panjangnya 45 cm ditaruh pada dinding sebelah dalam bejana berbentuk U dan dibasahi dengan pelarut pengembang. Tingkat kejenuhan bejana dengan uap pelarut pengembang mempunyai pengaruh yang nyata pada pemisahan dan letak bercak pada kromatogram. Jika pelarut pengembang naik dalam lapisan, sebagian menguap di daerah garis depan pelarut pengembang itu (Stahl, 1985).

e. Awal dan jumlah cuplikan

Bercak atau pita ditotolkan pada jarak 15 mm dari tepi bawah lapisan jarak suatu bercak awal, yang berukuran 3-5 mm ke bercak awal lainnya dan jarak antara bercak paling pinggir dengan tepi samping sekurang-kurangnya 10 mm.

Lapisan tidak boleh rusak selama penotolan cuplikan itu. Biasanya ditotolkan 1-10 µl larutan cuplikan 0,1 – 1%. Untuk menotolkan disarankan agar menggunakan mikropipet berujung runcing, khusus berskala 1µl (1 ml = 1000 µl). larutan yang keatsiriannya rendah atau jumlahnya besar, ditotolkan sebagian-sebagian, dalam hal ini pelarut dibiarkan menguap dahulu sebelum penotolan berikutnya dilakukan (Stahl, 1985).

f. Pengembangan

Pengembangan ialah proses pemisahan campuran cuplikan akibat pelarut mengembang merambat naik dalam lapisan. Jarak pengembangan normal yaitu jarak antara awal dan garis 100 mm. Di samping pengembang sederhana, yaitu perambatan satu kali sepanjang 10 cm ke atas, pengembangan ganda dapat juga digunakan untuk memperbaiki efek pemisahan yaitu merambat 10 cm ke atas berturut-turut pada pengembangan dua kali. Lapisan KLT harus dalam keadaan kering di antara kedua pengembangan tersebut. Ini dilakukan dengan membiarkan pelat di udara selama 5-10 menit (Stahl, 1985).

g. Larutan pembanding

Di samping larutan cuplikan, selalu ada suatu campuran pembanding yang dikromatografi pada waktu bersamaan. Campuran ini terdiri atas 1-5 senyawa yang diketahui, dengan konsentrasi yang telah diketahui pula. Pembanding ini sama dengan senyawa yang terdapat di dalam larutan cuplikan. Tetapi, boleh juga senyawa lain yang berbeda, yang mempunyai sifat rambat serupa dengan senyawa cuplikan. Jika angka banding kuantitatif semua senyawa dalam larutan pembanding dipilih sesuai dengan susunan obat yang khas, perbandingan ukuran bercak memberikan tambahan informasi yang berharga (Stahl, 1985).

h. Deteksi senyawa yang dipisah

Ada beberapa kemungkinan untuk deteksi senyawa warna pada kromatogram. Deteksi paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (radiasi utama kira-kira 254 mm) atau jika senyawa itu dapat dieksitasi ke fluoresensi radiasi UV gelombang pendek dan atau gelombang panjang 356 nm). Jika dengan kedua cara ini tidak

dapat dideteksi harus dicoba dengan reaksi kimia. Pertama tanpa dipanaskan, kemudian bila perlu dengan dipanaskan (Stahl, 1985).

Senyawa yang dipisahkan dapat pula dideteksi dengan harga hRf atau Rf. Jarak pengembangam senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf.

$$Rf = \frac{\text{Jarak antara penotolan dengan bercak}}{\text{Jarak antara penotolan sampai batas pengembangan}}$$

Angka Rf berkisar antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal, hRf ialah angka Rf dikalikan faktor seratus, menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100. Jika angka hRf lebih tinggi daripada hRf yang dinyatakan, kepolaran pelarut harus dikurangi, jika angka hRf lebih rendah, komponen pelarut polar harus dinaikkan. Ini dapat dilakukan dengan cara sederhana, misalnya, pada pengaturan sistem benzena – kloroform atau kloroform – metanol (Stahl, 1985).

8. Kanker

Kanker adalah suatu akibat pertumbuhan tidak normal dan tidak terkendali dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah bentuk menjadi sel-sel kanker atau suatu penyakit dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi hameostasis lainnya pada organisme multiseluler. Bersifat ganas, tumbuh cepat, tidak bersimpai, merusak jaringan sekitarnya dan tumbuh menjalar ke bagian lain melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening sehingga tumbuh kanker baru di tempat lain. Penyusupan sel-sel kanker ke bagian tubuh lain disebut dengan metastasis. Setelah terjadi metastasis, pendekatan sistemik melalui kemoterapi untuk penanggulangan kanker, di samping pembedahan radiasi (Anonim, 2002).

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homestasis lainnya pada organisme. Multiseluler (Nafrialdi dan Gan, 1995). Kanker merupakan nama umum untuk

sekumpulan penyakit yang perjalanannya bervariasi dengan ditandai oleh perumbuhan sel yang terkontrol, terus menerus, tidak terbatas, merusak jaringan setempat dan sekitar serta bisa menyebar menginvasi jaringan sehat disekitarnya, menyerupai kepiting (cancer) (Kuswibawati, 2000).

Sel kanker merupakan "the outlaw cell" karena tumbuh tidak teratur, melanggar semua kaidah normal, tidak peduli akan kontrol dalam perbanyakan dan menggunakan agendanya sendiri. Sifat lainnya adalah mempunyai kemampuan untuk bermigrasi dari tempat tumbuhnya ke jaringan di dekatnya dan membutuhkan massa di daerah baru dalam tubuh. Kanker terdiri atas sel ganas, menjadi atau agresif dari waktu dan menjadi *lethal* apabila jaringan atau organ yang diperlukan untuk hidup mengalami gangguan.

a. Obat anti kanker

Obat anti kanker atau sitostatika adalah obat yang dapat menghentikan pertumbuhan sel-sel kanker. Obat ini diharapkan memiliki tosksisitas selektif artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Pengobatan kanker pada umumnya sama yaitu merupakan salah satu kombinasi dari operasi, penyinaran (radioterapi), pemberian obat pembunuh kanker (sitostatiska), meningkatkan daya tahan tubuh, pengobatan hormonal, dan obat tradisional baik dengan tanaman obat maupun binatang. Pada umumnya obat anti kanker yang ada sekarang ini dapat menahan pertumbuhan atau poliferasi sel. Agar terapi keganasan ini dapat berhasil dengan baik, maka prinsip kerja obat anti kanker harus dapat membasmi kanker secara total. Mekanisme kerja obat anti kanker ini didasarkan atas terjadinya gangguan pada salah satu proses sel esensial (Nafrialdi dan Gan, 1995)

b. Uji aktivitas anti kanker

Penelitian untuk menguji efektifitas senyawa anti kanker yang paling baik tentunya adalah dengan menggunakan biakan sel kanker hewan atau manusia (golongan mamalia) karena efeknya dapat diamati secara langsung dan tingkat yang diperlukan untuk penerapannya pada pasien tidak terlalu panjang. Di samping keunggulannya, kelemahan metode biakan sel kanker ini adalah terlalu rumit pelaksanaannya karena memerlukan ruangan dan perlakuan yang steril

B. Keterangan Empiris

Keterangan empiris yang ingin diperoleh pada penelitian ini adalah untuk melihat sifat toksik dari fraksi daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) dalam membunuh *Artemia salina* Leach dan mengamati kandungan senyawa kimia fraksi paling aktif dari golongan alkaloid, flavonoid, fenol, dan saponin.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

a. Bahan utama

Daun kembang bugang yang berasal dari Dusun Purwosari, Sinduadi, Mlati, Sleman, Yogyakarta.

b. Bahan untuk ekstraksi dan fraksinasi

Menggunakan : petroleum eter, kloroform, etanol, aquades.

c. Bahan untuk uji toksisitas

Air laut, telur *Artemia salina* Leach (Brine Shrimp Egss, Ocean Star Indonesia Inc).

d. Bahan untuk KLT

1) Bahan untuk fase diam : silika gel GF_{254}
2) Bahan untuk fase gerak : metanol, amoniak, n-butanol, asam formiat, asam asetat, air, kloroform.
3) Bahan untuk pereaksi semprot : besi (III) klorida, Lieberman-Burchard, Dragendorff, aluminium (III) klorida

2. Alat

a. Peralatan untuk ekstraksi

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak daun *Clerodendrum calamitosum* L yaitu seperangkat alat Soxhlet, cawan porselen, kertas saring, *rotarievaporator*, penangas air, alat timbangan, alat-alat gelas.

b. Peralatan untuk *BST*

1) Aquarium

Untuk tempat penetasan telur *Artemia salina* Leach menggunakan kontainer plastik kecil, yang terbagi menjadi dua bagian, yaitu daerah tembus cahaya (terang) dan daerah gelap untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan.

2) Lampu

Untuk penerangan menggunakan lampu TL 15 watt.

3) Pipet volume dan pipet ukur

4) Pipet tetes

Untuk menghitung larva yang akan digunakan.

5) Alat-alat gelas

6) Vortex untuk menghomogenkan larutan sampel maupun larutan uji.

B. Cara penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman kembang bugang bertempat di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

2. Penyiapan bahan utama

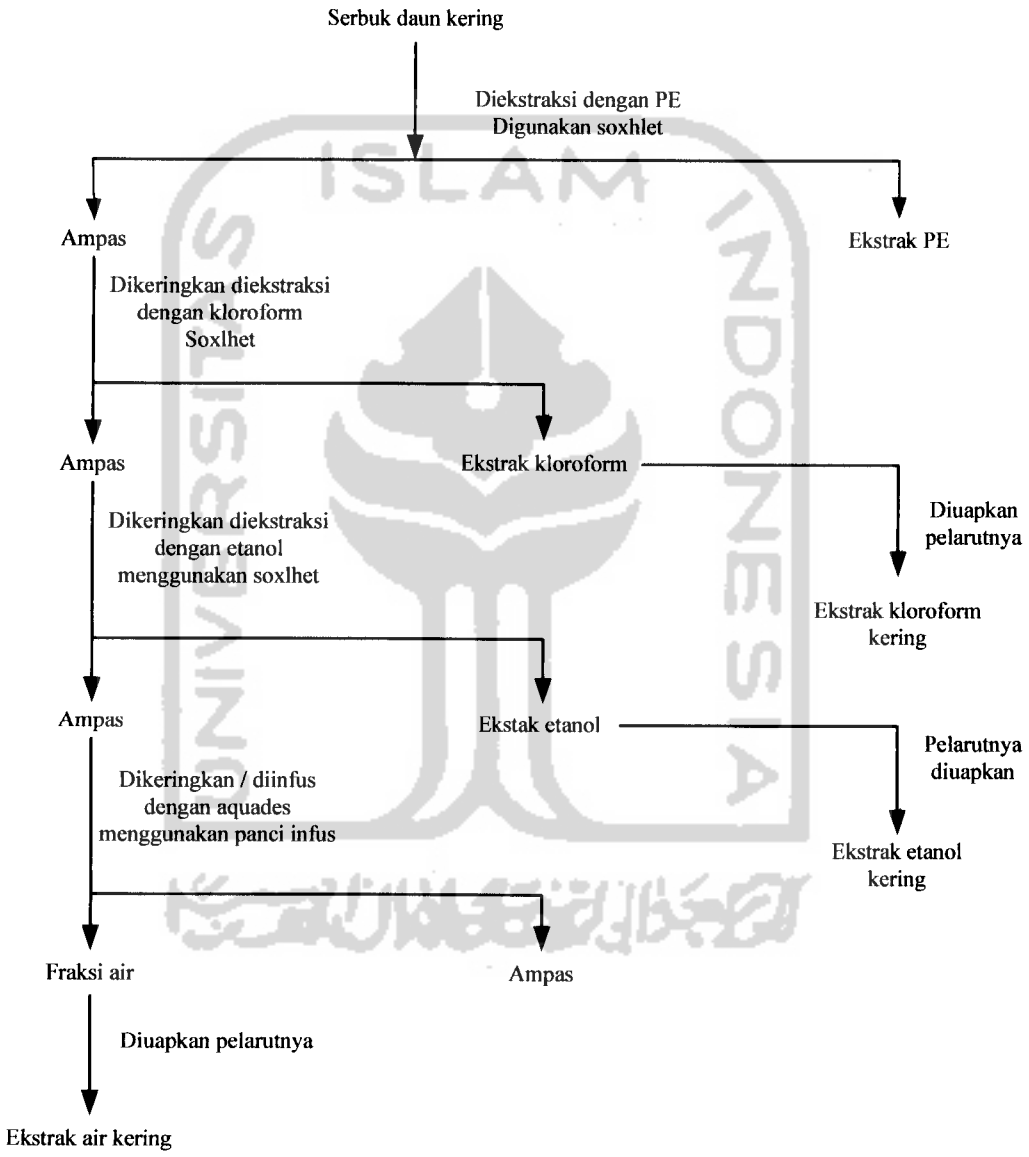
Daun kembang bugang diambil dari tanaman kembang bugang. Dipilih secara acak, dibersihkan dari kotoran yang ada. Dicuci dan dikeringkan hingga diperoleh daun yang kering. Pembuatan serbuk dilakukan dengan alat penyerbuk yaitu blender, kemudian serbuk diayak.

