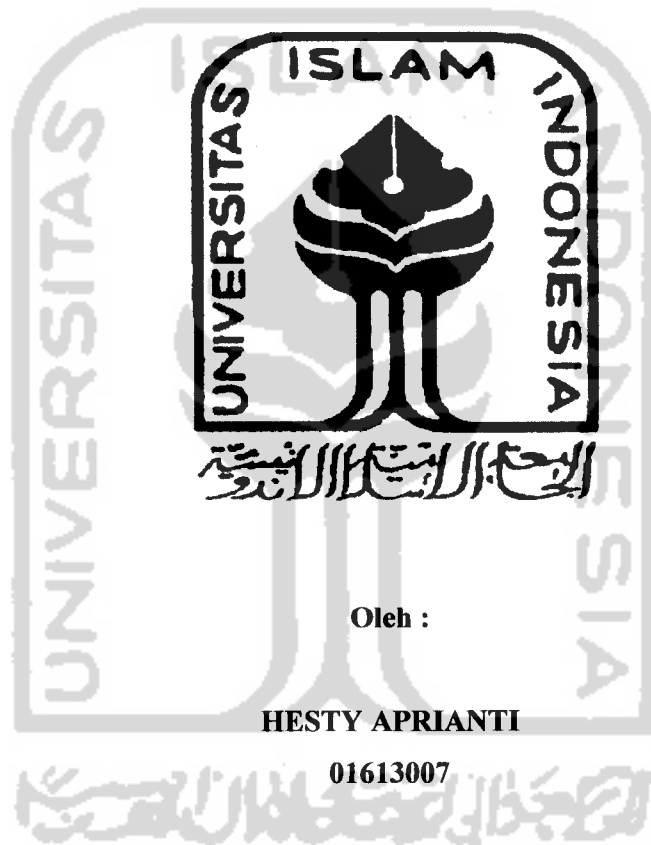


**UJI TOKSISITAS AKUT DAUN JOHAR (*Cassia siamea* L.)
DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (BST)
BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS
FRAKSI PALING AKTIF**

SKRIPSI



Oleh :

HESTY APRIANTI

01613007

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

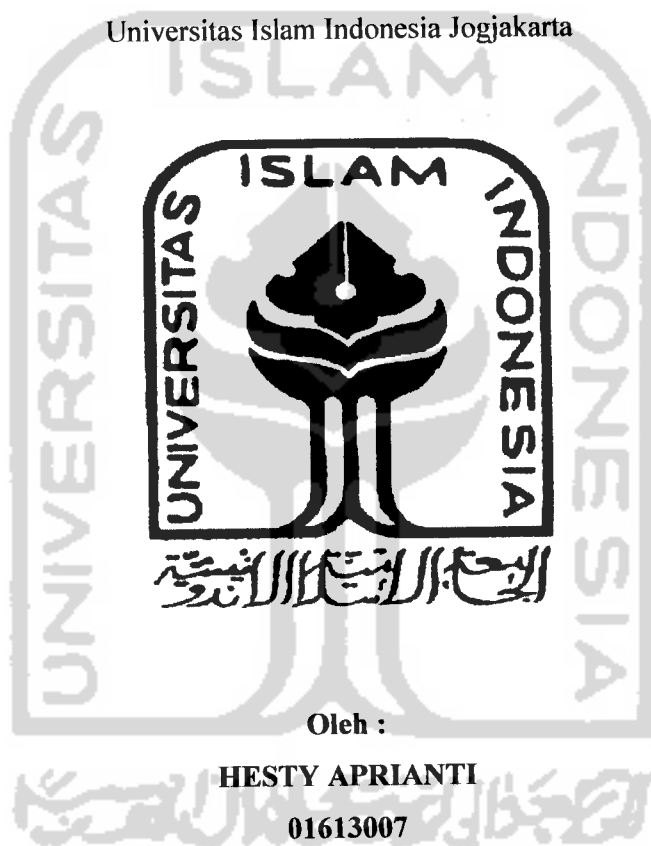
**UJI TOKSISITAS AKUT DAUN JOHAR (*Cassia siamea* L.)
DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST*
(BST) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS
FRAKSI PALING AKTIF**

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 :

HESTY APRIANTI

01613007

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

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS AKUT DAUN JOHAR (*Cassia siamea* L.)
DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (BST)
BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS
FRAKSI PALING AKTIF

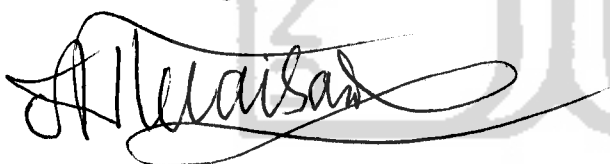
Yang diajukan oleh

HESTY APRIANTI

01613007

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Dr. C. J. Soegihardjo, Apt

Pembimbing Pendamping,



Farida Hayati, M.Si., Apt

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS AKUT DAUN JOHAR (*Cassia siamea* L.) DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS LETHALITY TEST* (BST) BESERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI PALING AKTIF

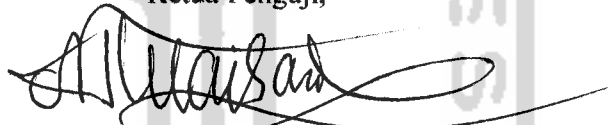
Oleh :

HESTY APRIANTI

01613007

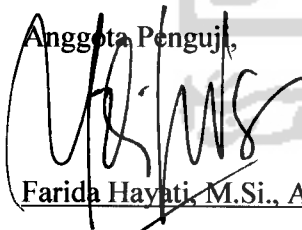
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia
Tanggal: 13 Juli 2006

Ketua Penguji,



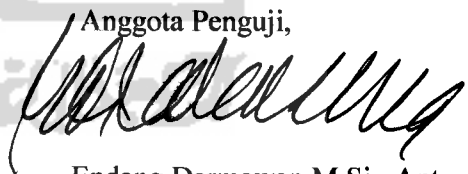
Dr. C. J. Soegihardjo, Apt

Anggota Penguji,



Farida Hayati, M.Si., Apt

Anggota Penguji,



Endang Darmawan M.Si., Apt

Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

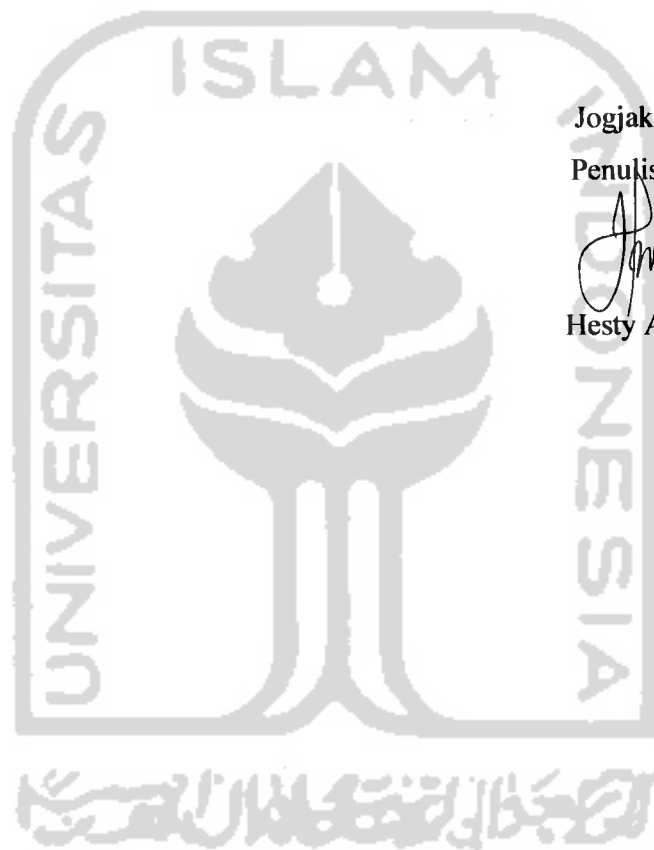
Universitas Islam Indonesia



Endang Darmawan, M.Si., Apt

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar sarjana 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, Juli 2006

Penulis,

Hesty Aprianti

HALAMAN PERSEMBAHAN

“ Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakan dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap” (QS. Al Insyirah (94) : 6-8)

*Di sebuah tempat yang bernama hati
Tinggallah seorang ayah yang bernama pengorbanan
Bersama seorang ibu yang bernama pengertian
Ayah & Ibu itu dikarunia anak yang bernama...
Cinta, Kasih, dan Sayang
Wahai pencipta Cinta, Kasih, dan Sayang...
Sujud syukurku hanya untuk-Mu
Karena telah mengizinkan aku untuk tinggal di tempat itu*

*Puji syukur hanya untuk Allah SWT
Kupersembahkan untuk yang sangat aku kasahi :*

- Bapak (H. Aswardi Ms) dan Mamak (Hj. Hafni M), yang selalu menuntunku pada arti sebuah kehidupan, nilai ketulusan, kesabaran dan pengorbanan, yang selalu memberi nasehat, dukungan baik moral, material dan spiritual, ungkapan rasa hormat dan baktiku, seluruh hidup anaknda tidak akan pernah bisa membalas kasih sayang dan pengorbanan yang telah kalian berikan untuk anaknda, tiada ternilai perjuangan kalian demi masa depan anaknda, terima kasih atas doanya, anaknda salut dengan “Hati Emas” kalian..
- Kakakku (Yudhi & Debi), adikku (Ira), serta keponakanku (Agri), kalian telah memberi warna dalam hidupku dan yang selalu membuat ku rindu untuk pulang.
- “Abang” Yudhi Agus Kurniawan, ST...yang telah bersama mewarnai cerita, mengalirkan semangat dan mengiriku dalam doa, selalu setia dan sabar membimbingku untuk meraih sukses bersama, terima kasih untuk kuliah luar biasanya.

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 Johar (*Cassia siamea* 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 sarjana 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 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. Yandi Syukri, M. Si., Apt, selaku Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
5. 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.
6. Semua Staf Laboratorium Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia. Terima kasih atas semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis.

7. Keluarga Besar ku, yang telah menyayangiku dari kecil hingga sekarang. Seribu keinginan untuk membahagiakan kalian, hanya ini sedikit bakti tulusku.
8. Sahabatku, Umi Ulfa, yang telah bersama saling dukung untuk maju, tanpa mu mungkin skripsi ini tidak akan selesai. Terima kasih banyak atas kritik dan bantuannya, semoga persahabatan yang indah ini abadi. (semoga langgeng sama sama Loid ya...).
9. Semua sahabat, teman, dan kawan-kawan yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

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

Jogjakarta, Juli 2006

Penulis,



Hesty Aprianti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB. II STUDI PUSTAKA	4
A. Tinjauan Pustaka.....	4
1. Uraian Tanaman.....	4
a. Nama daerah.....	4
b. Klasifikasi.....	4
c. Sinonim.....	4
d. Morfologi.....	5
e. Khasiat.....	5
f. Kandungan kimia.....	5
2. Uraian kandungan senyawa tanaman.....	5
a. Alkaloid.....	5

b. Triterpen dan steroid.....	5
3. Metode Penyarian.....	6
a. Infundasi.....	6
b. Maserasi.....	6
c. Perkolasi.....	7
d. Penyarian berkesinambungan.....	7
4. Toksisitas.....	8
5. <i>Brine Shrimps Lethality Test</i> (BST).....	9
6. <i>Artemia salina</i> Leach.....	9
a. Klasifikasi.....	9
b. Morfologi.....	10
c. Lingkungan hidup.....	11
d. Perkembangan dan siklus hidup.....	11
e. Penetasan telur <i>Artemia</i>	12
f. Penggunaan <i>Artemia salina</i> Leach.....	13
7. Kromatografi Lapis Tipis.....	13
a. Fase diam.....	14
b. Fase gerak.....	14
8. Kanker.....	16
a. Obat anti kanker.....	16
b. Uji aktivitas anti kanker.....	16
B. Keterangan Empiris.....	17
BAB III. METODE PENELITIAN.....	18
A. Bahan dan Alat.....	18
1. Bahan.....	18
2. Alat.....	18
B. Cara Penelitian.....	19
1. Determinasi.....	19
2. Penyiapan bahan utama.....	19
3. Ekstraksi daun johar.....	19

4. Uji toksisitas.....	21
a. Penyiapan air laut.....	21
b. Penyiapan sample uji.....	21
c. Penetasan telur <i>Artemia salina</i> Leach.....	21
d. Pemeriksaan toksisitas terhadap <i>Artemia salina</i> Leach....	22
e. Cara analisis data.....	22
f. Profil kromatografi lapis tipis.....	24
C. Analisis Hasil.....	24
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
A. Determinasi Tanaman.....	26
B. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Serbuk.....	26
C. Penyarian Bahan.....	27
D. Penetasan <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
E. Uji Toksisitas.....	30
F. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis.....	35
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
A. Kesimpulan.....	39
B. Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel I. Kriteria ketoksikan LC ₅₀	8
Tabel II. Penyiapan larutan sampel dari larutan induk 5 µg/ml.....	21
Tabel III. Rendemen masing-masing ekstrak dari 50 gram serbuk daun johar.....	29
Tabel IV. Jumlah larva <i>Artemia salina</i> Leach yang mati pada ekstrak petroleum eter setelah 24 jam.....	32
Tabel V. Jumlah larva <i>Artemia salina</i> Leach yang mati pada ekstrak kloroform setelah 24 jam.....	32
Tabel VI. Jumlah larva <i>Artemia salina</i> Leach yang mati pada ekstrak etanol setelah 24 jam.....	32
Tabel VII. Jumlah larva <i>Artemia salina</i> Leach yang mati pada ekstrak aquades setelah 24 jam.....	33
Tabel VIII. Persentase kematian larva <i>Artemia salina</i> Leach.....	33
Tabel IX. Persamaan garis lurus hasil uji BST terhadap fraksi daun johar.....	34
Tabel X. Harga LC ₅₀ pada uji toksisitas fraksi daun johar terhadap larva <i>Artemia salina</i> Leach dengan metode BST.....	34
Tabel XI. Data uji KLT senyawa alkaloid dari fraksi kloroform.....	36
Tabel XII. Data uji KLT senyawa triterpen dan steroid dari fraksi kloroform.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan determinasi.....	43
Lampiran 2. Foto tanaman <i>Cassia siamea</i>	44
Lampiran 3. Foto telur dan nauplius <i>Artemia salina</i> Leach	45
Lampiran 4. Foto alat-alat yang digunakan dalam uji toksisitas dengan Metode BST	46
Lampiran 5. Foto kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV ₃₆₆	47
Lampiran 6. Foto kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff	48
Lampiran 7. Foto kromatogram uji senyawa terpen fraksi kloroform deteksi di bawah sinar UV ₃₆₆	49
Lampiran 8. Foto kromatogram uji senyawa terpen fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi Anisaldehyd-Asam sulfat	50
Lampiran 9. Persentase kematian larva <i>Artemia salina</i> Leach	51
Lampiran 10. Hasil analisis probit fraksi petroleum eter.....	52
Lampiran 11. Hasil analisis probit fraksi kloroform.....	56
Lampiran 12. Hasil analisis probit fraksi etanol.....	60
Lampiran 13. Hasil analisis probit fraksi aquades	64
Lampiran 14. Hasil analisis <i>Two-Way anova</i>	68

**UJI TOKSISITAS AKUT DAUN JOHAR (*Cassia siamea* Lamk) 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 *Cassia siamea* L atau yang biasa dikenal dengan johar. Tanaman suku Caesalpiniaceae ini banyak digunakan masyarakat sebagai obat malaria, *anthelmintic*, *anti-Hypertensive*, *dandruff*, *insomnia*, *laxative*, *tranquilizer*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas fraksi dari daun *Cassia siamea* L terhadap *Artemia salina* Leach. Uji toksisitas dengan metode fraksinasi (petroleum eter, kloroform, etanol, aquades) 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 ekstrak aktif dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (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 johar (*Cassia siamea* L) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *BST* menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter memiliki nilai LC_{50} 483 µg/ml, fraksi kloroform memiliki LC_{50} 109 µg/ml, fraksi etanol memiliki nilai LC_{50} 140 µg/ml dan fraksi aquades memiliki nilai LC_{50} 179 µg/ml. Fraksi kloroform merupakan fraksi dengan LC_{50} paling rendah. Fraksi paling aktif dari daun johar mengandung senyawa alkaloid dan triterpen.

Kata kunci : Daun johar (*Cassia siamea* L.), *Artemia salina* Leach, *Brine Shrimps Lethality Test (BST)*, LC_{50} , Kromatografi Lapis Tipis

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

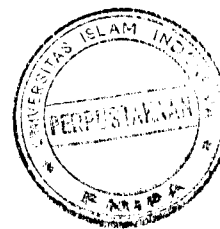
ABSTRACT

Taking the advantage of medicinal plants has rapidly increased; one of the plants is *Cassia siamea* L. or usually most popular with "johar". The family of Caesalpiniaceae is used as a medicine of malaria, anthelmintic, antihypertensive, dandruff, insomnia, laxative, tranquilizer. This research purposes the find out toxicity fraction folium of *Cassia siamea* L. on *Artemia salina* Leach. Examined toxicity with methods of Brine Shrimps Lethality Test (BST), was conducted by dissolving each extract (petroleum ether, chloroform, ethanol and aquadest) in appropriate solvent, and structured in one concentrated series for each fraction (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml). The negative control was made up equal to sample without tested fraction. Each flaon 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 active extract was carried out by thin layer chromatography (TLC). Test by mean of organism can used to determine the bio pharmaceutical activities of extract 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 folium of *Cassia siamea* L. to larva *Artemia salina* Leach with methods brine shrimps lethality test (BST) represent that petroleum ether fraction have value of LC_{50} is 483 µg/ml, chloroform fraction have value of LC_{50} is 109 µg/ml, ethanol fraction value of LC_{50} is 140 µg/ml, and aquadest fraction have value of LC_{50} is 179 µg/ml. Chloroform fraction have the lower LC_{50} . The most active fraction of folium is identified that the fraction contains the alkaloid and triterpen.

Key word : *Cassia siamea* L folium, *Artemia salina* Leach, Brine Shrimps Lethality Test (BST), LC_{50} , TLC

BAB I

PENDAHULUAN



A. Latar belakang masalah

Indonesia kaya dengan kebudayaan dan keanekaragaman hayati tumbuhan obat yang digunakan oleh kebanyakan masyarakat Indonesia. Salah satunya adalah penggunaan obat tradisional yang dikonsumsi hampir 90% dari jumlah penduduk Indonesia. Penggunaan obat tradisional sudah berlangsung sejak dulu sampai sekarang, walaupun hanya berdasarkan pengalaman turun temurun dan saat ini penggunaannya ada kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun. Satu keuntungan nyata dari obat tradisional adalah efek sampingnya yang relatif lebih kecil dibanding obat modern, namun sebagian besar kandungan yang terdapat dalam obat tradisional tidak diketahui zat aktifnya (Astuti, 1997).

Kanker adalah jenis tumor yang ganas (Kusbiwati, 2000). Kanker dapat menyerang semua bagian tubuh. Berdasarkan organ-organ tubuh yang terserang, dikenal berbagai jenis kanker seperti kanker payudara, kanker mulut rahim, kanker otak, kanker hati, kanker paru-paru, kanker prostat, kanker kulit, dan kanker usus. Kanker mulut rahim dan payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak ditemukan di Indonesia (Mangan, 2003). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), setiap tahun penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta orang dan 10 tahun mendatang diperkirakan sembilan 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, 2000).

Pengobatan kanker secara medis yang biasa dilakukan selama ini adalah dengan terapi pembedahan, penyinaran, dan terapi kimia. Saat ini, dalam pengobatan kanker secara medis hampir selalu dilakukan dengan mengkombinasikan pengobatan radiasi dengan kemoterapi. Sistem pengobatan kanker ini bertujuan untuk mengejar dan membunuh sel-sel kanker yang mungkin lepas dari induknya mengikuti aliran darah atau saluran getah bening terutama pada kanker stadium lanjut. Tetapi sistem pengobatan dengan cara ini

menimbulkan efek samping pada penderita seperti rambut menjadi rontok, kulit menjadi kering terbakar dan bersisik, bibir pecah-pecah, dan lidah menjadi mati rasa (Herba, 2003).

Cara pengobatan tradisional terhadap kanker tidak dapat diabaikan, karena memang telah terbukti banyak yang dapat disembuhkan, berbeda dengan obat-obatan modern penemuan ramuan tradisional yang ternyata berkhasiat mengobati kanker kebanyakan berdasarkan etnobotani dan etnofarmakolgi (Dwiatmaka, 2000). Johar (*Cassia siamea* Lamk) merupakan salah satu tumbuhan yang telah diteliti kemampuannya sebagai obat malaria, karena daunnya mengandung alkaloid bersifat racun, triterpen, dan steroid (Dzulkarnain, 1998).