3. Ekstraksi daun kembang bugang

Sejumlah 50 g serbuk daun kembang bugang ditempatkan dalam selongsong kertas saring. Kemudian dimasukkan dalam alat ekstraksi Soxhlet. Kedalamnya dituang petroleum eter hingga terjadi dua kali sirkulasi. Ekstraksi dilakukan hingga pelarut tidak berwarna lagi. Fraksi petroleum eter yang diperoleh dipekatkan dengan *rotarievaporator*. Ampas dikeringkan dengan cara diangin-anginkan lalu Soxhlet kembali dengan pelarut kloroform sampai pelarut tidak berwarna lagi. Fraksi kloroform dipekatkan dengan *rotarievaporator*. Ampas dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

Kemudian dilanjutkan dengan pelarut selanjutnya. Ampas kering tadi di Soxhlet dengan pelarut etanol. Dengan cara yang sama seperti pada Soxhletasi dengan petroleum eter dan kloroform akan diperoleh fraksi etanol. Fraksi etanol tersebut dipekatkan dengan *rotarievaporator*, selanjutnya ampas dikeringkan

kembali dan setelah kering diinfundasi dengan aquades. Dari proses infundasi diperoleh filtrat aquades. Semua fraksi yang diperoleh kemudian dijadikan ekstrak kering dengan jalan menguapkan sisa pelarut diatas penangas air, sambil diaduk, dilakukan hingga bau pelarut tidak tercium lagi. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi resiko rusaknya ekstrak dalam proses penyimpanan.



Gambar 3. Skema cara ekstraksi

4. Uji toksisitas

a. Penyiapan air laut

Air laut yang digunakan dalam uji toksisitas yaitu, air laut biasa yang dibeli di toko Aquatrend Jl. Gejayan No.3 Yogyakarta.

b. Penyiapan sampel uji

Penyiapan sampel didasarkan pada LC_{50} data hasil orientasi toksisitas ekstrak petroleum eter, kloroform, etanol, aquadest terhadap *Artemia salina* Leach. Melarutkan masing-masing 125 mg ekstrak petroleum eter dalam 25 ml petroleum eter, 125 mg ekstrak kloroform dalam 25 ml kloroform, 125 mg ekstrak etanol dalam 25 ml etanol, serta 125 mg ekstrak aquades dalam 25 ml aquades, sehingga diperoleh konsentrasi 5 µg/ml. Sejumlah tertentu larutan sampel petroleum eter, kloroform, etanol, aquades, sesuai tabel diteteskan dalam flakon. Kontrol uji dilakukan dengan cara yang sama untuk masing-masing sampel, namun hanya menggunakan pelarut saja.

Tabel II. Penyiapan larutan sampel dari larutan induk 5 µg/ml

Konsentrasi (µg/ml)	Volume (ml)
10	0,01
50	0,05
100	0,10
500	0,50
1000	1,00

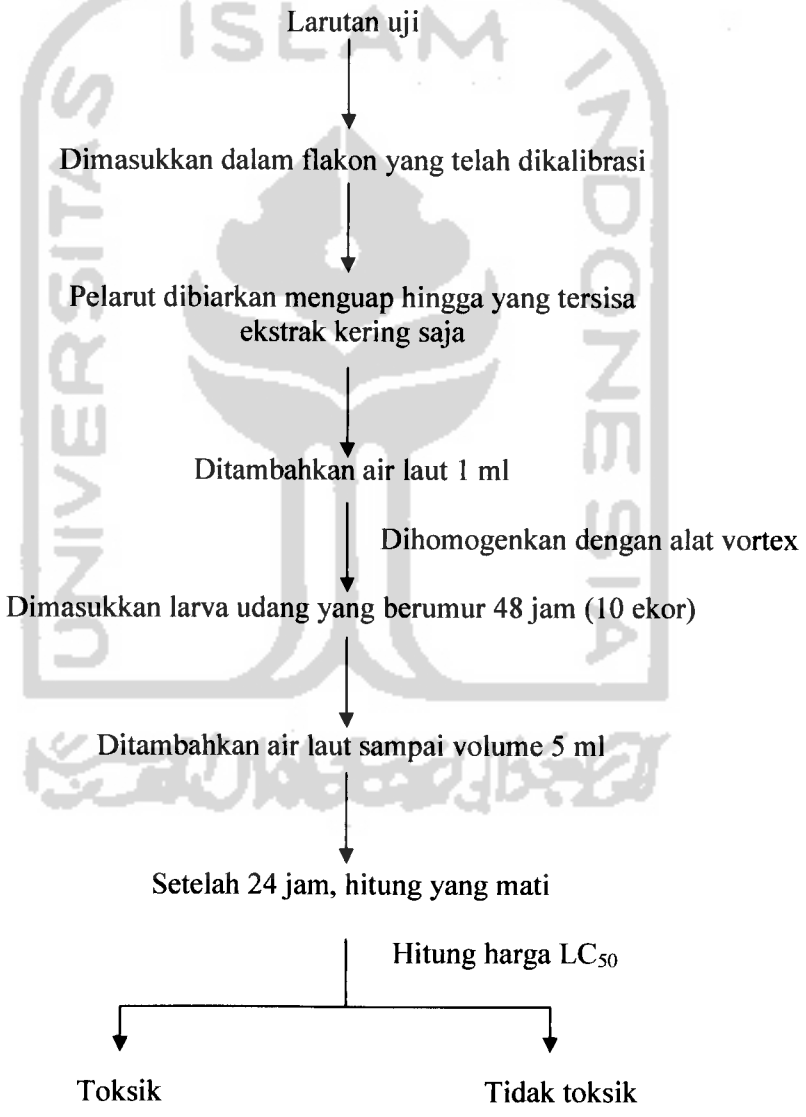
c. Penetasan telur *Artemia salina* Leach

Wadah yang digunakan untuk menetaskan telur *Artemia salina* berupa kontainer kecil yang terbuat dari plastik, dibagi menjadi dua kompartemen dengan sekat yang telah diberi lubang-lubang kecil. Kompartemen yang luas dibuat terang dengan penerangan lampu TL 15 watt dan kompartemen yang sempit dijadikan sebagai daerah gelap tempat meletakkan telur (kista) *Artemia salina.* Dibuat dengan jalan menutupi bagian atas daerah yang gelap dengan kain hitam.

Sejumlah ± 50 mg telur Artemia salina ditaburkan dalam kompartemen gelap dengan air laut. Setelah 24 jam, larva yang menetas dan berada di kompartemen terang dipipet dan dipindahkan kedalam air laut yang baru. Larva yang berumur 48 jam siap digunakan untuk uji toksisitas.

d. Pemeriksaan toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach.

Ke dalam masing-masing flakon untuk sampel maupun kontrol diisi 1 ml air laut, divortex 1 menit. Ke dalam flakon dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach, yang berumur 48 jam. Kemudian ditambahkan air laut sampai 5 ml. Flakon-flakon ditempatkan dibawah penerangan. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam, yaitu dengan menghitung jumlah larva yang mati. Kemudian dilakukan perhitungan persentase kematian tiap-tiap konsentrasi. Skematika uji toksisitas dari ekstrak kembang bugang dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 4. Skema uji toksisitas akut dengan metode *BST*

e. Cara analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan metode analisis probit sehingga dapat diketahui harga LC_{50}. Sebagai absis adalah skala logaritma dari dosis dan sebagai ordinat adalah skala probit. Adapun rumus untuk mencari persentase kematian pada hewan uji adalah :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah hewan uji}} \times 100\%$$

Rumus tersebut berlaku apabila pada kontrol tidak terdapat kematian hewan uji. Apabila pada kontrol terdapat kematian hewan uji maka rumus yang digunakan untuk menentukan persentase kematian, yaitu rumus Abbot :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes - kontrol}}{\text{Jumlah hewan uji}} \times 100\%$$

Setelah 24 jam dilakukan pengamatan, kemudian menghitung jumlah larva yang mati pada masing-masing flakon, dan selanjutnya menghitung persentase kematian. Setelah itu data di analisis dengan menggunakan analisis regresi probit (SPSS 11.5) yang akan menghasilkan data persamaan regresi linier, probit dan harga LC_{50} sekaligus.

f. Profil kromatografi lapis tipis

Dari ekstrak yang memiliki aktifitas paling tinggi (fraksi paling aktif) diidentifikasi golongan senyawa yang terdapat didalamnya menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Senyawa yang diidentifikasi tersebut antara lain:

1) Uji senyawa alkaloid

   Fase diam : Silika gel GF_{254}

   Fase gerak : metanol – amoniak (100:1,5)

   Pereaksi : Dragendorff

   Pembanding : Piperine

2) Uji senyawa flavonoid

   Fase diam : Silika gel GF_{254}

   Fase gerak : n-butanol – asam asetat – air (4:1:5)

Pereaksi : Aluminium (III) klorida

Pembanding : Rutin

3) Uji senyawa fenol

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : metanol – asam formiat (97:3)

Pereaksi : Besi (III) klorida

Pembanding : Asam galat

4) Uji senyawa Saponin

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : kloroform – metanol (95:5)

Pereaksi : Liebermann Burchard

Pembanding : Liquiritae radix

C. Analisis hasil

1. Determinasi

Determinasi tanaman kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L) mengacu pada buku *Flora untuk Sekolah di Indonesia* karangan van Steenis (1992) dan *Flora of Java* karangan Backer and Bakhuizen van der Brink (1968).

2. Efek toksisitas dengan menghitung jumlah *Artemia salina* Leach yang mati.

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah hewan uji}} \times 100\%$$

Rumus tersebut berlaku apabila pada kontrol tidak terdapat kematian hewan uji. Apabila pada kontrol terdapat kematian hewan uji maka rumus yang digunakan untuk menentukan persentase kematian, yaitu rumus Abbot (Meyer *et al.*, 1982) :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes} - \text{kontrol}}{\text{Jumlah hewan uji}} \times 100\%$$

3. Profil Kromatografi Lapis Tipis

Dilakukan terhadap fraksi paling aktif. Penotolan berupa pembanding dan larutan uji, kemudian disemprot dengan pereaksi semprot yang sesuai. Hasilnya dapat dianalisis dan dihitung nilai Rf-nya kemudian dibandingkan dengan senyawa pembanding atau pustaka yang ada.

BAB IV
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Langkah awal yang perlu dilakukan dalam penelitian ini adalah mendeterminasi tanaman kembang bugang. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran identifikasi tanaman yang akan digunakan dan agar tidak terjadi kesalahan dalam pengumpulan bahan serta mencegah kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

Determinasi ini dilakukan dengan menggunakan acuan "Flora of Java" karangan Backer and van der Brink (1965). Determinasi dilakukan dengan cara mencocokkan cici-ciri tanaman dengan kunci tanaman sehingga dipastikan tanaman yang digunakan benar.

Hasil determinasi tanaman adalah sebagai berikut:

1b - 2b - 3b - 4b - 6b - 7b - 9b - 10b - 11b - 12a (gol.6) - 84b - 88b - 89b - 91a (Verbenaceae) - 1b - 2b - 3b - 6b - 7b - 8b - 9b - 10.Clerodendrum - 1a – *Clerodendrum calamitosum* L.

Berdasarkan hasil determinasi yang diperoleh, maka dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian merupakan tanaman kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.).

B. Pengumpulan Bahan

Daun kembang bugang diambil di Dusun Purwosari Sinduadi Mlati Sleman. Pengambilan bahan dilakukan pada tempat tertentu untuk menghindari variasi kandungan kimia pada tumbuhan karena adanya berbagai faktor, diantaranya pengaruh lingkungan dan keadaan tanah yang berbeda-beda. Waktu pengambilan pada jam 09.00 WIB. Daun yang diambil dari tanaman yang sedang berbunga dan belum berbuah.

Langkah selanjutnya, pencucian menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering dengan suhu 40 °C selama 2 hari. Pengeringan bahan bertujuan agar senyawa yang ada pada daun kembang bugang tidak hilang atau rusak, serta

mempengaruhi kandungan kimia bahan yang disari, terutama untuk bahan yang tidak tahan pemanasan. Pada metode ini serbuk yang akan disari diletakkan dalam kantong yang dimasukkan dalam selongsong tabung yang menghubungkan tabung alas bulat dengan pendingin. Pelarut yang digunakan untuk penyarian adalah pelarut yang mudah menguap kurang lebih sebanyak 2 kali sirkulasi, pelarut dimasukkan dalam selongsong membasahi serbuk dan jatuh ke dalam labu alas bulat. Uap yang terjadi akibat pemanasan akan masuk melalui pipa menuju pendingin balik, kemudian terjadi kondensasi dan terbentuk tetesan pelarut dari pendingin balik masuk ke selongsong sehingga membasahi dan merendam serbuk, setelah pelarut mencapai tinggi maksimal melebihi rumah siput pelarut akan jatuh melalui pipa ke dalam labu alas bulat, dengan demikian zat yang tersari terakumulasi melalui penguapan bahan pelarut murni berikutnya proses ini akan berlangsung terus menerus sampai penyarian sempurna. Penyarian yang sempurna ditandai dengan terjadinya perubahan warna penyari menjadi jernih, tidak berwarna, atau sudah tidak ada lagi perubahan warna (warna tetap), bila hal itu terjadi maka penyarian harus dihentikan.

Serbuk yang akan disari ditimbang terlebih dahulu sebanyak 50 gram. Untuk mendapatkan kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering serbuk daun kembang bugang secara sempurna maka penyarian ini terbagi dalam empat tahap dengan menggunakan pelarut yang berganti-ganti mulai dari pelrut non polar, agak polar, sampai pelarut yang lebih polar (Harborne, 1987).

Tahap pertama adalah penyarian dengan menggunakan petroleum eter yang merupakan penyari non polar, dengan demikian senyawa-senyawa yang bersifat non polar seperti lemak, lilin, minyak atsiri, dan senyawa terpen yang terdapat dalam serbuk dapat larut dan tersari. Selama penyarian suhu sebaiknya dijaga antara 40 °C – 60 °C untuk menghindari penguapan yang berlebihan. Ekstrak PE yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga kental. Sari kental yang diperoleh dikeringkan diatas penangas air hingga tidak berbau pelarut lagi. Pengeringan disini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak kering yang tidak mudah rusak dalam penyimpanan. Hasil yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya, kemudian disimpan dalam lemari es untuk menghindari kerusakan ekstrak tersebut. Ampas hasil ekstraksi dengan petroleum

eter dikeringkan hingga kering dan terbebas dari pelarutnya untuk digunakan kembali pada tahap penyarian berikutnya. Kemudian penyarian dilanjutkan kembali dengan pelarut yang lebih polar yaitu kloroform, yang bertujuan menarik senyawa non polar yang tidak dapat ditarik oleh petroleum eter. Cara penyarian dengan kloroform sama dengan penyarian dengan menggunakan petroleum eter. Setelah ekstrak kloroform diperoleh, ditimbang dan disimpan dalam lemari es. Ampasnya diangin-anginkan hingga tidak berbau kloroform lagi.

Tahap ketiga adalah penyarian dengan pelarut etanol 96%. Etanol memiliki sifat polar yang relative lebih baik untuk melarutkan senyawa hidrofilik dan lipofilik sehingga senyawa seperti flavonoid, alkaloid, fenol, dan lain-lain dapat tersari. Dengan pelarut etanol 96% diharapkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun kembang bugang dapat tersari dengan sempurna. Fraksi yang didapat diuapkan dan dihitung rendemennya. Kemudian disimpan dalam lemari es. Yang terakhir adalah proses infundasi, ampas yang telah diangin-anginkan sampai bau etanolnya hilang kemudian diinfundasi dengan cara dipanaskan selama 15 menit dalam akuades yang bersuhu 90 °C, lalu disaring dan dipekatkan diatas penangas air, baru kemudian disimpan dalam lemari es. Tujuan dari infundasi dengan akuades adalah untuk mengekstraksi senyawa-senyawa polar yang mungkin masih tertinggal pada waktu ekstraksi dengan pelarut etanol.

Dari hasil fraksinasi 50 gram serbuk daun kembang bugang dengan metode penyarian berkesinambungan diperoleh fraksi dari masing-masing pelarut, yaitu fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi etanol dan fraksi akuades diperoleh bobot kering berturut-turut 9,95 g, 16,00 g, 14,80 g, 40,27 g. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen dari masing-masing fraksi dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

Dari hasil perhitungan diperoleh nilai rendemen seperti yang tertera pada tabel III.

Tabel III. Rendemen masing-masing fraksi dari 50 gram serbuk daun kembang bugang

Nama fraksi	Berat (gram)	Rendemen (%)
Petroleum eter	9,95	19,9
Kloroform	16,00	32
Etanol	14,80	29,6
Akuades	40,27	80,54

D. Penetasan *Artemia salina* Leach

Langkah awal yang dilakukan dalam uji toksisitas dengan metode *BST* adalah menetaskan telur Artemia salina Leach. Artemia biasanya dijualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista yang berkulitas baik akan menetas sekitar 18 - 24 jam. Apabila diinkubasi dalam lingkungan air akan bersalinitas 5 -70 permil (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Sebelum ditetaskan, telur artemia direndam dalam aquadest ± 1 jam untuk menghilangkan pengawet yang mungkin ada, kemudian telur yang mengapung dibuang, dan telur yang mengendap (tenggelam) dimasukkan dalam tempat penetasan. Untuk mempercepat pemisahan cangkang telur dan naupliusnya dapat memanfaatkan sifat artemia yang dipengaruhi cahaya (fototropi). Oleh karena itu wadah penetasanya terdiri dari dua kompartemen yaitu kompartemen gelap dan komparteman terang. Kompartemen terang dibuat dengan diberi cahaya lampu 15 watt diatasnya, sedangkan unuk kompartemen gelap dibuat dengan cara menutup bagian atas wadah dengan kain hitam atau plastik hitam, hal ini bertujuan agar cahaya tidak ada yang masuk dalam kompartemen gelap. Kista yang sudah direndam dan diseleksi lalu dimasukkan kedalam kompartemen gelap. Setelah ± 24 jam kista akan menetas dan menjadi nauplius. Nauplius terseleksi akan memisah dari cangkang dan bergerak dari kompartemen gelap menuju ke kompartemen terang melalui celah yang telah dibuat pada sekat yang memisahkan kompartemen gelap dan kompartemen terang. Untuk artemia yang tidak cukup kuat dan tidak aktif tidak akan dapat menuju kompartemen terang. Nauplius yang dapat menuju kompartemen terang yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam uji *BST*.

Untuk hidup artemia membutuhkan suhu berkisar 24 -30 °C, sehingga penelitian dilakukan pada suhu kamar, dan untuk memenuhi kebutuhan oksigen terlarut sekitar 3 mg/ml maka air pada media diberi udara dengan bantuan aerator. Gelembung udara ini juga berfungsi untuk mengaduk telur secara merata agar telur tidak mengendap, karena telur yang mengendap akan kekurangan oksigen sehingga sulit untuk menetas (Mudjiman, 1995).

Nauplius yang digunakan dalam uji toksisitas dengan metode *BST*, yaitu nauplius yang berumur dua hari, dimana pada umur ini larva dalam keadaan paling peka karena dinding selnya masih lunak. Untuk mendapatkan nauplius yang berumur seragam maka setelah 24 jam nauplius yang berada di kompartemen terang dipindahkan ketempat baru yang berisi air laut. Pemindahan nauplius kewadah yang berisi air laut baru dilakukan untuk menjaga kemungkinan adanya nauplius yang menetas lebih dari 24 jam atau bila tidak dipindahkan ada kemungkinan nauplius yang digunakan berumur kurang dari 48 jam. Bila umur larva yang digunakan tidak sama maka kepekaan dan kualitasnya berbeda sehingga hasil yang diperoleh tidak reliabel.

E. Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimps Lethality Test*

Metode *Brine Shrimps Lethality Test* (*BST*) merupakan metode pengujian toksisitas suatu bahan dengan menggunakan organisme uji berupa naupli (larva) *Artemia salina* Leach. Metode ini sering digunakan sebagai skrining awal untuk menentukan ketoksikan suatu ekstrak ataupun senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagi antikanker. Metode *BST* ini memiliki keuntungan, yaitu cepat, murah, sederhana karena tidak memerlukan teknik aseptis, keterulangannya tinggi dan hasilnya dapat dipercaya. Untuk menjalankannya tidak memerlukan alat-alat khusus atau latihan khusus dan membutuhkan relatif sedikit sampel untuk tes. Uji ketoksikan dengan metode *BST* termasuk uji ketoksikan akut, karena uji ini dirancang untuk menentukan efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah pemberian dosis uji dan pengamatannya dilakukan setelah 24 jam. Uji toksisitas ini dapat dilihat dari jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach. Artemia merupakan salah satu organisme yang digunakan untuk pengujian senyawa bioaktif.

Artemia secara luas telah digunakan untuk uji aktivitas farmakologi ekstrak tanaman. Penggunaan artemia ini memang tidak spesifik untuk anti tumor maupun zat fisiologis tertentu, namun menunjukkan kemampuannya untuk memonitor kemungkinan adanya efek sitotoksik umum, misalnya dengan biakan sel tumor (Meyer *et al.*, 1982). Artemia dapat dipergunakan untuk menentukan tingkat toksisitas suatu bahan secara kuantitatif yang dinyatakan dengan *MLC* (*Median Lethal Concentration*) atau LC_{50} bila pemberian obat dinyatakan dalam konsentrasi.

Artemia yang digunakan dalam uji dengan metode *BST*, yaitu Artemia yang telah berumur 48 jam, karena Artemia yang berumur 48 jam mempunyai sifat yang hampir sama dengan sel kanker, yaitu dapat tumbuh terus atau berproliferasi dan larva dalam keadaan peka karena diniding selnya masih lunak. Kelompok *Cell Cycle Specific* yaitu kelompok obat yang kerjanya memperlihatkan toksisitas selektif terhadap sel yang sedang berproliferasi (Dalimartha, 1995).

Uji toksisitas dengan metode *BST* dilakukan dengan jalan menyiapkan sampel terlebih dahulu. Sampel disiapkan dengan cara melarutkan sari kental sebanyak 125 mg dalam 25 ml pelarut yang sesuai untuk mendapatkan larutan stok yang memiliki kadar 5 mg/ml. Untuk ekstrak petroleum eter dilarutkan dengan pelarut petroleum eter, ekstrak kloroform dilarutkan dengan pelarut kloroform, ekstrak etanol dilarutkan dengan pelarut etanol dan ekstrak akuades dilarutkan dengan pelarut akuades. Hal yang perlu diperhatikan dalam uji *BST* antara lain sampel harus larut sempurna dalam pelarut yang cocok, sehingga konsentrasi stok sampel yang diperoleh menggambarkan konsentrasi yang sebenarnya. Dengan demikian masing-masing seri kadar cukup valid dan representatif.