Berdasarkan kenyataan tersebut, maka dicoba untuk melakukan skrining terhadap tanaman-tanaman yang dapat digunakan untuk mengobati kanker. Prinsip suatu tumbuhan bisa digunakan untuk anti kanker adalah tumbuhan tersebut mengandung senyawa sitotoksik (Dewi, 2004). Salah satunya metode yang mudah dan murah untuk arah penelitian ini adalah dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) (Meyer *et al.*, 1982). Uji dengan larva udang ini juga dapat digunakan untuk skrining awal terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai anti kanker. Dengan kata lain uji ini seringkali mempunyai korelasi yang positif dengan potensinya sebagai anti kanker.

B. Perumusan Masalah

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

1. Seberapa besar potensi ketoksikan dari *Cassia Siamea* Lamk dengan menggunakan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (BST)?
2. Golongan senyawa apa saja yang terkandung dalam fraksi yang paling aktif?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan :

1. Untuk mengetahui ketoksikan akut dari daun johar (*Cassia siamea* Lamk) terhadap *Artemia salina* Leach dengan metode *BST*.
2. Untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi daun johar (*Cassia siamea* Lamk) yang paling toksik.

D. Manfaat Penelitian

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

BAB II
STUDI PUSTAKA
A. Tinjauan pustaka

1. Uraian tanaman

Tanaman *Cassia siamea* L

- a. Nama daerah : Juwar, Ju (Sumatera); Johar, Juwar (Jawa)
- b. Klasifikasi
 - Divisi : Spermatophyta
 - Anak Divisi : Angiospermae
 - Kelas : Dicotyledonae
 - Bangsa : Leguminosae
 - Suku : Caesalpiniaceae
 - Marga : Cassia
 - Jenis : *Cassia siamea* L
- c. Sinonim : *Senna siamea* Lamk
- d. Morfologi

Pohon tinggi 2-20 cm. Daun menyirip genap. Kelenjar poros daun tidak ada atau satu diantara pasangan daun terbawah. Anak daun oval sampai memanjang, kerap kali melekuk ke dalam, bagian atas gundul dan mengkilat sedikit, bawah berambut halus 3-7,5 kali 1-2,5 cm. Daun penumpu cepat rontok, sangat kecil tidak berarti. Kelopak terbagi 5 dalam. Daun mahkota kuning cerah, panjang ± 2 cm. Tangkai sari terpanjang ± 1 cm. Bakal buah dengan tangkai putik lebih kurang sama panjangnya dengan benang sari yang terpanjang. Polongan dengan katup yang tebal dan sambungan buah yang sangat dipertebal, di antara sambungan berkelok-kelok, 15-30 kali 1,5 cm, berkatup 2, biji 20-30, panjang $\pm 1,5$ kali lebar. Dari Asia Tenggara, kerap kali ditanam dan juga menjadi liar; 1-1000 m (van Steenis, 1997).

Daun johar adalah anak daun majemuk *Cassia siamea* Lamk, suku Caesalpiniaceae. Helaian daun warna hijau sampai hijau kecoklatan, bentuk jorong sampai bundar telur memanjang, panjang helaian daun 3-7,5 cm dan lebar 1-2,5 cm, ujung daun tumpul atau agak terbelah, pangkal tumpul atau agak

membundar, pinggir daun rata, permukaan atas gundul, permukaan bawah berambut halus, tulang daun menyirip, ujung ibu tulang daun menonjol dari ujung helaian daun (Anonim, 1989).

e. Khasiat : obat malaria, *anthelmintic*, *antihypertensive*, *dandruff*, *insomnia*, *laxative*, dan *tranquilizer* (Rizvi, 1998).

f. Kandungan kimia : Tanaman johar mengandung senyawa alkaloid, triterpen dan steroid (www.iptek.net.id).

2. Uraian kandungan senyawa tanaman

a. 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).

b. Triterpen dan steroid

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Berupa senyawa tanwarna, berbentuk kristal, seringkali bertitik leleh tinggi dan aktif optik, yang umumnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya.

Sterol adalah triterpen yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantrena. Dahulu sterol terutama dianggap sebagai senyawa satwa (sebagai hormon kelamin, asam empedu, dan lain-lain), tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa tersebut ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Harborne, 1987).

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 (Ansel, 1989). Berbagai macam metode penyarian yang digunakan tergantung dari wujud dan kandungan zat dari bahan yang akan disari dan untuk analisis fitokimia idealnya digunakan jaringan tumbuhan segar, beberapa menit setelah dikumpulkan, bahan tumbuhan ini dimasukkan ke dalam alkohol mendidih. Cara lain tumbuhan dapat dikeringkan secepatnya tanpa penggunaan suhu tinggi, lebih baik dengan aliran udara sampai betul-betul kering untuk mencegah perubahan kimia yang terlalu banyak (Harborne, 1987).

Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang ada di dalam simplisia terdapat dalam bentuk yang mempunyai kadar tinggi dan hal ini memudahkan zat berkhasiat dapat diatur dosisnya. Ekstrak adalah sediaan yang dapat berupa kering, kental dan cair, dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, perkolasi, atau penyeduhan dengan air mendidih. Sebagai cairan penyari digunakan air, eter atau campuran etanol dan air. Penyarian dilakukan diluar pengaruh cahaya matahari langsung (Anief, 2000).

Metode penyarian yang paling sering digunakan adalah infundasi, maserasi, perkolasi, dan ekstraksi dengan alat Soxhlet.

a. Infundasi

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat aktif yang larut dalam air dan bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu, sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Anonim, 1986).

b. Maserasi

Istilah maserasi berasal dari bahasa Latin *macerare* yang artinya merendam. Merupakan proses paling tepat dimana obat yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam cairan penyari sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut.

yang telah ditetapkan, bejana ditutup rapat dan isinya dikocok berulang-ulang lamanya biasanya berkisar 2-14 hari. Pengocokan memungkinkan pelarut segar mengalir berulang-ulang masuk ke seluruh permukaan dari obat yang sudah halus. Zat-zat yang mudah larut dalam cairan penyari cenderung turun ke dasar bejana karena sifat gaya beratnya dan cairan penyari yang segar akan naik ke permukaan dan proses ini berlanjut secara siklis. Ekstrak dipisahkan dari ampasnya dengan menyaring dan membilasnya dengan penambahan cairan penyari baru (Ansel, 1985).

Setelah selesai waktu maserasi, artinya kesetimbangan antara obat yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan telah tercapai, maka proses difusi segera berakhir (Voight, 1984).

c. Perkolasi

Istilah perkolasi berasal dari bahasa Latin *per* artinya melalui dan *colare* artinya merembes. Secara umum perkolasi dapat dinyatakan sebagai proses dimana obat yang sudah halus diekstraksi dengan pelarut yang cocok dengan melewati secara perlahan-lahan melalui obat dalam suatu kolom. Obat dimampatkan ke dalam suatu alat ekstraksi khusus yang disebut perkolator. Dalam proses perkolasi, mengalirnya cairan penyari melalui kolom obat dari atas ke bawah menuju celah untuk keluar yang ditarik oleh gaya berat seberat cairan dalam kolom (Ansel, 1985).

d. Penyarian berkesinambungan

Bahan yang akan diekstraksi berada di dalam kantung ekstraksi (kertas / karton) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja terus menerus. Wadah gelas diletakkan diantara labu suling dan suatu pendingin aliran balik. Labu berisi bahan pelarut yang menguap dan mencapai pendingin balik, berkondensasi kemudian menetes ke atas bahan yang diekstraksi dan membawa keluar bahan yang diekstraksi tersebut. Larutan terkumpul dalam wadah dan mencapai tinggi maksimal secara otomatis ditarik ke dalam labu sehingga zat yang terekstraksi tertimbun melalui penguapan kontinyu dari bahan pelarut murni (Voight, 1984).

sehingga zat yang terekstraksi tertimbun melalui penguapan kontinyu dari bahan pelarut murni (Voight, 1984).

4. Toksisitas

Toksisitas merupakan istilah yang biasa digunakan dalam membandingkan suatu zat kimia yang satu terhadap zat kimia yang lainnya. Sumber zat toksik bervariasi, secara sederhana dapat dibedakan atas zat toksik yang berasal dari sumber alam (tanaman, hewan dan sumber mineral) dan zat toksik buatan atau sintetis (Casarett and Doull, 1975).

Konsep dasar dalam uji toksisitas, bahwa tidak ada senyawa yang dianggap benar-benar aman, dan tidak ada pula senyawa yang dapat dianggap berbahaya. Hal tersebut didasari suatu pernyataan bahwa interaksi suatu senyawa dengan jaringan biologi tidak akan menimbulkan efek tertentu sebelum melampaui batas minimal senyawa tersebut untuk menimbulkan efek, sehingga faktor penting yang menentukan potensi bahaya atau amannya suatu senyawa adalah hubungan antara kadar senyawa itu dan efek yang ditimbulkan atas jaringan biologi tertentu (Loomis, 1978). Kriteria ukuran ketoksikan menurut Loomis (1978) dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Kriteria ketoksikan LD₅₀ (Loomis, 1978)

Ukuran ketoksikan	LC ₅₀
Luar biasa toksik	1 mg / kg atau kurang
Sangat toksik	1 - 50 mg / kg
Cukup toksik	50 - 500 mg / kg
Sedikit toksik	0,5 - 5 mg / kg
Praktis tidak toksik	5 - 15 mg / kg
Relatif kurang berbahaya	Lebih daripada 15 mg / kg

Penggolongan tersebut hanya berlaku untuk harga LD₅₀ pada hewan percobaan, untuk harga LC₅₀ dibedakan sebagai berikut.

- 1) Toksik (LC₅₀ ≤ 1000 µg/ml), dan
- 2) tidak toksik (LC₅₀ ≥ 1000 µg/ml).