Larutan yang akan diuji dimasukkan ke dalam flakon yang telah ditara 5,0 ml dengan seri konsentrasi yang sesuai. Kemudian pelarutnya diuapkan sampai kering dan tidak berbau lagi, ini untuk mencegah kemungkinan timbulnya efek yang tidak diinginkan dari pelarut. Untuk flakon yang berisi ekstrak petroleum eter dan kloroform perlu ditambahkan 3 tetes dimetilsulfoksida (DMSO), hal ini bertujuan untuk meningkatkan kelarutannya karena ekstrak petroleum eter dan

ekstrak kloroform tidak dapat larut langsung dalam air laut. Selanjutnya di vorteks untuk menghomogenkan, sehingga sampel uji dapat terdistribusi merata dalam air laut, selain itu juga untuk membantu pelarutan ekstrak didalam air laut.

Sepuluh ekor larva Artemia dipindahkan kedalam masing-masing flakon yang telah berisi sampel dengan menggunakan pipet, baru kemudian ditambahkan air laut sampai volume 5 ml. Setelah penambahan air laut hingga volume 5 ml, akan diperoleh konsentrasi akhir sampel yaitu 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dan 10 µg/ml.

Untuk melihat adanya kemungkinan efek yang timbul disebabkan karena hal-hal lain misalnya pelarut dan faktor lainnya selain pelarut yang dapat mempengaruhi hasil uji, misalnya faktor lingkungan tempat uji berlangsung yang tidak mendukung, maka perlu dibuat kontrol negatif. Kontrol negatif disiapkan sama seperti pada pembuatan sampel uji sesuai kadar konsentrasi yang ditetapkan, namun yang dimasukkan kedalam flakon hanya pelarut petroleum eter, kloroform,etanol dan akuades saja tanpa ekstrak uji.

Flakon-flakon kemudian diletakkan dibawah penyinaran lampu 15 watt, setelah 24 jam baik flakon yang berisi sampel uji maupun kontrol dihitung jumlah Artemia yang hidup dan persentase kematian dihitung dengan menggunakan data koreksi (menggunakan rumus Abbot).

Uji toksisitas dilakukan tiga kali replikasi, tiap replikasi menggunakan peringkat konsentrasi 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dan 10 µg /ml. Masing-masing konsentrasi terdiri dari 6 flakon.

Hasil uji aktivitas dengan metode *BST* terhadap fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi etanol, dan fraksi akuades beserta kontrol pelarut masing-masing dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel IV. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi petroleum eter setelah 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	6,8,10,9,9,8	9,7,9,9,8,8	10,8,8,9,10,7	0,0,0,1,0,0
500	7,6,8,8,6,10	8,6,6,7,8,9	5,6,9,10,9,6	0,0,0,0,0,0
100	9,6,6,3,0,4	7,5,5,8,2,8	4,4,6,3,5,4	0,1,1,0,0,0
50	2,2,0,3,5,1	4,7,3,3,2,0	9,0,3,3,1,1	2,0,0,0,1,0
10	2,2,0,0,1,3	0,0,4,3,0,1	2,2,0,1,1,1	0,0,0,0,0,0

Keterangan : Angka 1,2,3 merupakan pengulangan uji (replikasi)

Tabel V. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi kloroform setelah 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	10,10,9,10,8,10	9,9,10,9,10,8	9,9,10,10,10,8	0,0,0,0,0,0
500	10,9,7,7,5,9	8,8,10,9,10,3	10,9,9,9,7,10	0,1,0,0,0,1
100	9,6,6,8,9,6	7,7,5,9,6,8	6,7,6,8,8,10	0,2,0,0,0,0
50	4,3,4,4,5,6	5,6,6,3,2,2	1,1,4,3,3,2	0,0,0,0,0,1
10	3,3,0,2,1,0	2,1,1,3,0,0	2,0,4,2,2,1	1,0,0,1,0,0

Keterangan : Angka 1,2,3 merupakan pengulangan uji (replikasi)

Tabel VI. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi etanol setelah 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	8,8,10,7,10,10	10,9,9,6,10,8	10,10,8,10,9,8	0,1,0,0,0,0
500	9,10,10,4,7,7	8,8,5,7,7,9	10,6,5,5,8,7	0,0,0,1,1,0
100	8,7,7,3,7,9	9,9,2,6,6,5	6,6,7,6,8,5	0,0,0,0,0,0
50	4,0,4,7,3,3	5,1,1,0,5,3	2,2,2,5,6,0	1,0,2,0,0,0
10	0,0,4,2,2,0	1,1,1,2,0,3	2,0,1,1,1,0	0,0,1,2,0,0

Keterangan : Angka 1,2,3 merupakan pengulangan uji (replikasi)

Tabel VII. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada fraksi akuades setelah 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	6,9,9,10,8,6	7,7,5,6,7,4	10,10,9,8,10,8	0,1,0,2,0,0
500	10,7,6,6,8,8	6,6,9,8,8,6	7,6,8,6,8,7	1,0,2,0,0,0
100	4,3,3,4,5,6	6,2,5,4,4,8	9,5,5,8,6,5	0,1,0,0,0,0
50	5,2,3,4,4,4	7,3,3,5,2,2	6,5,5,4,3,3	0,0,0,1,0,0
10	4,3,3,0,3,3	0,2,0,2,2,2	1,1,0,3,0,1	0,0,0,0,0,0

Keterangan : Angka 1,2,3 merupakan pengulangan uji (replikasi)

Data diatas dapat digunakan untuk mencari persentase kematian larva *Artemia salina* Leach untuk masing-masing fraksi. Untuk beberapa seri konsentrasi terdapat kematian larva pada kontrol, sehingga persentase kematian dihitung berdasarkan rumus Abbot. Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach dapat dilihat pada tabel VIII.

Tabel VIII. Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach

Fraksi	Persentase kematian pada konsentrasi µg/ml (%) ($\bar{x} \pm SD$)				
	1000	500	100	50	10
Petroleum eter	82,78±1,92	74,44±0,96	46,11±7,88	22,22±5,09	12,78±0,96
Kloroform	93,33±1,66	79,44±6,31	69,44±2,54	33,89±10,71	11,11±3,47
Etanol	87,22±2,54	70,00±5,00	64,44±3,46	40,00±22,04	8,33±2,88
Akuades	72,22±16,01	67,22±2,54	49,44±11,09	37,22±3,85	16,67±8,82

Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa persentase kematian larva *Artemia salina* Leach yang terbesar, yaitu fraksi kloroform pada konsentrasi 1000 µg/ml, yaitu sebesar 93,33 %, sedangkan persentase kematian terkecil dihasilkan oleh fraksi etanol pada konsentrasi 10 µg/ml, yaitu sebesar 8,33 %.

Tahap selanjutnya, yaitu perhitungan persamaan garis lurus, probit dan LC_{50} dapat dianalisis dengan menggunakan analisis regresi probit (SPSS 11.5) yang mana akan menghasilkan data persamaan garis lurus, probit dan LC_{50} sekaligus. Untuk lebih jelasnya hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel IX. Persamaan garis lurus hasil uji *BST* terhadap fraksi daun kembang bugang

Fraksi	Persamaan garis lurus	r
Petroleum eter	Y = 1,11732 X – 2,40593	0,997
Kloroform	Y = 1,27968 X – 2,39926	0,996
Etanol	Y = 1,17757 X – 2,42416	0,998
Akuades	Y = 0,78220 X – 1,67844	0,999

Keterangan : X = log konsentrasi

Y = nilai probit

Tabel X. Harga LC_{50} pada uji toksisitas fraksi daun kembang bugang terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *BST*

Fraksi	Rata-rata LC_{50} (µg/ml)	Rentang LC_{50} (µg/ml)
Petroleum eter	142,33	85,39 – 241,04
Kloroform	74,97	25,57 – 171,84
Etanol	114,45	30,06 – 375,28
Akuades	139,89	108,26 – 181,56

flavonoid, fenol dan saponin. Hasil uji KLT untk beberapa senyawa tersebut sebagai berikut :

1. Alkaloid

Untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid pada sampel ekstrak kloroform dilakukan uji KLT menggunakan fase diam silika gel GF_{254} dan fase gerak metanol – amoniak (100:1,5, v/v) pembanding yang digunakan yaitu piperin. Menurut Wagner *et al.*, (1984) sebagian besar alkaloid menunjukkan pemadaman pada UV_{254} nm dan berfluouresensi biru atau kuning pada UV_{366} nm. Alkaloid dapat dideteksi dengan pereaksi Dragendroff dan menunjukkan bercak berwarna coklat atau orange. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan hasil yang negatif untuk alkaloid. Hal ini dapat diketahui dari hasil KLT yang menunjukkan warna dan harga Rf yang dihasilkan antara sampel dan pembanding berbeda baik sebelum ataupun sesudah diberi pereaksi semprot. Untuk lebih jelasnya hasil uji KLT untuk deteksi alkaloid dapat dilihat pada tabel XI.

Tabel XI. Data uji KLT senyawa alkaloid dari fraksi kloroform

Ekstrak	Rf	hRf	Warna bercak	
			UV366	Dragendorf
Sample	0,59	59	Hijau	Hijau
	0,69	69	Orange	Hijau kekuningan
Pembanding	0,45	45	Biru muda	Orange

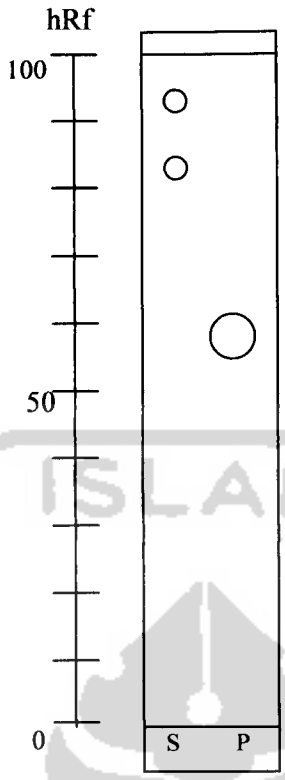
2. Flavonoid

Fase gerak yang digunakan adalah n-butanol – asam asetat - air (4:1:5, *v/v*). Menurut Wagner *et al.*, (1984), flavonoid ditunjukkan dengan adanya bercak berwarna kuning, selain itu dengan reaksi warna antara senyawa yang ada dengan pereaksi $AlCl_3$ pada UV_{366} memberikan fluoresensi kuning, biru atau hijau. $AlCl_3$ digunakan untuk pereaksi semprot deteksi flavonoid karena $AlCl_3$ dapat membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dengan keton yang bertetangga dan dapat membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto-hidroksil (Markham,1988).

Dari hasil uji KLT terhadap senyawa flavonoid menunjukkan hasil pada UV_{366} menunjukkan pada sampel berwarna merah dan orange, sedangkan pada pembanding berwarna orange. Dan setelah disempot dengan pereaksi aluminium (III) klorida ($AlCl_3$) terdapat bercak berwarna hijau pada sampel dan warna kuning pada pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi kloroform daun kembang bugang tidak mengandung flavonoid. Untuk lebih jelasnya hasil KLT untuk deteksi flavonoid dapat dilihat pada tabel XII.

Tabel XII. Data uji KLT senyawa flavonoid dari fraksi kloroform

Ekstrak	Rf	hRf	Warna bercak	
			UV366	$AlCl_3$
Sample	0,83	83	Merah	Hijau
	0,95	95	Orange	Hijau
Pembanding	0,58	58	Orange	kuning



Gambar 6. Kromatogram uji senyawa flavonoid fraksi kloroform

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : n-butanol – asam asetat – air (4:1:5)

Pereaksi : Aluminium (III) klorida ($AlCl_3$)

Keterangan gambar :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding Rutin

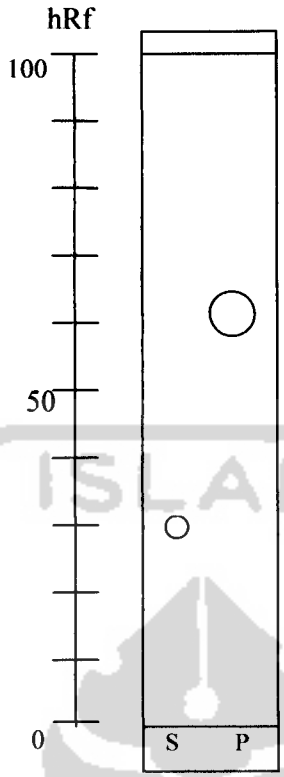
3. Fenol

Uji senyawa fenol dengan metode KLT mennggunakan fase diam silika gel GF_{254} dan fase gerak methanol - asam formiat (97:3, v/v) dan sebagai pembandingnya adalah asam galat. Deteksi senyawa fenol dapat digunakan pereaksi besi (III) klorida. Bercak fenol akan menyerap didaerah UV pendek dan dapat dilihat sebagai bercak gelap dengan belakang berfluoresensi. Adanya senyawa fenol akan memberikan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat dengan pereaksi. Untuk menegaskan warna bercak yang terjadi pada plat silica gel GF_{254} dapat dipanaskan pada suhu 105 °C selama 10-15 menit (Harborne, 1987).

Dari hasil KLT menunjukkan pada UV_{366} bercak pada sampel berwarna hijau kekuningan. Dan setelah diberi pereaksi semprot berupa $FeCl_3$ memberikan warna hijau kelabu. Warna pada pembanding pada UV_{366} adalah hijau kelabu kekuningan dan setelah disemprot dengan $FeCl_3$ terlihat ungu gelap. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan hasil yang positif untuk senyawa fenol. Untuk lebih jelasnya hasil uji KLT untuk identifikasi fenol dapat dilihat pada tabel XIII.

Tabel XIII. Data uji KLT senyawa fenol dari fraksi kloroform

Ektrak	Rf	hRf	Warna bercak	
			UV_{366}	$FeCl_3$
Sample	0,29	29	Hijau kekuningan	Hijau kelabu
Pembanding	0,62	62	Hijau kelabu kekuningan	Ungu gelap



Gambar 7. Kromatogram uji senyawa fenol fraksi kloroform

Fase diam : Silika gel GF254

Fase gerak : metanol – asam formiat (97:3)

Pereaksi : Besi (III) klorida ($FeCl_3$)

Keterangan gambar :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding asam galat

4. Saponin

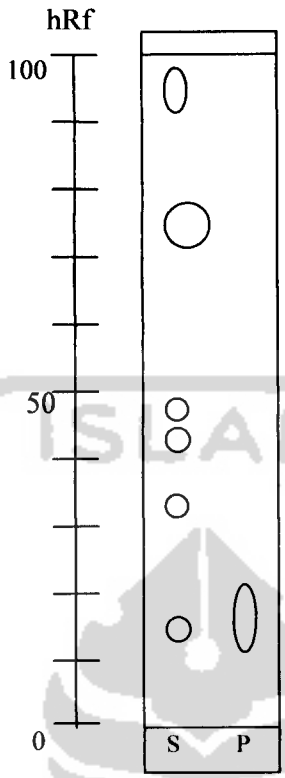
Senyawa yang mengandung saponin bila disemprot dengan menggunakan antimony (III) klorida akan memberikan warna merah violet dalam sinar tampak, sedamgkan pada UV_{366} memberikan bercak berwarna merah violet, biru dan hijau (Wagner *et al.*, 1984).

Setelah fraksi dan pembanding ditotolkan kemudian dikembangkan dengan fase gerak kloroform – metanol (95:5, v/v). Dibawah UV_{366} sampel menghasilkan enam bercak yang berlainan warnanya yaitu biru, merh hitam, merah, kuning dan orange, sedangkan pada pembanding terlihat bercak berwarna biru. Untuk deteksi selanjutnya disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Dari hasil reaksi tersebut dihasilkan bercak yang berwarna hijau kelabu, hijau dan violet. Dan pada pembanding yang telah disemprot dengan pereaksi yang sama menghasilkan warna violet. Bercak yang berwarna merah sampai ungu merupakan triterpenoid, sedangkan bercak yang berwarna hijau sampai biru merupakan steroid.

Hasil uji senyawa saponin terhadap fraksi kloroform dapat dilihat pada tabel XIV. Berdasarkan warna yang diperoleh diketahui bahwa dalam fraksi kloroform daun kembang bugang ditemukan senyawa saponin.

Tabel XIV. Data uji KLT senyawa saponin dari fraksi kloroform

Ekstrak	Rf	hRf	Warna bercak	
			UV_{366}	L - B
Sampel	0,12	12	Biru kekuningan	Hijau kelabu
	0,33	33	Merah hitam	Hijau kelabu
	0,44	44	Merah	Hijau
	0,49	49	Kuning	Hijau
	0,74	74	Merah hitam	Hijau
	0,95	95	Orange	Violet
Pembanding	0,16	16	Biru	Violet



Gambar 8. Kromatogram uji senyawa saponin fraksi kloroform

Fase diam : Silika gel GF254

Fase gerak : Kloroform – Metanol (95:5)

Pereaksi : Liebermann- Burchard

Keterangan gambar :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding Liquiritae radix

Dari hasil uji toksisitas akut dan profil kromatografi lapis tipis dari fraksi paling aktif yaitu fraksi kloroform dari daun kembang bugang menunjukkan bahwa kemungkinan senyawa yang bertanggung jawab pada ketoksikan terhadap larva *Artemia salina* Leach adalah senyawa fenol dan saponin. Sedangkan untuk senyawa alkaloid dan flavonoid menunjukkan hasil yang negatif atau tidak terkandung dalam fraksi kloroform daun kembang bugang sehingga tidak mempunyai sifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan pada bab sebelumnya, maka dapat ditarik kesimpulan adalah sebagai berikut :

1. Hasil uji toksisitas akut fraksi daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (*BST*) menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi etanol dan fraksi akuades memilki harga LC_{50} < 1000 µg/ml, sehingga dapat dikatakan semua fraksi tersebut memiliki sifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach. Dari keempat fraksi tersebut, fraksi kloroform merupakan fraksi yang paling toksik karena harga LC_{50} fraksi kloroform paling kecil, yaitu sebesar 74,97 µg/ml.
2. Berdasarkan identifikasi kandungan senyawa kimia dalam fraksi kloroform daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) sebagai fraksi yang paling aktif ditemukan kandungan senyawa fenol dan saponin, sedangkan untuk senyawa alkaloid dan flavonoid menunjukkan hasil yang negatif.

B. Saran

Setelah melihat hasil penelitian uji toksisitas akut daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (BST) beserta profil Kromatografi Lapis Tipis fraksi paling aktif, maka dalam melakukan penelitian selanjutnya penulis menyarankan:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa mana yang bertanggung jawab terhadap toksisitas fraksi kloroform daun kembang bugang dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (*BST*).
2. Perlu dilakukan penelitian tentang uji bioaktivitas antitumor fraksi daun kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) dengan menggunakan biakan sel kanker.
3. Perlu dilakukan identifikasi kromatografi lapis tipis untuk fraksi petroleum eter, fraksi etanol, dan fraksi akuades.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 1979, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.

Anonim, 1986, *Sediaan galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 2. 25-28.

Anonim, 1986, *Indeks Tumbuh-Tumbuhan Obat di Indonesia*, P.T. Eisai, Jakarta, 330.

Anonim, 2001, *Mahkota Dewa Dicari Karena Khasiatnya Dihindari KarenaRacunnya*, Nirmala, III, (8), 61-63.

Anonim, 2006, *Clerodendrum calamitosum* L, available at .iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?1d=80, (diakses 31 Januari 2006).

Ansel, H.C., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Edisi IV, UI Press, Jakarta, 605, 606-609.

Backer, C.A dan Bakhuizen van den Brink, R.C., 1965, *Flora of Java*, N.V.P. Noorclhoff. Groningen. The Netherlands, Vol I dan III, 1-6, 29-34, 594-595, 604-605.

Cassarett, L.J., and Doull, J., 1975, *Toxicologi the Basic Science of Poison*, Macmillan Dublishing Co Inc, New York.

Chaulk, J., and Park, J., 2002, *Environmental Science 1000 : Artemia salina, The Common Brine Shrimp, As A useful Biological Indicator*, http : // WWW. Swgc. Mun. Ca / biology / env 1000 / jchaulk / (diakses 31 januari 2006).

Dalimartha, S., 1995, *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker*, Penebar Swadaya, Jakarta, 1-3.

Dewi, A., H., 2004, Uji Sitotoksik Akut Biji Pucung (*Pangium adule* Reinw)terhadap Larva Artemia salina Leach Beserta Profil KLT Fraksi Paling Aktif, *Skripsi*, Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Dwiatmaka, Y., 2000, Skrinning Tanaman Berkhasiat Anti Kanker dengan Metode BST dalam Yuswanto, Ag., Sinaradi, F., (Eds.), *KANKER*, Penerbit Sanata Dharma, 101-115.

Farmiati, B., 1998, Uji Toksisitas dengan Metode *BST* dan Identifikasi Katekin dalam Beberapa Produk Teh Hijua, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.

Gandjar, I. G., 1991, *Kimia Analisis Instrumental*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 65-67.

Harefa, F., 2003, *Pembudidayaan Artemia untuk Pakan Udang dan Ikan*, Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta, 14-25.

Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soedira, Penerbit ITB, Bandung.

Isnansetyo, A., dan Kurniastuty, 1995, *Tekhnik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton : Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*, Cetakan I, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 52-57.

Kuswibawati, L., 2000, Apa Itu Kanker? Dalam Yuswanto, Ag., Sinaradi, F., (Eds.), *KANKER*, Penerbit Sanata Dharma, 1. 12.

Loomis, A.T., Ph.D., 1978, *Toksikologi Dasar*, Edisi Ketiga, Alih Bahasa : Drs. Imono Argo Donatus,Apt., S.U., Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, UGM Press, Yogyakarta, 3. 16-19. 113. 206-209.

Markham, K., R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, ITB, Bandung, 15-17, 47.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, D.E., Nichols, D.E., Mc Laughlin, J.L., 1982, *Brine Shrimp : A convenient General Bioassay for Active Plant Constituent*, Planta Medica, 1-10. 31-34. 45.

Mudjiman, A., 1995, *Makanan Ikan*, PT Penebar Swadaya, Yogyakarta.

Mulyani, S., 1995, Isolasi dan Elusidasi Struktur Kandungan Daun Eupatorium inufolium yang Bersifat Sitotoksik, *Disertasi*, Universitas Gadjah Mada,Yogyakarta, 29. 63-73. 84.

Nafrialdi, dan Gan, S., 1995, *Antikanker dalam Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV, 686-701.

Nuratmi, B., Sundari, D., Winarno, W., 2000, Penelitian aktivitas biologis infus benalu the (Scurulla citropurpurea BI. Danser) terhadap aktivitas sistem imun mencit, *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*, no 127, Jakarta, 11-12.

Paget, 1970, *Methods in Toxicology*, Blackwall Scientifid Publications, Oxford and Edinburgh, 49-82.

Ratna, A., SP., 2005, Uji Toksisitas Akut Kulit Batang Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Larva *Artemia salina* Leach Beserta Profil KLT Fraksi Paling Aktif, *Skripsi*, Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan tingkat Tinggi*, Penerbit ITB, Bandung, 57, 157, 191.

Rupprech, J.K., Hu. Y.H, Laughlin J.L., 1990, Annonaceous Acetogenin : Areview, *J. Nat. Prod.*, 55, 237-347.

Sastrohamidjojo, H, 1991, *Kromatografi*, Bagian Kimia Fisika, Universitas Gadjah Mada Press Liberty, Yogyakarta.

Sastrohamidjojo, H., 2001, *Kromatografi*, Cetakan Kedua, Penerbit Liberty, Yogyakarta.