Uji toksisitas senyawa pada makhluk hidup uji dilakukan sebelum diujikan pada manusia. Ada 3 tipe uji toksisitas secara umum sebagai berikut.

a. Uji toksisitas akut merupakan hasil pengamatan dengan dosis tunggal dan diamati selama 24 jam atau kadang-kadang dosis berulang-ulang dengan waktu selama lebih 24 jam, yang dalam beberapa kasus selama 1 minggu,

b. uji toksisitas sub akut, yaitu senyawa diberikan dengan dosis berulang-ulang dan pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Senyawa kimia uji mungkin diberikan sekali sehari atau lebih, dan

c. uji toksisitas kronik, senyawa diberikan dengan dosis berulang dan pengamatan dilakukan dengan diperpanjang sampai 3 bulan atau 2 tahun atau senyawa kimia uji diberikan selama sebagian besar masa makhluk hidup uji.

5. *Brine Shrimps Lethality Test* (BST)

Brine Shrimp Lethality Test (BST) merupakan salah satu metode untuk menentukan toksisitas ekstrak maupun senyawa dari tanaman. Metode menggunakan *Artemia salina* kini banyak digunakan karena sederhana, murah, waktunya singkat, serta hasilnya akurat. Adapun caranya dengan menentukan harga LC_{50} dari ekstrak, senyawa aktif, dan fraksi tumbuhan. Harga LC_{50} ditentukan dengan cara membuat bermacam-macam kadar ekstrak, senyawa aktif dan fraksi tumbuhan kemudian diperlakukan pada *Artemia salina*. Jumlah *Artemia salina* yang mati dan yang masih hidup pada tiap kadar dihitung untuk menentukan harga LC_{50} (Meyer *et al.*, 1982).

6. *Artemia salina* Leach

Artemia atau *brine shrimp* adalah sejenis udang-udangan primitif. Pada tahun 1778, *Artemia* diberi nama *Cancer salinus*. Dan pada tahun 1819 diberi nama *Artemia salina* oleh Leach.

a. Klasifikasi

Kingdom	: Animal
Subkingdom	: Metazoa
Divisi	: Arthropoda
Subdivisi	: Mandibulata
Classis	: Crustaceae
Subclassis	: Branchioida

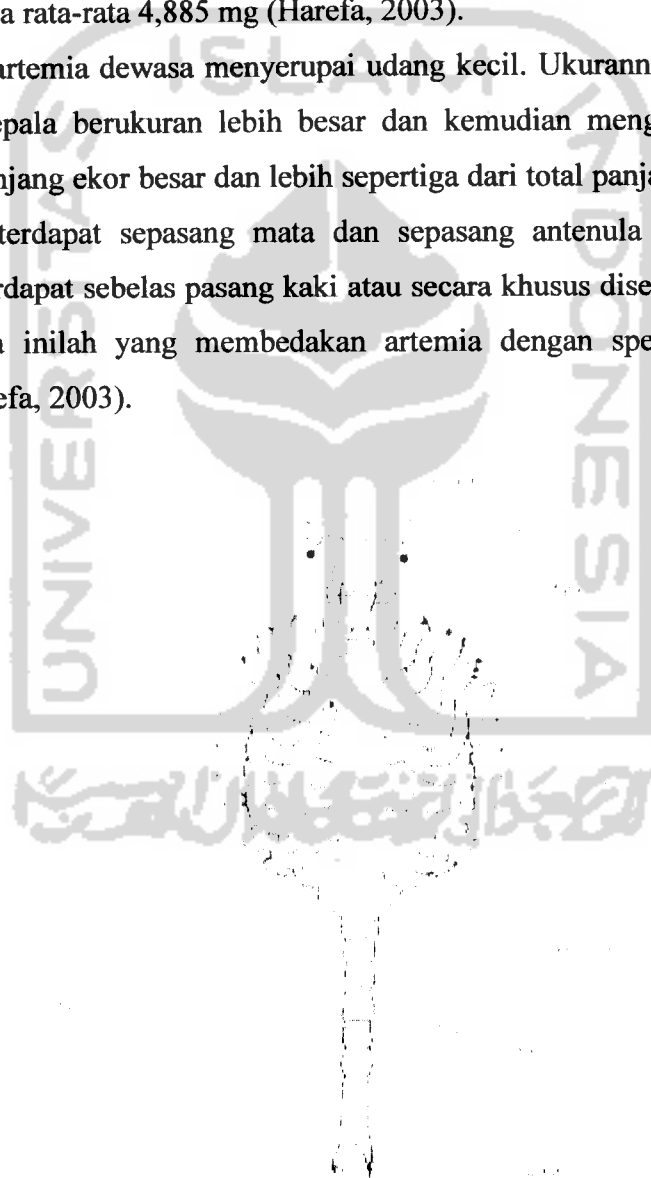
Genus : *Artemia*
 Species : *Artemia salina* Leach

(Mudjiman, 2001).

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 kemudian 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)

Artemia salina hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 40-300 permil). Untuk pertumbuhan artemia yang baik maka suhu yang dikehendaki berkisar antara 25° – 30° C, oksigen larut sekitar 3 ml/L dan pH 7,3 – 8,4. Di perairan alam makanannya terdiri dari detritus bahan organik (sisasisa 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, 2001).

d. Perkembangan dan siklus hidup

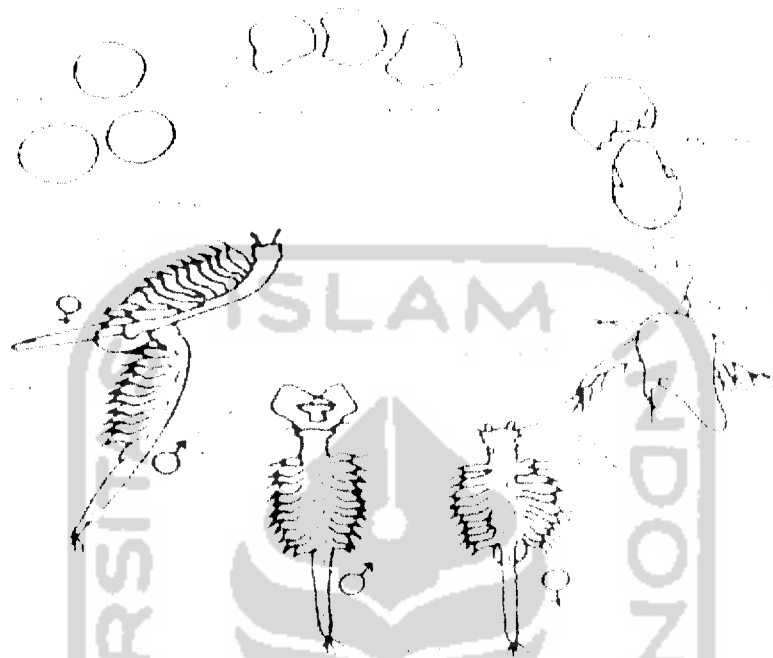
Artemia salina Leach dapat dibedakan antara individu yang berkelamin jantan dan betina. Perkembangbiakan *Artemia salina* Leach dilakukan secara generatif dan dihasilkan kista yang berbentuk butir-butir halus. Apabila kista tersebut direndam ke dalam air laut dengan salinitas 30-35 pupuk maka akan terjadi hidrasi. Setelah 24 jam, membran luar akan pecah dan kista menetas menjadi embrio. Beberapa jam kemudian embrio berkembang menjadi nauplius 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, 2001).

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, 2001).

dewasa setelah berumur 14 hari dan siap untuk berkembang biak (Mudjiman, 2001).



Gambar 2. Siklus hidup *Artemia Salina* Leach

e. Penetasan telur artemia

Untuk menetasakan telur artemia, kita memerlukan wadah yang bening. Telur dapat ditetaskan dalam air laut biasa (kadar garam kurang 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 ditetaskan. Jumlah kepadatan telur antara 5-7 g/l (Mudjiman, 2001).

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 Kusniastuti, 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 thorakopoda (Mudjiman, 2001).

f. Penggunaan *Artemia salina* Leach

Meyer *et al.* (1982) melaporkan suatu metode uji hayati yang tepat dan murah untuk skrining 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 dkk, 1990).

7. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan yang dikembangkan oleh Egon Stahl. Pada kromatografi ini fase diam dihamparkan pada kaca, logam, atau plastik dan disebut sebagai lempeng KLT. Pemisahan yang terjadi pada kromatografi ini karena adanya aliran dari fase gerak yang mengalir secara kapiler pada lempeng KLT (Stahl, 1985).

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi adsorpsi dan adsorben bertindak sebagai fase diam. Empat macam adsorben yang digunakan ialah silika gel (asam silika), alumina (aluminium oksida), *kieselguhr* (*diatomaceous earth*), dan selulosa (Stahl, 1985).

Bahan yang diperlukan dalam kromatografi lapis tipis sebagai berikut.

a. Fase diam

Berupa lapisan tipis, ukuran 20 x 20 cm. Untuk analisis tebalnya 0,1-0,3 mm, biasanya 0,2 mm yang terdiri dari bahan padat atau serbuk halus yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat dari pelat polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat biasanya kalium sulfat atau amilum (Stahl, 1985).

b. Fase gerak

Pada fase gerak sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin. Salah satu alasan daripada penggunaan itu ialah mengurangi serapan dari setiap komponen dari campuran pelarut. Jika komponen-komponen yang mempunyai sifat polar yang tinggi (terutama air) dalam campuran cukup akan merubah sistem menjadi sistem partisi. Campuran yang baik memberikan fasa-fasa bergerak yang mempunyai kekuatan bergerak sedang, tetapi sebaiknya dicegah sejauh mungkin mencampur lebih dari dua komponen, terutama karena campuran yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan-perubahan fasa-fasa terhadap perubahan-perubahan suhu. Kemurnian dari pelarut adalah lebih penting dalam lapisan tipis daripada bentuk-bentuk kromatografi lain, karena disini digunakan sejumlah materi yang sedikit (Sastrohamidjojo, 2002).

Teknik pelaksanaan kromatografi lapis tipis terdiri dari beberapa tahap, yaitu :

- (a). Pembuatan lapisan silika,
- (b). penjenjuran bejana pengembangan,
- (c). penotolan,
- (d). pengembangan,
- (e). jarak pengembangan, dan
- (f). cara penampakan bercak (Stahl, 1985).

Sampel yang akan dipisahkan ditotolkan sebagai bercak tunggal atau berupa pita. Lempeng yang telah ditotoli sampel kemudian dikembangkan dalam bejana pengembang yang terlebih dahulu dijenuhi dengan fase gerak yang digunakan. Selama pengembangan bejana harus tertutup rapat, setelah fase gerak mencapai batas tertentu kemudian lempeng diambil dan sisa fase gerak diuapkan (Stahl, 1985).