Sudjadi, Drs, 1989, *Metode Pemisahan*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 6-7, 107-111.

Stahl, E., 1985, *Analisa Obat Secara Kramatografi dan Mikroskopis*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 1-17.

Voight, R., 1984, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, UGM Press, Yogyakarta , 564, 568-571.

Wagner, H., Bladt, S., Zganski, E., M., 1984, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag Berlin, New York.

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JURUSAN FARMASI FMIPA UII
BAGIAN BIOLOGI FARMASI

Alamat : Jl.Kaliurang Km 14,4 Yogyakarta
Telpon : (0274) 895920 Ext. 3033

SURAT KETERANGAN
Nomor:24/ UII/Jur Far/ det/VIII/2005

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi FMIPA UII menerangkan bahwa:

Nama : Umi Ulfa
NIM : 01613029
Pada Tanggal : 25 Agustus 2005

Telah mendeterminasi 1 (satu) species tanaman dengan bimbingan Dra. Iyok Budiarti, di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII.

Tanaman tersebut: *Clerodendrum calamitosum* (kembang bugang)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 25 Agustus 2005
Bagian Biologi Farmasi
Kepala

Asih Triastuti, S.F., Apt
NIP. 03.469/MP

Lampiran 2

Foto tanaman kembang bugang (*Clerodendrum calamitosum* L.) (Anonim, 2006).

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
PERPUSTAKAAN
FMIPA

Lampiran 3. Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach

Fraksi		Persentase kematian pada konsentrasi µg/ml (%)				
		1000	500	100	50	10
Petroleum eter	Rep 1	81,67	75	43,33	16,67	13,33
	Rep 2	81,67	73,33	55	26,67	13,33
	Rep 3	85	75	40	23,33	11,67
Kloroform	Rep 1	95	75	70	41,67	10
	Rep 2	91,67	76,67	66,67	38,33	8,33
	Rep 3	93,33	86,67	71,67	21,67	15
Etanol	Rep 1	86,67	75	68,33	31,67	10
	Rep 2	85	70	61,67	23,33	10
	Rep 3	90	65	63,33	65	5
Akuades	Rep 1	75	70	40	35	26,67
	Rep 2	55	66,67	46,67	35	13,33
	Rep 3	86,67	65	61,67	41,67	10

Lampiran 4

PROBIT ANALISIS FRAKSI PETROLEUM ETER

P R O B I T A N A L Y S I S

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

P R O B I T A N A L Y S I S

Parameter estimates converged after 13 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	1,11732	,07129	15,67336

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-2,40593	,15843	-15,18651

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 7,710 DF = 3 P = ,052

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

P R O B I T A N A L Y S I S

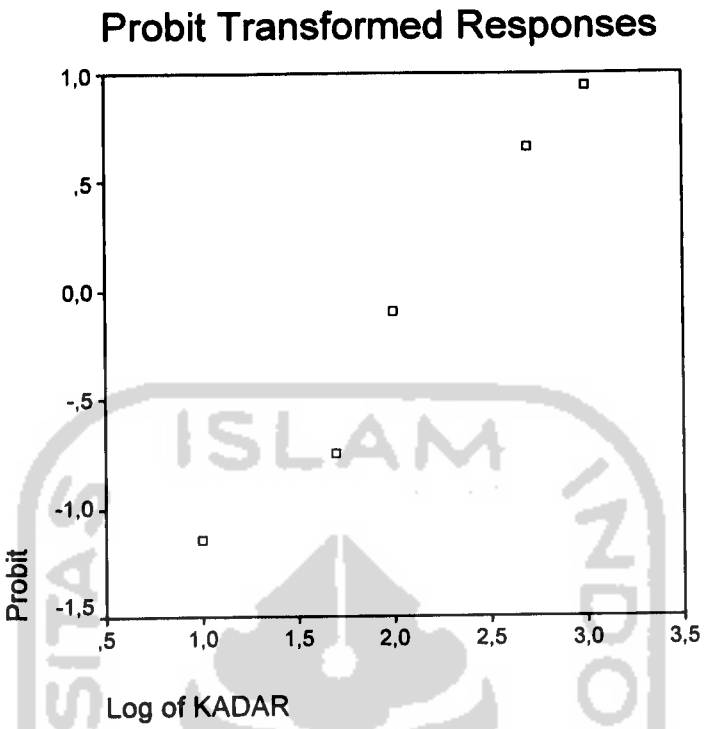
Observed and Expected Frequencies

Log Kadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	149,0	149,029	-,029	,82794
2,70	180,0	134,0	131,214	2,786	,72897
2,00	180,0	83,0	77,760	5,240	,43200
1,70	180,0	41,0	55,054	-14,054	,30586
1,00	180,0	23,0	17,778	5,222	,09877

P R O B I T A N A L Y S I S

Confidence Limits for Effective KADAR

Prob	KADAR	95% Confidence Limits Lower	Upper
,01	1,17821	,11153	4,05965
,02	2,06632	,25401	6,26315
,03	2,95116	,42763	8,25771
,04	3,85867	,63218	10,17594
,05	4,79907	,86824	12,06888
,06	5,77801	1,13678	13,96318
,07	6,79935	1,43904	15,87532
,08	7,86613	1,77646	17,81681
,09	8,98099	2,15065	19,79640
,10	10,14638	2,56336	21,82128
,15	16,81475	5,27473	32,82843
,20	25,12155	9,28204	45,79811
,25	35,45098	14,93925	61,48692
,30	48,30113	22,67441	80,92353
,35	64,33291	32,98644	105,61682
,40	84,44009	46,43839	137,85432
,45	109,85677	63,66096	181,16278
,50	**142,32889**	**85,39716**	**241,04059**
,55	184,39933	112,62850	326,19460
,60	239,90397	146,81480	450,81659
,65	314,88568	190,28704	639,13047
,70	419,40041	246,92130	935,18549
,75	571,42330	323,47722	1425,97570
,80	806,38004	432,70372	2303,48647
,85	1204,74644	601,90087	4065,29754
,90	1996,52689	903,37165	8385,16291
,91	2255,59937	995,34831	9998,53686
,92	2575,28280	1105,47965	12109,64497
,93	2979,32917	1240,16983	14955,16486
,94	3505,96424	1409,43474	18939,19301
,95	4221,12924	1630,00365	24806,79225
,96	5249,86512	1932,43911	34083,53496
,97	6864,26000	2380,34289	50408,56103
,98	9803,65085	3136,97928	84900,98476
,99	17193,42952	4837,10380	193472,83020


Probit Transformed Responses
1,0
,5
0,0
-,5
-1,0
-1,5
Probit
,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
Log of KADAR

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROBIT[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,997[a]	,994	,992	,071150

a. Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,532	1	2,532	500,229	,000[a]
	Residual	,015	3	,005		
	Total	2,548	4			

a. Predictors: (Constant), PROBIT

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,812	,065		12,487	,001
	PROBIT	2,649	,118	,997	22,366	,000

a. Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 5

PROBIT ANALISIS FRAKSI KLOROFORM

P R O B I T A N A L Y S I S

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

P R O B I T A N A L Y S I S

Parameter estimates converged after 9 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	1,27968	,07651	16,72619

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-2,39926	,16112	-14,89154

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 23,717 DF = 3 P = ,000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limit

P R O B I T A N A L Y S I S

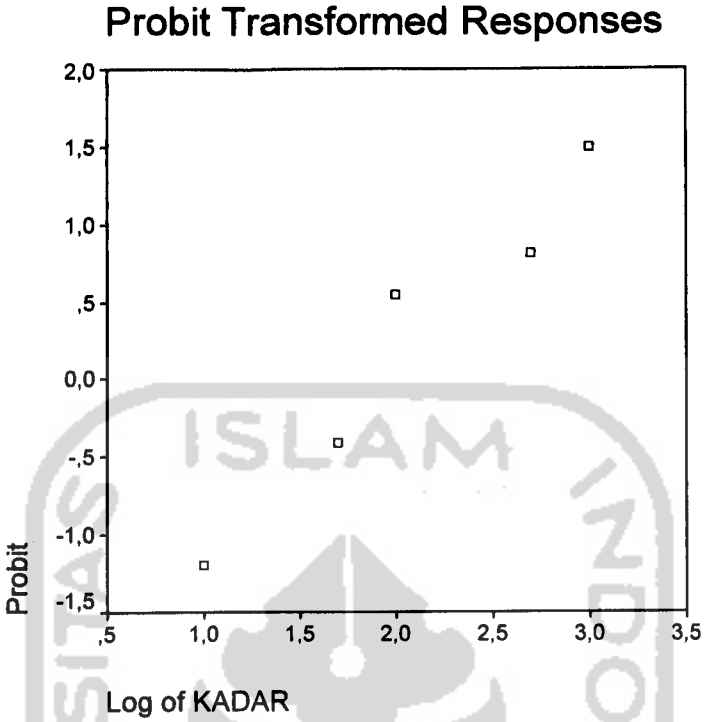
Observed and Expected Frequencies

Log Kadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	168,0	166,507	1,493	,92504
2,70	180,0	143,0	153,754	-10,754	,85419
2,00	180,0	127,0	101,448	25,552	,56360
1,70	180,0	62,0	73,970	-11,970	,41094
1,00	180,0	21,0	23,661	-2,661	,13145

P R O B I T A N A L Y S I S

Confidence Limits for Effective KADAR

Prob	KADAR	95% Confidence Limits Lower	Upper
,01	1,14018	,00573	6,18182
,02	1,86207	,01621	8,63466
,03	2,54186	,03131	10,69398
,04	3,21235	,05131	12,57616
,05	3,88620	,07660	14,36222
,06	4,57001	,10765	16,09316
,07	5,26790	,14499	17,79339
,08	5,98276	,18918	19,47911
,09	6,71678	,24083	21,16193
,10	7,47180	,30060	22,85075
,15	11,61372	,74791	31,60370
,20	16,48945	1,52798	41,30649
,25	22,27461	2,79105	52,51792
,30	29,18075	4,73871	65,92342
,35	37,47829	7,63377	82,50521
,40	47,52362	11,80513	103,77893
,45	59,79830	17,64172	132,19374
,50	**74,96976**	**25,57129**	**171,84564**
,55	93,99039	36,03326	229,78778
,60	118,26677	49,48032	318,54425
,65	149,96591	66,46409	461,29095
,70	192,60867	87,85302	703,59913
,75	252,32610	115,23579	1143,19299
,80	340,85219	151,71007	2016,65674
,85	483,95045	203,85020	4007,58171
,90	752,22377	288,32950	9749,85512
,91	836,77993	312,59710	12120,76660
,92	939,44428	340,93723	15369,63681
,93	1066,92609	374,67130	19976,98877
,94	1229,85751	415,82258	26804,46346
,95	1446,26311	467,69040	37530,96304
,96	1749,64302	536,13758	55820,69854
,97	2211,16534	632,96676	91109,78633
,98	3018,39533	787,22110	175202,41941
,99	4929,43307	1105,03976	493313,10151


Probit Transformed Responses
2,0
1,5
1,0
,5
0,0
-,5
-1,0
-1,5
Probit
,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
Log of KADAR

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROBIT[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,998[a]	,996	,994	,060991

a. Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,536	1	2,536	681,839	,000[a]
	Residual	,011	3	,004		
	Total	2,548	4			

a. Predictors: (Constant), PROBIT

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,669	,061		11,047	,002
	PROBIT	2,445	,094	,998	26,112	,000

a. Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 6

PROBIT ANALISIS FRAKSI ETANOL

P R O B I T A N A L Y S I S

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

P R O B I T A N A L Y S I S

Parameter estimates converged after 9 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	1,17757	,07340	16,04369

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-2,42416	,16140	-15,01920

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 32,020 DF = 3 P = ,000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

P R O B I T A N A L Y S I S

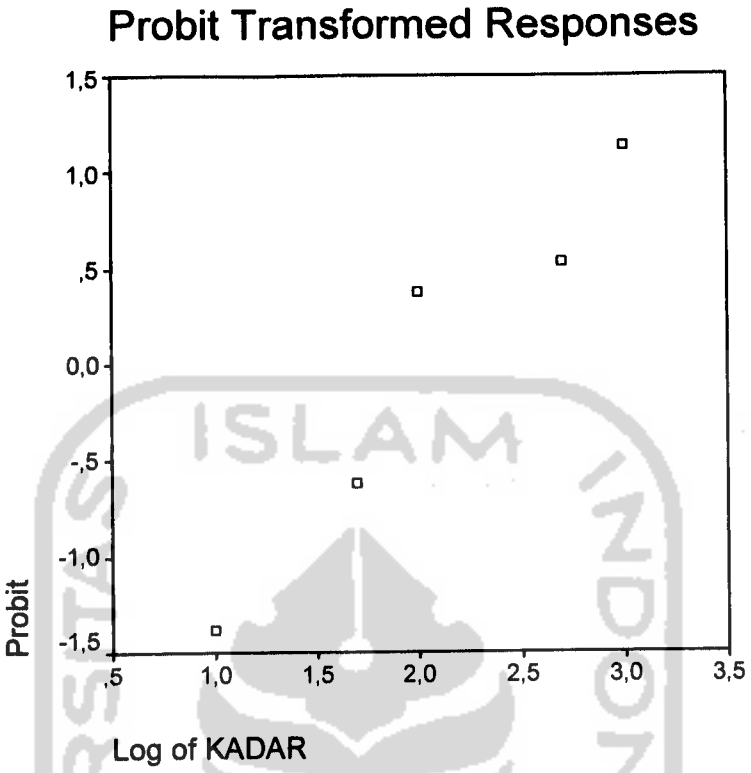
Observed and Expected Frequencies

Log Kadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	157,0	155,913	1,087	,86618
2,70	180,0	126,0	139,426	-13,426	,77459
2,00	180,0	116,0	85,047	30,953	,47248
1,70	180,0	48,0	60,473	-12,473	,33596
1,00	180,0	15,0	19,129	-4,129	,10627

P R O B I T A N A L Y S I S

Confidence Limits for Effective KADAR

Prob	KADAR	95% Confidence Limits Lower	Upper
,01	1,21078	,00020	8,76123
,02	2,06329	,00089	12,33585
,03	2,89358	,00228	15,36655
,04	3,73185	,00465	18,15894
,05	4,58984	,00827	20,82803
,06	5,47387	,01349	23,43255
,07	6,38803	,02070	26,00797
,08	7,33538	,03035	28,57826
,09	8,31842	,04295	31,16112
,10	9,33936	,05907	33,77050
,15	15,08251	,21885	47,58646
,20	22,07546	,60966	63,52836
,25	30,60830	1,44192	82,88803
,30	41,04840	3,05698	107,55216
,35	53,87711	5,97048	140,65126
,40	69,73924	10,88924	187,75361
,45	89,51773	18,65246	259,25524
,50	**114,45157**	**30,06487**	**375,27943**
,55	146,33037	45,70377	575,98663
,60	187,83060	65,92096	944,53676
,65	243,13041	91,16477	1662,83052
,70	319,11504	122,48985	3160,94292
,75	427,96116	162,17221	6567,77445
,80	593,38133	214,78171	15303,00863
,85	868,50048	289,98556	42153,07775
,90	1402,57650	412,22043	154813,66111
,91	1574,71752	447,42856	212603,00374
,92	1785,75065	488,59429	300379,72581
,93	2050,57853	537,65928	439730,18374
,94	2393,03523	597,59914	673834,36232
,95	2853,94660	673,27125	1097835,68848
,96	3510,10153	773,31763	1951006,00463
,97	4526,97541	915,16124	3963584,81155
,98	6348,67784	1141,75546	10196354,6457
,99	10818,74068	1610,49999	45421055,1026


Probit Transformed Responses
1,5
1,0
,5
0,0
-,5
-1,0
-1,5
Probit
,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
Log of KADAR

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROBIT[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,998[a]	,996	,995	,057508

a. Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,538	1	2,538	767,298	,000[a]
	Residual	,010	3	,003		
	Total	2,548	4			

a. Predictors: (Constant), PROBIT

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,778	,054		14,537	,001
	PROBIT	2,546	,092	,998	27,700	,000

a. Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 7

PROBIT ANALISIS FRAKSI AKUADES

P R O B I T A N A L Y S I S

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

P R O B I T A N A L Y S I S

Parameter estimates converged after 10 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	,78220	,06484	12,06384

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-1,67844	,14380	-11,67207

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2,551 DF = 3 P = ,466

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

P R O B I T A N A L Y S I S

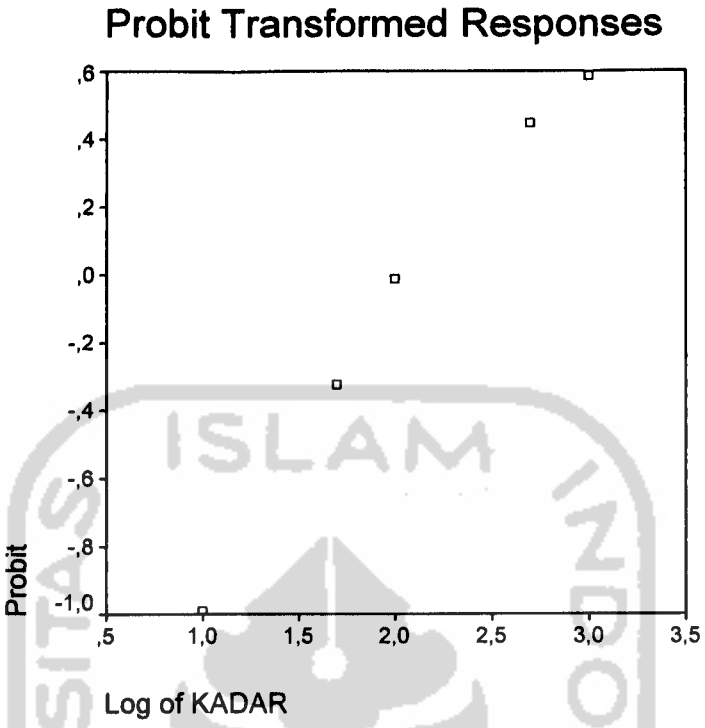
Observed and Expected Frequencies

Log Kadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	130,0	134,637	-4,637	,74798
2,70	180,0	121,0	120,128	,872	,66738
2,00	180,0	89,0	81,828	7,172	,45460
1,70	180,0	67,0	65,404	1,596	,36335
1,00	180,0	29,0	33,311	-4,311	,18506

P R O B I T A N A L Y S I S

Confidence Limits for Effective KADAR

Prob	KADAR	95% Confidence Limits Lower	Upper
,01	,14848	,03881	,39364
,02	,33127	,10078	,78803
,03	,55118	,18453	1,22473
,04	,80841	,29077	1,70709
,05	1,10391	,42078	2,23712
,06	1,43912	,57619	2,81675
,07	1,81582	,75887	3,44805
,08	2,23607	,97090	4,13328
,09	2,70216	1,21453	4,87494
,10	3,21661	1,49224	5,67573
,15	6,61867	3,49216	10,67830
,20	11,74435	6,83711	17,71512
,25	19,20872	12,11263	27,47281
,30	29,87998	20,13039	40,96924
,35	44,99740	31,99950	59,76164
,40	66,36041	49,20940	86,31961
,45	96,63828	73,73826	124,67988
,50	**139,89467**	**108,26531**	**181,55786**
,55	202,51312	156,67099	268,24457
,60	294,91255	225,06881	404,14379
,65	434,92549	323,71525	624,13705
,70	654,97092	470,73853	995,21990
,75	1018,83509	700,43498	1657,67454
,80	1666,37777	1084,50327	2941,44897
,85	2956,86463	1797,05443	5765,69619
,90	6084,19676	3377,93217	13505,10150
,91	7242,55895	3932,19589	16595,69083
,92	8752,20794	4637,07199	20763,30070
,93	10777,77389	5557,79381	26568,26076
,94	13598,92203	6802,45633	34996,60242
,95	17728,31566	8563,74823	47928,99278
,96	24208,57186	11221,11683	69369,09902
,97	35506,29875	15638,30489	109321,17547
,98	59077,27367	24300,80693	200213,34973
,99	131802,94645	48639,63850	520031,85298


Probit Transformed Responses
,6
,4
,2
,0
-,2
-,4
-,6
-,8
-1,0
Probit
,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
Log of KADAR

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROBIT[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,999[a]	,998	,998	,036034

a. Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,544	1	2,544	1959,025	,000[a]
	Residual	,004	3	,001		
	Total	2,548	4			

a. Predictors: (Constant), PROBIT

b. Dependent Variable: LOGKADAR

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		
		B	Std. Error	Beta	t	Sig.
1	(Constant)	,389	,041		9,372	,003
	PROBIT	3,496	,079	,999	44,261	,000

a. Dependent Variable: LOGKADAR

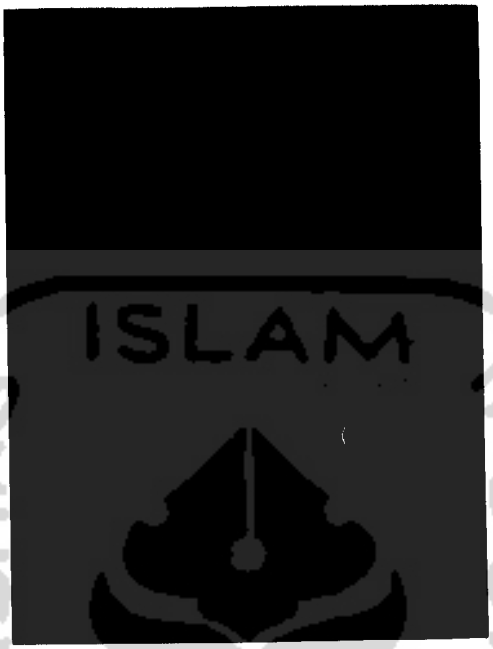
Lampiran 8. Tabel Probit

Tabel probit

Z	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0000	0040	0080	0120	0160	0199	0239	0279	0319	0359
0,1	0398	0438	0478	0517	0557	0596	0636	0675	0714	0754
0,2	0793	0832	0871	0910	0948	0987	1026	1064	1103	1141
0,3	1179	1217	1255	1293	1331	1368	1406	1443	1480	1517
0,4	1554	1591	1628	1664	1700	1736	1772	1808	1844	1879
0,5	1915	1950	1985	2019	2054	2088	2123	2157	2190	2224
0,6	2258	2291	2324	2357	2389	2422	2454	2486	2518	2549
0,7	2580	2612	2642	2673	2704	2734	2764	2794	2823	2852
0,8	2881	2910	2939	2967	2996	3023	3051	3078	3106	3133
0,9	3159	3186	3212	3238	3264	3289	3315	3340	3365	3389
1,0	3413	3438	3461	3485	3508	3531	3554	3577	3599	3621
1,1	3643	3665	3686	3708	3729	3749	3770	3790	3810	3830
1,2	3849	3869	3888	3907	3925	3944	3962	3980	3997	4015
1,3	4032	4049	4066	4082	4099	4115	4131	4147	4162	4177
1,4	4192	4207	4222	4236	4251	4265	4279	4292	4306	4319
1,5	4332	4345	4357	4370	4382	4394	4406	4418	4429	4441
1,6	4452	4463	4474	4484	4495	4505	4515	4525	4535	4545
1,7	4554	4564	4573	5482	4591	4599	4608	4616	4625	4633
1,8	4541	4649	4656	4664	4671	4678	4686	4693	4699	4706
1,9	4713	4719	4726	4732	4738	4744	4750	4756	4761	4767
2,0	4772	4778	4783	4788	4793	4798	4803	4808	4812	4817
2,1	4821	4826	4830	4834	4838	4842	4846	4850	4854	4857
2,2	4861	4864	4868	4871	4875	4878	4881	4884	4887	4890
2,3	4893	4896	4898	4901	4904	4906	4909	4911	4913	4916
2,4	4918	4920	4922	4925	4927	4929	4931	4932	4934	4936
2,5	4938	4940	4941	4943	4945	4946	4948	4949	4951	4952
2,6	4953	4955	4956	4957	4959	4960	4961	4962	4963	4964
2,7	4965	4966	4967	4968	4969	4970	4971	4972	4973	4974
2,8	4974	4975	4976	4977	4977	4978	4979	4979	4980	4981
2,9	4981	4982	4982	4983	4984	4984	4985	4985	4986	4986
3,0	4987	4987	4987	4988	4988	4989	4989	4989	4990	4990
3,1	4990	4991	4991	4991	4992	4992	4992	4992	4993	4993
3,2	4993	4993	4994	4994	4994	4994	4994	4995	4995	4995
3,3	4995	4995	4995	4996	4996	4996	4996	4996	4996	4997
3,4	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4998
3,5	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998
3,6	4998	4998	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999
3,7	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999
3,8	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999
3,9	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

Sumber : Metoda Statistika, DR. Sudjana, M.A., M.Sc., Tarsito, Bandung, 1982.