Penampakan bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan melihat langsung pada lempeng KLT, dengan melihat di bawah penyinaran sinar UV, atau dengan cara menyemprotkan pereaksi kimia tertentu. Letak bercak pada KLT dinyatakan dengan harga R_f atau hR_f (Stahl, 1985).

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

$$hR_f = 100 \times R_f$$

Angka R_f berkisar antara 0,00-1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. hR_f adalah angka R_f dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berkisar antara 0-100 hasilnya merupakan bilangan utuh antara 1-99 (Stahl, 1985).

Harga R_f ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu :

- 1) Pelarut. Disebabkan pentingnya koefisien partisi, maka perubahan-perubahan yang sangat kecil dalam komposisi pelarut dapat menyebabkan perubahan-perubahan harga R_f ,
- 2) suhu. Perubahan dalam suhu merubah koefisien partisi dan juga kecepatan aliran,
- 3) ukuran dari bejana. Volume dari bejana mempengaruhi homogenitas dari atmosfer jadi mempengaruhi kecepatan penguapan dari komponen-komponen pelarut dari kertas,
- 4) kertas. Pengeruh utama kertas pada harga-harga R_f timbul dari perubahan ion dan serapan, yang berbeda untuk macam-macam kertas. Kertas-kertas mempengaruhi kecepatan aliran, dan akan juga mempengaruhi kecepatan partisi,
- 5) sifat dari campuran. Berbagai senyawa mengalami partisi diantara volume-volume yang sama dari fase tetap dan bergerak. Mereka hampir selalu

8. Kanker

Kanker adalah suatu penyakit 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 homeostatis 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 metastatis. Setelah terjadi metastatis, pendekatan sistemik melalui kemoterapi untuk penanggulangan kanker, disamping pembedahan dan radiasi (Anonim, 2002).

a. Obat anti kanker

Obat anti kanker atau sitostatika adalah obat yang dapat menghentikan pertumbuhan sel-sel kanker. Obat ini diharapkan memiliki toksisitas 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 (sitostatika), 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 proliferasi 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 esensial (Nafrialdi dan Gan, 1995).

b. Uji aktivitas anti kanker

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

pengendalian kondisi yang ketat. Selain itu juga memerlukan biaya yang besar dan waktu yang cukup lama (Dwiatmaka, 2000).

Berbagai metode pengujian untuk mengetahui aktifitas anti kanker suatu senyawa dari bahan alam telah dilakukan. Uji aktifitas anti kanker didasarkan atau adanya efek toksik pada sel (sitotoksisitas). Uji sitotoksisitas ini umumnya dilakukan setelah terlebih dahulu dilakukan uji toksisitas, apabila telah terbukti dengan mengamati kematian hewan percobaan dan respon kematian ini dianggap pengaruh senyawa yang diuji (Cassaret dan Doull, 1975).

Untuk senyawa baru, kriteria awal yang biasa digunakan adalah dengan mempergunakan kematian sebagai indeks untuk memperbaiki dosis letal yang mungkin terjadi pada manusia. Respon apapun yang dipilih sebagai ukuran hubungan antara respon dan sistem biologi dan jumlah zat toksik yang diberikan ditunjukkan sebagai hubungan dosis-respon. Bila kematian merupakan responnya maka dosis yang menimbulkan kematian pada 50% populasi spesifik dan kondisi yang sama disebut sebagai "*median lethal dose*" atau LD_{50} , bila pemberian obat dinyatakan dalam konsentrasi maka diistilahkan sebagai *median lethal concentration* (LC_{50}). Secara kuantitatif harga LD_{50} dapat digunakan untuk menentukan kategori toksisitas akutnya (Loomis, 1978).

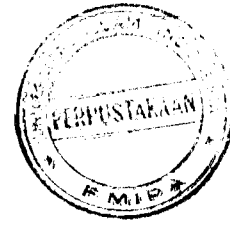
B. Keterangan Empiris

Penelitian ini bersifat eksploratif untuk melihat sifat toksik dari fraksi daun johar (*Cassia siamea* L.) dalam membunuh *Artemia salina* Leach dan memeriksa kandungan senyawa kimia fraksi paling aktif.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat



1. Bahan

a. Bahan utama

Daun johar yang berasal dari Desa Purwosari, Kecamatan Sinduadi, Kabupaten Sleman, Propinsi D.I. 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 Eggs*, Ocean Star Indonesia Inc).

d. Bahan untuk KLT.

- 1) Bahan untuk fase diam : silika gel GF₂₅₄
- 2) Bahan untuk fase gerak : metanol, amoniak, kloroform
- 3) Bahan untuk pereaksi semprot : Dragendorff, anisaldehyd-asam sulfat.

2. Alat

a. Peralatan untuk ekstraksi

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak daun *Cassia siamea* 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

B. Cara penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun johar bertempat di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

2. Penyiapan bahan utama

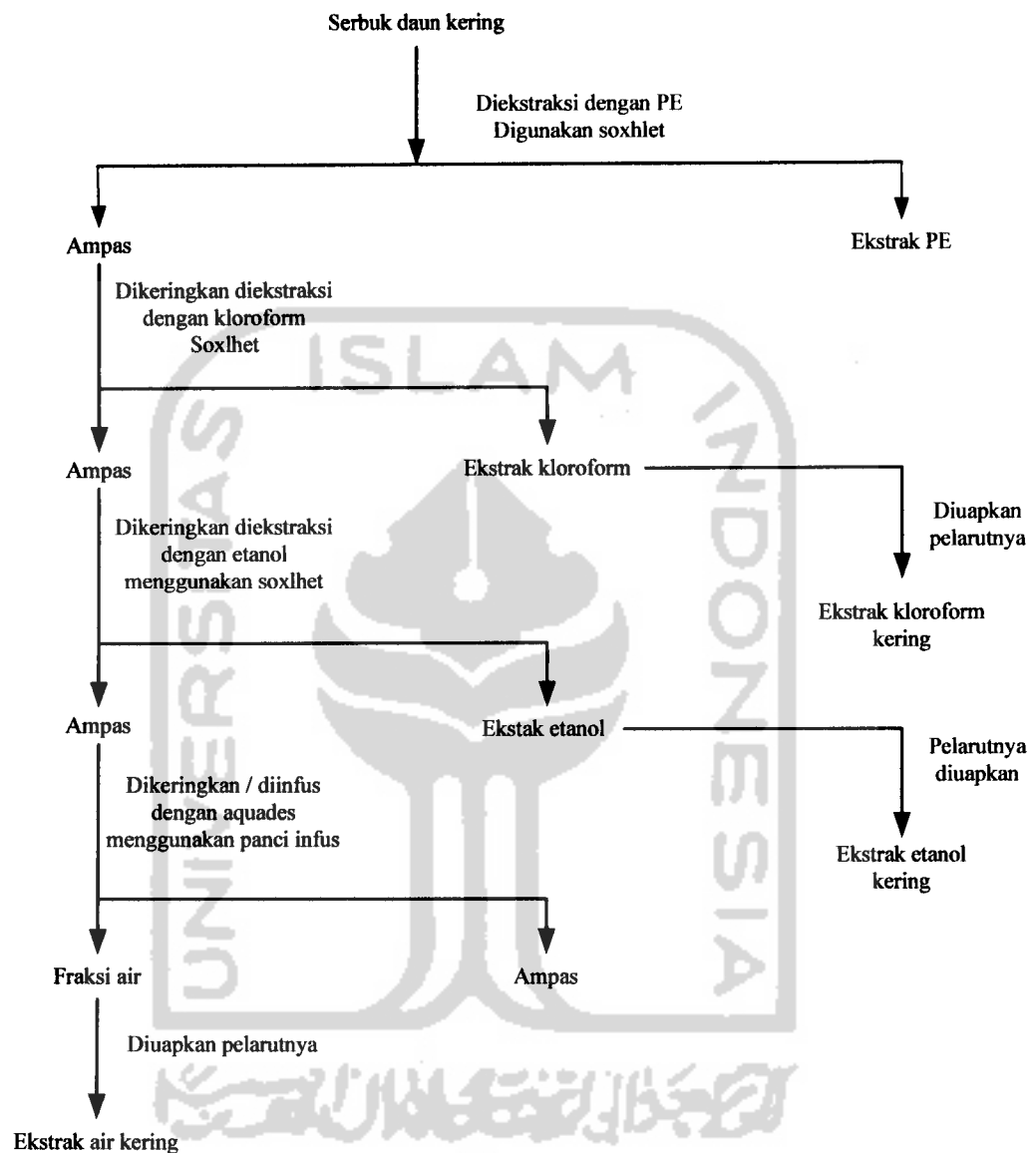
Daun johar diambil dari tanaman johar. Dibersihkan dari kotoran yang ada. Dicuci dan dikeringkan hingga diperoleh daun johar yang kering. Pembuatan serbuk dilakukan dengan alat penyerbuk, yaitu blender, kemudian serbuk diayak.

3. Ekstraksi daun johar

Sejumlah 50 g serbuk daun johar 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 penyarian dengan alat Soxhlet 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 $\mu\text{g/ml}$. Sejumlah tertentu larutan sampel petroleum eter, kloroform, etanol, aquades, sesuai tabel ditetaskan 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 $\mu\text{g/ml}$ (ditambahkan air laut sampai dengan 5 ml)

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	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 menetasakan 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.

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 daun johar dapat dilihat pada gambar 4.

e. Cara analisis data

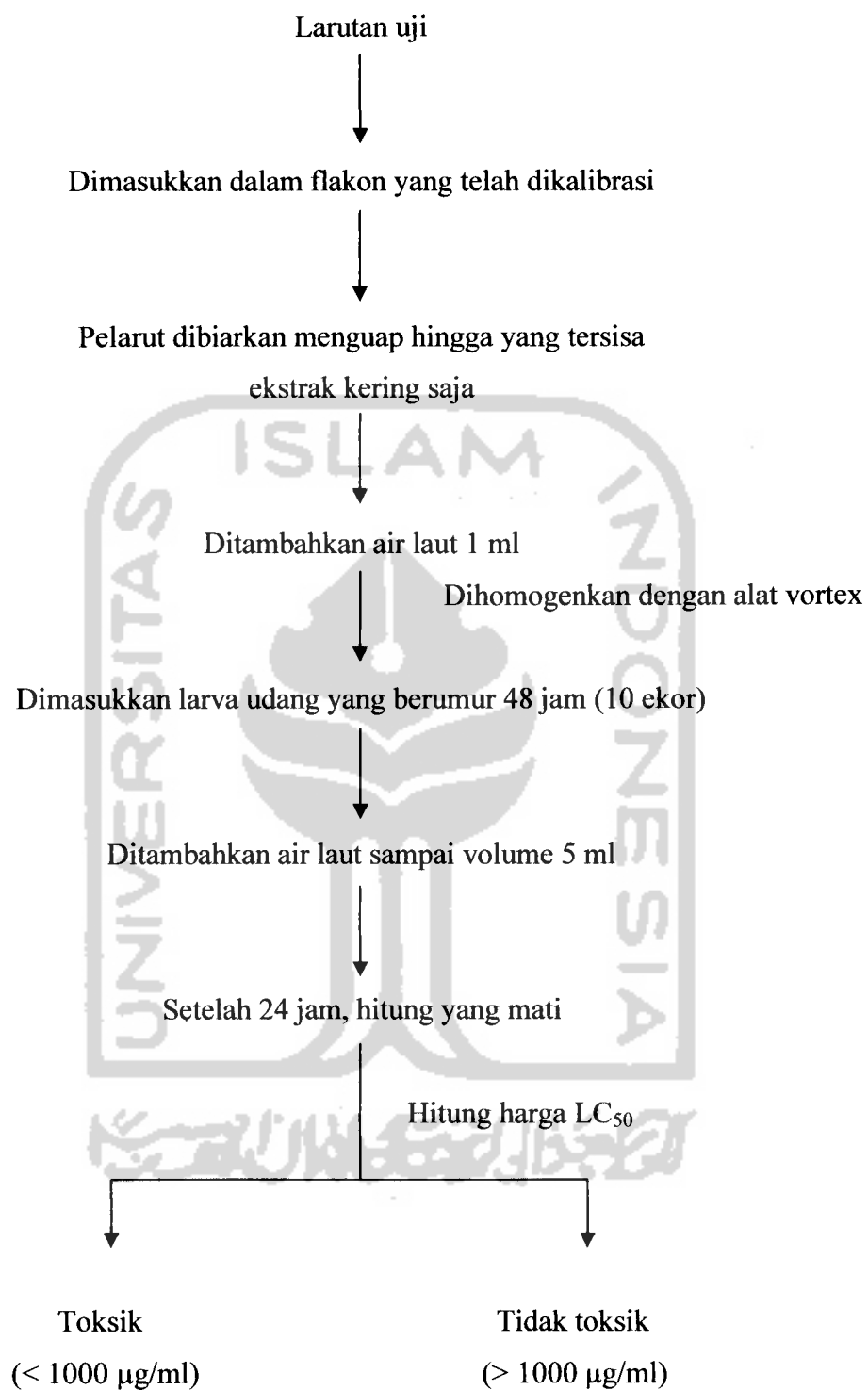
Data yang diperoleh dianalisis dengan metode analisis probit sehingga dapat diketahui harga LC_{50} . Sebagai absis adalah skala logaritma dari dosis dan sebagai ordinat adalah skala probit. Adapun rumus untuk mencari persentase kematian pada hewan uji adalah :

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

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 dianalisis dengan menggunakan analisis regresi probit (SPSS 11.5) yang akan menghasilkan data persamaan regresi linier, probit dan harga LC_{50} sekaligus.



Gambar 4. Skema uji toksisitas akut dengan metode BST

f. Profil kromatografi lapis tipis

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

1) Uji senyawa alkaloid

Fase diam : Silika Gel GF₂₅₄
 Fase gerak : Metanol - amoniak (10 : 0,15), v/v
 Pereaksi : Dragendorff
 Pembanding : Piperina

2) Uji senyawa triterpen dan steroid

Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : Metanol - kloroform (1 : 10), v/v
 Pereaksi : Anisaldehyd-asam sulfat
 Pembanding : Timol

C. Analisis Hasil

1. Determinasi

Determinasi tanaman johar (*Cassia siamea* 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 DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Sebelum dilakukan uji atau analisis terhadap suatu tanaman, perlu dilakukan determinasi terhadap tanaman tersebut. Maksud determinasi dari suatu tanaman adalah untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman tersebut. Dengan demikian kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti dapat dihindari.

Determinasi dilakukan dengan menggunakan acuan “Flora of Java” karangan Backer and Bakhuizen van der Brink (1965). Determinasi dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman dengan kunci determinasi sehingga dipastikan tanaman yang digunakan benar-benar daun dari tanaman johar (*Cassia siamea* Lamk)

Hasil determinasi tanaman *Cassia siamea* Lamk adalah :

1b, 2b, 3b, 4b, 6b, 7b, 9b, 10b, 11b, 12b, 13b, 14a, 15b, 197b, 208b, 219b, 220b, 224b, 225b, 227b, 229b, 230b, 230a, 231a, 232b, 233b. Caesalpiniaceae

1b, 5b, 7a. *Cassia*

1b, 4b, 5a. *Cassia siamea* Lamk (Backer & Bakhuizen van den Brink, 1965).

Hal tersebut menunjukkan bahwa daun yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar daun dari tanaman johar (*Cassia siamea* Lamk).

B. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Serbuk

Bahan penelitian dikumpulkan dari tempat dan waktu tertentu untuk menghindari variasi kandungan kimia tanaman yang terlalu besar bila bahan dikumpulkan dari daerah yang berbeda, karena perbedaan kondisi iklim dan lingkungan. Bahan yang telah dikumpulkan terlebih dahulu dipisahkan dari tumbuhan lain yang mungkin terikut sehingga diperoleh bahan baku yang benar dan murni. Daun johar diperoleh dari Desa Purwosari, Kecamatan Sinduadi, Kabupaten Sleman, Propinsi D.I. Yogyakarta pada pukul 09.00, bulan September, tahun 2005.

Langkah selanjutnya, pencucian menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 40⁰ C.

Pengeringan bahan bertujuan untuk mencegah timbulnya bakteri, jamur dan bekerjanya enzim yang dapat menyebabkan perubahan komponen kimia simplisia juga agar dapat dikemas dan disimpan dalam waktu yang lama sehingga kualitas bahan dapat terjamin. Setelah kering, daun tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender kering. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut sehingga ekstraksi akan lebih efektif.

C. Penyarian Bahan

Penyarian dalam penelitian ini menggunakan metode sokhletasi dengan penyarian bertingkat menggunakan pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda-beda, berturut-turut dari yang non polar sampai dengan yang paling polar. Digunakan metode sokhletasi karena memiliki beberapa keuntungan antara lain hasil yang didapat lebih banyak dan cairan penyari yang diperlukan relatif lebih sedikit dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya. Dari segi waktu ekstraksi dengan metode sokhletasi membutuhkan waktu yang relatif lebih cepat dibanding dengan metode ekstraksi yang lainnya khususnya dibanding dengan metode maserasi dan perkolasi.

Pelarut yang pertama kali digunakan adalah petroleum eter yang bersifat non polar, bertujuan untuk menghilangkan senyawa-senyawa dengan polaritas rendah seperti lemak dan lilin yang akan mengganggu proses selanjutnya. Setelah menggunakan pelarut petroleum eter maka dilanjutkan dengan menggunakan pelarut kloroform. Kloroform merupakan pelarut yang relatif non polar tetapi lebih polar dibandingkan dengan petroleum eter. Sehingga zat-zat yang terlarut di dalamnya juga merupakan zat-zat yang relatif non polar. Tujuan dari penyarian menggunakan kloroform adalah agar zat-zat yang bersifat non polar - semi polar dapat terekstraksi, misalnya klorofil dan aglikon. Setelah menggunakan kloroform maka dilanjutkan penyarian dengan menggunakan penyari etanol yang bersifat polar. Etanol merupakan pelarut yang baik untuk senyawa hidrofilik dan lipofilik.

Penyari yang terakhir digunakan adalah aquades dimana diketahui bahwa aquades memiliki tingkat kepolaran yang paling besar di antara pelarut-pelarut yang digunakan.

Pada proses sokhletasi menggunakan ± 50 g serbuk daun johar. Penyarian pertama menggunakan petroleum eter, hasil sokhletasi kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotarietvaporator* hingga kental. Sari kental yang diperoleh dikeringkan di atas penangas air hingga tidak berbau pelarut lagi. Tujuan pengeringan ini untuk mendapatkan ekstrak kering yang tidak mudah rusak dalam penyimpanan. Hasil yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam lemari es untuk menghindari kerusakan ekstrak. Ampas hasil ekstraksi petroleum eter dikeringkan dengan jalan diangin-anginkan sampai serbuk tidak berbau pelarut lagi.

Penyarian kedua digunakan kloroform untuk menarik senyawa non polar yang tidak dapat ditarik oleh petroleum eter. Langkah-langkah yang dilakukan sama seperti pada cara penyarian yang dilakukan dengan menggunakan petroleum eter. Setelah penyarian dengan kloroform selesai maka dilanjutkan dengan penyarian ketiga menggunakan etanol untuk menarik senyawa polar yang tidak dapat ditarik oleh petroleum eter maupun kloroform. Ampas hasil ekstraksi etanol kemudian diinfundasi dengan cara dipanaskan selama 15 menit dalam aquades yang bersuhu 90°C . Kemudian disaring dan dipekatkan diatas penangas air, baru disimpan dalam lemari es. Tujuan dari infundasi dengan aquades yaitu untuk mengekstraksi senyawa-senyawa polar yang mungkin tertinggal pada waktu ekstraksi dengan etanol.