Lampiran 9. Foto kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform deteksi di bawah UV366



S P

Fase diam : Silika gel GF254

Fase gerak : Metanol – Amoniak (100:1,5)

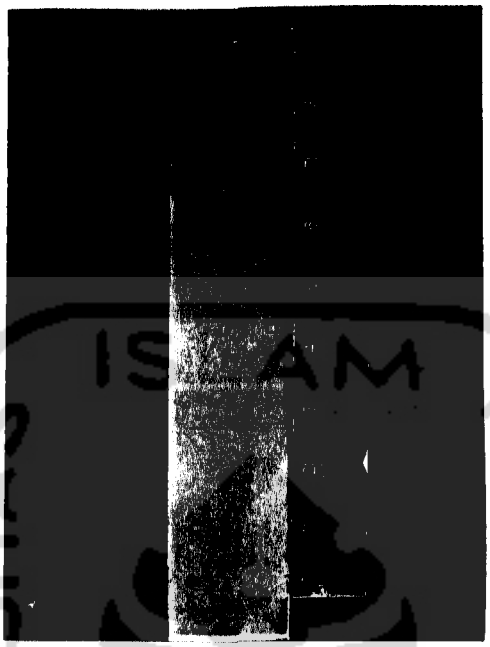
Deteksi : UV366

Keterangan :

P : Pembanding Piperin

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

Lampiran 10. Foto kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff



S P

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : metanol – amoniak (100:1,5)

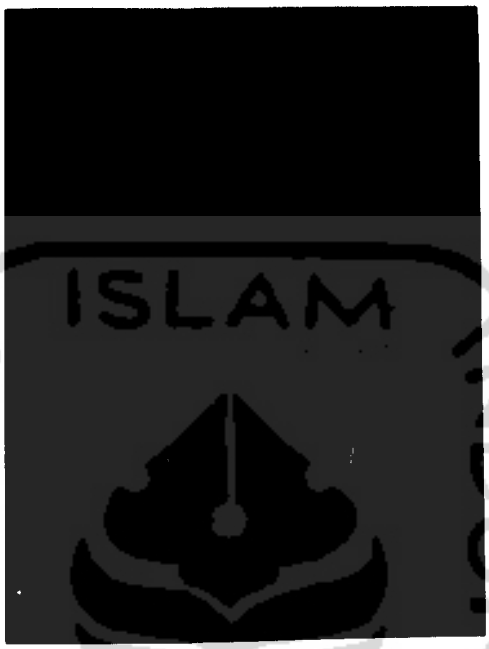
Deteksi : Visibel, Pereaksi semprot Dragendorff

Keterangan :

P : Pembanding Piperin

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

Lampiran 11. Foto kromatogram uji senyawa flavonoid fraksi kloroform deteksi di bawah UV366



S P

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : n-butanol – asam asetat – air (4:1:5)

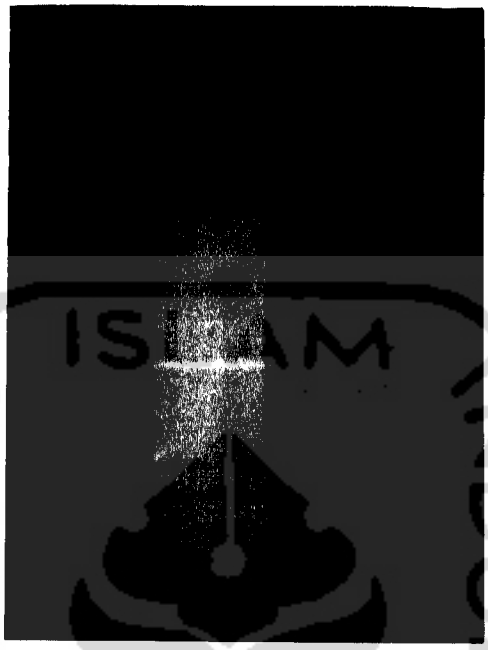
Deteksi : UV_{366}

Keterangan :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding rutin

Lampiran 12. Foto kromatogram uji senyawa flavonoid fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Aluminium (III) klorida



S P

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : n-butanol – asam asetat – air (4:1:5)

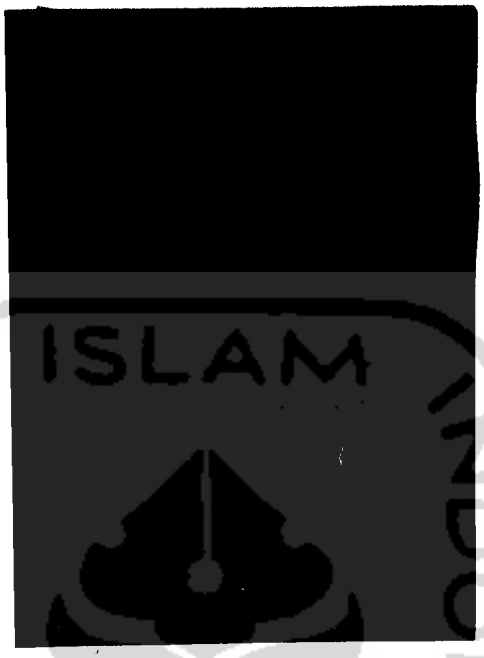
Deteksi : Visibel, Pereaksi semprot Aluminium (III) klorida ($AlCl_3$)

Keterangan :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding rutin

Lampiran 13 Foto kromatogram uji senyawa fenol fraksi kloroform deteksi di bawah UV_{366}



S P

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : metanol – asam formiat (97:3)

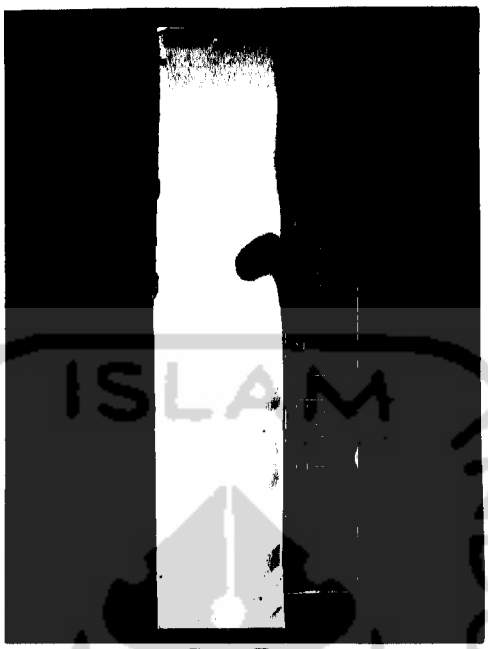
Deteksi : UV_{366}

Keterangan :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding asam galat

Lampiran 14. Foto kromatogram uji senyawa fenol fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Besi (III) klorida



Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : metanol – asam formiat (97:3)

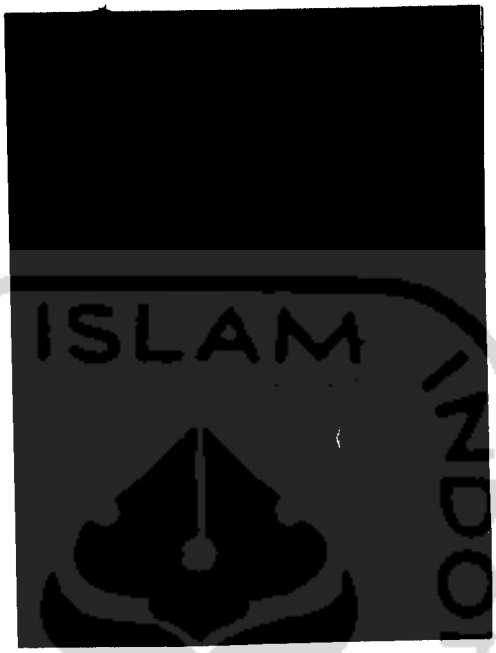
Deteksi : Visibel, Pereaksi semprot Besi (III) klorida ($FeCl_3$)

Keterangan :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding asam galat

Lampiran 15. Foto kromatogram uji senyawa saponin fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV366



S P

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : kloroform – metanol (95:5)

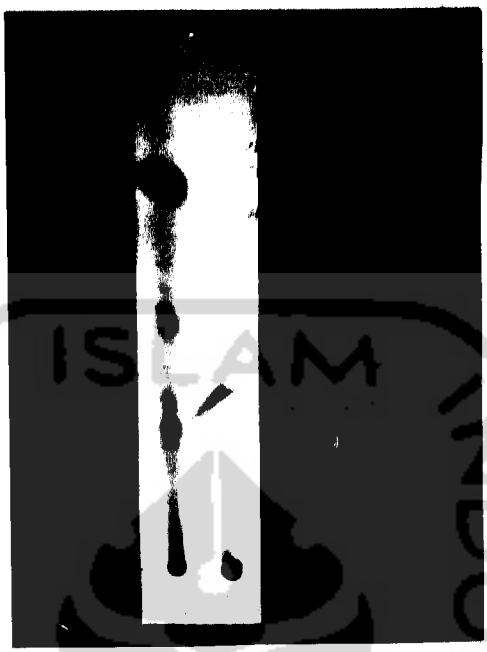
Deteksi : UV_{366}

Keterangan :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding Liquiritae radix

Lampiran 16. Foto kromatogram uji senyawa saponin fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard



S P

Fase diam : Silika gel GF_{254}

Fase gerak : kloroform – metanol (95:5)

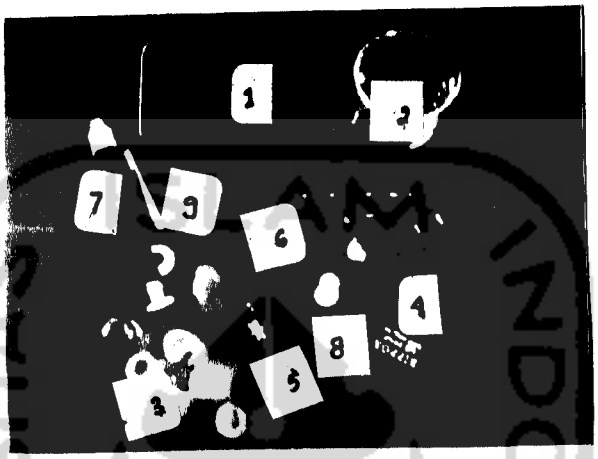
Deteksi : Visibel, Pereaksi semprot Liebermann-Burchard

Keterangan :

S : Fraksi kloroform daun kembang bugang

P : Pembanding Liquiritae radix

Lampiran 17. Foto alat-alat yang digunakan dalam uji toksisitas dengan metode *BST*



Keterangan :

1. **kontainer plastik**
2. **beker glass**
3. **flakon**
4. **aerator**
5. **luv**
6. **pipet ukur**
7. **pro pipet**
8. **labu takar**
9. **pipet tetes**

Lampiran 18. Foto telur dan nauplius *Artemia salina* Leach

Telur *Artemia salina* Leach

Nauplius *Artemia salina* Leach