Dari hasil ekstraksi ± 50 g serbuk daun johar diperoleh ekstrak dari masing-masing pelarut, yaitu fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi etanol dan fraksi aquades diperoleh bobot kering berturut-turut 17,70, 21,60, 11,60, 39,76 g. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen dari masing-masing fraksi dengan rumus :

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

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

Tabel III. Berat total masing-masing fraksi dari 50 gram serbuk

Nama Fraksi	Berat fraksi kering (gram)	Rendemen (%)
Petroleum eter	17,70	35,4
Kloroform	21,60	43,2
Etanol	11,60	23,2
Aquades	39,76	79,5

D. Penetasan *Artemia salina* Leach

Langkah awal yang dilakukan dalam uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* adalah menetasakan telur *Artemia salina* Leach. *Artemia* biasanya dijualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista berkualitas baik akan menetas sekitar 18 – 24 jam. Apabila di inkubasi dalam lingkungan air bersalinitas 5-70 permil (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Sebelum ditetaskan, telur artemia direndam dalam aquades $\pm$ 1 jam untuk menghilangkan pengawet yang mungkin ada, kemungkinan telur yang mengapung dibawah dan yang mengendap (tenggelam) dimasukkan dalam tempat penetasan. Untuk mempercepat pemisahan cangkang telur dan napliusnya dapat memanfaatkan sifat artemia yang dipengaruhi cahaya (fototropi). Oleh karena itu, wadah penetasannya terdiri dari dua kompartemen, yaitu kompartemen gelap dan kompartemen terang. Kompartemen terang dibuat dengan diberi cahaya lampu 15 watt. Sedangkan untuk kompartemen gelap dibuat dengan menutup bagian atas wadah dengan kain yang berwarna hitam, dengan maksud agar tidak ada cahaya yang masuk. Kista yang telah diseleksi lalu dimasukkan ke dalam kompartemen gelap. Setelah 24 jam kista akan menetas dan menjadi naplius. Naplius terseleksi akan memisah dari cangkang dan bergerak dari kompartemen gelap menuju ke kompartemen terang melalui celah yang telah dibuat pada sekat yang memisahkan kompartemen terang dan gelap. Untuk artemia yang tidak cukup kuat dan tidak aktif, tidak akan dapat menuju ke kompartemen yang terang. Naplius yang dapat menuju kompartemen terang inilah yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam uji BST.

Untuk hidup, artemia membutuhkan suhu berkisar 25-30 °C, sehingga penelitian dilakukan pada suhu kamar, dan untuk memenuhi kebutuhan oksigen terlarut sekitar 3 mg/ml, maka 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, 2001).

Naplius yang digunakan dalam uji sitotoksik dengan metode BST yaitu naplius yang berumur dua hari. Untuk mendapatkan naplius yang berumur seragam, maka setelah 24 jam naplius yang telah berada di kompartemen terang dipindahkan ke tempat yang baru, dan baru dapat digunakan setelah berumur dua hari. Pemindahan dilakukan untuk menjaga kemungkinan adanya naplius yang menetas lebih dari 24 jam dan menuju ke kompartemen terang, hal ini dapat menyebabkan ketidakseragaman umur naplius yang nantinya digunakan dalam uji BST, atau dengan kata lain bila tidak dipindahkan ada kemungkinan naplius yang digunakan berumur kurang dari 48 jam. Bila umur larva tidak sama maka kepekaan dalam kualitasnya juga berbeda sehingga hasil yang diperoleh tidak *reliable*.

E. Uji Toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)

Uji toksisitas yang dipilih pada penelitian ini adalah metode *Brine Shrimp Lethality* (BST). Metode BST ini dipilih karena relatif praktis, cepat, mudah, tidak memerlukan kondisi steril dan keahlian khusus, murah, sederhana dengan tidak mengesampingkan keakuratannya. Walaupun tidak spesifik untuk antitumor atau antikanker, namun beberapa penelitian terdahulu menunjukkan korelasi yang signifikan terhadap bahan-bahan yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker, ekstrak-ekstrak yang aktif terhadap biakan sel kanker juga terdeteksi dengan artemia (Meyer *et al.*, 1982).

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 fraksi petroleum eter dilarutkan dalam

petroleum eter, fraksi kloroform dilarutkan dalam kloroform, fraksi etanol dilarutkan dalam etanol, dan fraksi aquades dilarutkan dalam aquades.

Dari larutan stok tersebut kemudian diambil dengan mikropipet sebanyak 1000, 500, 100, 50, 10 μ l, dan dimasukkan ke dalam flakon yang telah ditara 5,0 ml. Selanjutnya, diuapkan hingga sampel tidak berbau pelarut lagi, hal ini dilakukan untuk menghilangkan efek yang tidak diinginkan yang disebabkan oleh pelarut. Untuk flakon yang berisi fraksi petroleum eter dan fraksi kloroform perlu ditambahkan 1 tetes dimetilsulfoksida (DMSO) yang bertujuan untuk meningkatkan kelarutannya, karena fraksi petroleum eter dan fraksi kloroform tidak dapat larut langsung dalam air laut. Selanjutnya di vortex untuk menghomogenkan, sehingga sampel uji dapat terdistribusi merata dalam air laut, selain itu membantu pelarutan fraksi di dalam air laut.

Kemudian masing-masing flakon ditambahkan air laut ± 1 ml, lalu di vortex untuk menghomogenkan fraksi sehingga dapat membantu pelarutan fraksi didalam air laut. Sepuluh ekor larva kemudian dimasukkan dalam flakon yang telah berisi sampel, baru kemudian ditambahkan air laut hingga volume 5 ml. Setelah penambahan air laut hingga volume 5 ml, akan diperoleh konsentrasi akhir sampel yaitu 1000, 500, 100, 50, 10 μ g/ml.

Untuk mengoreksi adanya kemungkinan efek yang timbul karena disebabkan oleh pelarut dan faktor lain misalnya faktor lingkungan tempat uji berlangsung yang tidak mendukung sehingga dapat mempengaruhi hasil uji, maka dibuat kontrol negatif. Kontrol negatif disiapkan sama seperti pada pembuatan sampel uji namun yang dimasukkan ke dalam flakon hanya pelarut saja tanpa fraksi uji sesuai konsentrasi yang ditetapkan.

Flakon kemudian diletakan di bawah penerangan, setelah 24 jam dihitung jumlah larva *Artemia* yang hidup, kemudian persentase kematian pada tiap konsentrasi dan kontrol ditentukan. Apabila terjadi kematian pada kontrol maka persentase kematian dihitung dengan menggunakan data koreksi (menggunakan rumus Abbot).

Uji toksisitas dilakukan tiga kali replikasi, tiap replikasi menggunakan peringkat konsentrasi 1000, 500, 100, 50, dan 10 μ g/ml. Masing-masing konsentrasi terdiri dari enam flakon. Hasil uji aktifitas dengan menggunakan *BST*

terhadap fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi etanol dan fraksi aquades beserta kontrol pelarut masing-masing seri kadar dapat dilihat pada tabel berikut.

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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	8,7,5,5,4,8	3,7,7,4,5,4	6,7,7,8,7,9	0,0,0,1,0,0
500	5,6,7,4,7,8	7,7,6,7,7,8	5,6,6,7,7,8	1,0,1,2,1,0
100	2,3,3,1,3,4	3,4,7,2,4,3	4,2,2,3,3,4	0,1,0,0,2,0
50	0,3,1,0,0,2	0,2,0,1,1,2	2,1,1,2,1,0	1,1,0,2,0,0
10	0,1,0,2,2,0	0,1,0,2,2,1	0,3,1,0,2,1	0,1,0,0,0,1

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

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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	9,9,8,7,9,9	9,8,9,9,9,9	9,8,10,8,8,9	1,0,0,2,1,0
500	7,8,7,8,5,9	6,7,6,8,6,7	7,6,8,7,8,6	1,1,0,0,1,0
100	4,5,5,7,4,5	7,5,7,7,4,3	6,6,5,4,5,6	0,0,0,1,0,0
50	4,5,4,5,5,4	5,4,3,2,3,5	4,3,3,2,3,4	0,0,0,1,1,0
10	3,4,3,2,3,5	2,2,2,4,3,2	2,3,3,2,3,3	0,1,0,0,1,0

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

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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	8,9,9,8,7,6	7,10,8,8,8,9	8,9,7,7,7,8	1,0,0,0,0,1
500	7,5,7,8,8,6	6,7,9,8,9,6	8,8,6,5,6,8	0,1,1,0,0,0
100	3,4,5,5,4,5	3,5,4,5,5,4	5,6,4,6,6,7	2,0,0,0,0,1
50	3,5,4,2,2,3	3,2,2,3,4,5	4,5,6,3,7,5	0,0,0,1,1,0
10	2,2,1,1,3,2	3,2,3,2,3,4	2,1,3,3,3,1	0,0,0,0,0,1

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

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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor			
	1	2	3	Kontrol
1000	6,7,8,8,7,6	9,7,8,7,8,9	7,7,7,8,5,7	1,0,0,0,1,0
500	7,8,5,5,6,7	5,7,6,5,4,6	7,5,7,8,8,6	0,1,0,1,0,0
100	5,6,3,5,4,4	4,5,3,4,5,6	4,5,4,7,7,5	0,0,1,0,0,1
50	3,4,3,2,2,4	5,4,3,3,4,4	3,2,3,4,4,5	0,0,0,1,0,0
10	3,3,3,2,3,4	2,1,1,3,2,4	2,2,2,3,3,4	0,0,0,0,0,0

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

Dari data yang diperoleh dapat diketahui persentase kematian larva *Artemia salina* Leach masing-masing fraksi. Untuk beberapa seri konsentrasi terdapat kematian larva pada kontrol, sehingga persentase kematian dihitung berdasarkan rumus Abbot. Persentase kematian dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel VIII. Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach pada penambahan ekstrak daun johar

Fraksi	Persentase kematian pada konsentrasi $\mu\text{g/ml}$ (%)				
	($\bar{x} \pm \text{SD}$)				
	1000	500	100	50	10
PE	60,00 $\pm$ 11,7	57,22 $\pm$ 4,19	26,67 $\pm$ 6,01	8,89 $\pm$ 0,96	8,33 $\pm$ 1,67
Kloroform	80,00 $\pm$ 1,67	65,00 $\pm$ 3,33	51,11 $\pm$ 2,55	34,44 $\pm$ 6,74	25,00 $\pm$ 4,41
Etanol	76,11 $\pm$ 3,47	67,22 $\pm$ 3,85	42,78 $\pm$ 7,70	34,44 $\pm$ 10,58	21,11 $\pm$ 5,09
Aquades	69,44 $\pm$ 6,31	58,89 $\pm$ 6,74	44,44 $\pm$ 4,81	32,78 $\pm$ 4,19	26,11 $\pm$ 4,19

Dari tabel VIII dapat diketahui persentase kematian larva *Artemia* yang terbesar yaitu pada fraksi kloroform pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 80 %, sedangkan persentase kematian terkecil dihasilkan oleh fraksi petroleum eter pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$, 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. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel IX. Persamaan garis lurus hasil uji BST terhadap ekstrak daun johar

Fraksi	Persamaan garis lurus	r
Petroleum Eter	$Y = 1,08558 X - 2,91414$	0,946
Kloroform	$Y = 0,73991 X - 1,50876$	0,999
Etanol	$Y = 0,77518 X - 1,66275$	0,998
Aquades	$Y = 0,58332 X - 1,31394$	0,999

Keterangan : X = log konsentrasi

Y = nilai probit

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

Fraksi	LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Rentang LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Petroleum Eter	483,50	178,55 – 5950,63
Kloroform	109,42	54,30 – 213,55
Etanol	139,63	107,88 – 181,76
Aquades	178,86	128,08 – 257,65

Hasil uji toksisitas fraksi daun johar terhadap *Artemia salina* Leach menunjukkan bahwa semua fraksi (fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi etanol, dan fraksi aquades) memiliki sifat toksik. Karena harga LC_{50} untuk setiap fraksi lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer *et al.*, 1982). Diantara keempat fraksi, yang menunjukkan harga LC_{50} terkecil adalah fraksi kloroform, dengan harga LC_{50} 109,42 $\mu\text{g/ml}$ (54,30 – 213,55 $\mu\text{g/ml}$). Kemudian fraksi etanol dengan harga LC_{50} 139,63 $\mu\text{g/ml}$ (107,88 – 181,76 $\mu\text{g/ml}$), lalu fraksi aquades dengan harga LC_{50} 178,86 $\mu\text{g/ml}$ (128,08 – 257,65 $\mu\text{g/ml}$), sedangkan yang menunjukkan harga LC_{50} terbesar adalah petroleum eter dengan harga LC_{50} 483,50 $\mu\text{g/ml}$ (178,55 – 5950,63 $\mu\text{g/ml}$).

Karena rentang nilai LC_{50} antara kloroform dan etanol sangat berdekatan, maka dilakukan uji statistik pada data persentase kematian larva *Artemia salina* dengan menggunakan analisis Two-Way Anova antara kedua fraksi tersebut. Hasil analisis Two-Way Anova terhadap persentase kematian larva menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kematian larva *Artemia salina* Leach antara fraksi kloroform dan etanol, dan terdapat perbedaan kematian larva antara tiap-tiap konsentrasi.

Untuk profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan fraksi kloroform dengan alasan bahwa fraksi kloroform mempunyai persentase kematian hewan uji yang lebih besar dibandingkan fraksi petroleum eter, fraksi etanol dan fraksi aquades pada kisaran kadar uji.

F. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi daun johar dianalisis secara kualitatif untuk mengetahui dan mendapatkan gambaran senyawa yang dikandung dalam fraksi daun johar tersebut. Pemeriksaan kandungan senyawa ini menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam dan fase gerak yang sesuai, sehingga memberikan bercak-bercak yang dapat dideteksi dengan sinar tampak (visible), sinar UV₂₅₄, sinar UV₃₆₆, dan pereaksi-pereaksi yang spesifik.

Pada penelitian ini uji KLT hanya dilakukan untuk fraksi yang memiliki aktivitas paling tinggi. Dari hasil uji dengan metode *BST* diperoleh fraksi kloroform sebagai fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi, sehingga identifikasi dengan KLT hanya untuk fraksi kloroform. Pada penelitian ini senyawa yang diidentifikasi adalah alkaloid, triterpen dan steroid. Hasil uji KLT dari beberapa senyawa tersebut adalah sebagai berikut.

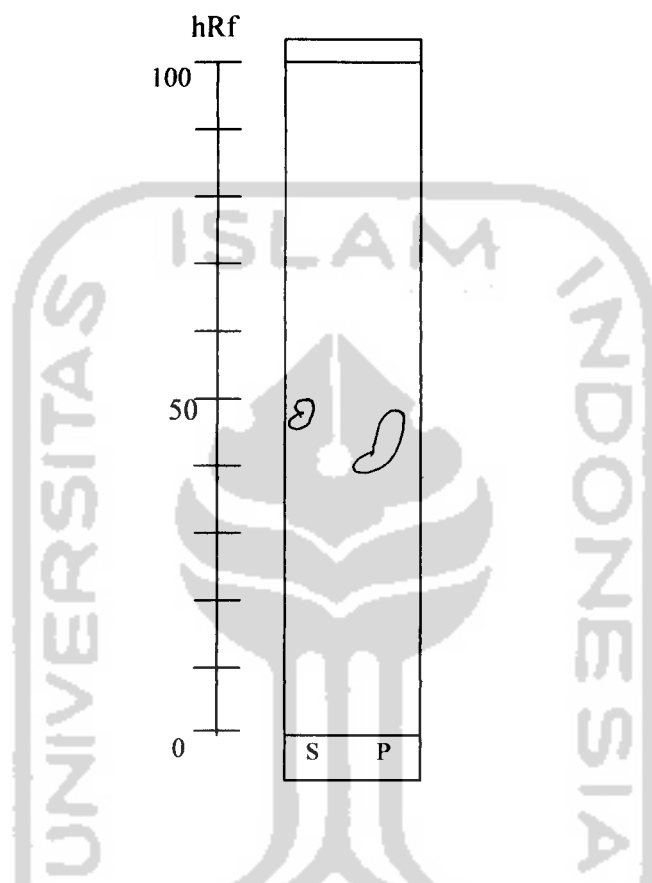
1. Alkaloid

Untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid dilakukan uji KLT menggunakan fase diam Silika Gel GF₂₅₄ dan fase gerak metanol – amonia (10 : 0,15) v/v, pembanding yang digunakan yaitu piperina.

Menurut Wagner (1984), jika alkaloid dilihat pada sinar UV₂₅₄ nm maka akan memperlihatkan bercak pepadaman dan pada UV₃₆₆ nm maka akan memperlihatkan fluoresensi biru atau kuning. Setelah disemprot dengan pereaksi spesifik Dragendorff, pada sinar tampak alkaloid akan memperlihatkan warna jingga. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan hasil yang positif untuk senyawa alkaloid. Untuk lebih jelasnya hasil uji KLT untuk identifikasi alkaloid dapat dilihat pada tabel XI.

Tabel XI. Data uji KLT senyawa alkaloid dari fraksi kloroform

Fraksi	Rf	hRf	Warna bercak	
			UV366	Dragendorff
Sampel	0,47	47	kuning kehijauan	jingga muda
Pembanding	0,44	44	kuning kehijauan	jingga



Gambar 5. Kromatogram uji senyawa alkaloid fraksi kloroform

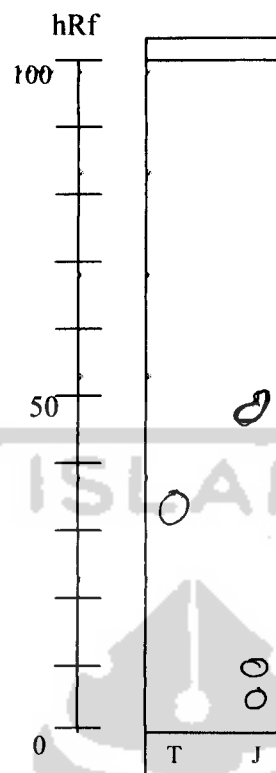
Fase diam yang digunakan adalah Silika Gel GF₂₅₄, dan fase gerak yang digunakan adalah metanol - amonia (10 : 0,15), v/v. Pereaksi yang digunakan adalah Dragendorff. S adalah fraksi kloroform daun johar dan P adalah pembanding piperina.

2. Triterpen dan steroid

Sampel yang digunakan adalah fraksi kloroform dan fase gerak yang digunakan adalah metanol-kloroform (1:10, v/v) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan penyempnot yang digunakan anisaldehyd-asam sulfat. Deteksi paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV₂₅₄ dan UV₃₆₆ nm. Jika dengan cara tersebut tidak dapat dideteksi, harus di coba dengan reaksi kimia, pertama tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dipanaskan (Stahl, 1985). Anisaldehyd-asam sulfat dapat mendeteksi senyawa fenol, terpen, gula, dan steroid. Bercak yang ditimbulkan berwarna violet, biru, merah abu atau hijau (Anonim, 1978). Dari hasil uji KLT menunjukkan hasil pada UV₃₆₆ pada sampel berwarna merah dan biru sedangkan pada pembanding tidak terlihat warna bercak. Kemudian setelah disempnot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat terdapat bercak berwarna merah violet dan kelabu pada sampel dan pada pembanding berwarna merah violet. Warna merah violet yang timbul menunjukkan indikasi adanya golongan terpenoid.

Tabel XII. Data uji KLT senyawa triterpen steroid dari fraksi kloroform

Ekstrak	Rf	hRf	Warna bercak	
			UV ₃₆₆	anisaldehyd-asam sulfat
Sampel	0,05	5	biru	kelabu
	0,08	8	merah	kelabu
	0,47	47	merah	merah violet
Pembanding	0,35	35	-	merah violet



Gambar 6. Kromatogram uji senyawa triterpen steroid fraksi kloroform

Fase diam yang digunakan adalah Silika Gel GF₂₅₄, dan fase gerak yang digunakan adalah metanol - kloroform (1 : 10), v/v. Pereaksi yang digunakan adalah anisaldehyd-asam sulfat. J adalah fraksi kloroform daun johar dan T adalah pembanding timol.

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. Toksisitas akut fraksi daun johar (*Cassia siamea* L.) terhadap *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (BST) menunjukkan bahwa fraksi PE ($LC_{50} = 483 \mu\text{g/ml}$), fraksi kloroform ($LC_{50} = 109 \mu\text{g/ml}$), fraksi etanol ($LC_{50} = 140 \mu\text{g/ml}$), dan fraksi akuades ($LC_{50} = 179 \mu\text{g/ml}$), sehingga dapat dikatakan semua fraksi tersebut memiliki sifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach. Fraksi kloroform memiliki harga LC_{50} paling rendah yaitu sebesar $109 \mu\text{g/ml}$.
2. Berdasarkan identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi kloroform daun johar (*Cassia siamea* L.) sebagai fraksi dengan LC_{50} paling rendah ditemukan kandungan senyawa alkaloid dan triterpen.

B. Saran

Dari hasil penelitian uji toksisitas akut fraksi daun johar (*Cassia siamea* Lamk) terhadap larva *Artemia salina* Leach, maka dapat disarankan sebagai berikut.

1. Perlu dilakukan penelitian tentang toksisitas akut fraksi daun johar dengan menggunakan biakan sel kanker.
2. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut untuk mengetahui senyawa mana yang bertanggung jawab terhadap toksisitas fraksi kloroform daun johar terhadap larva *Artemia salina* Leach.
3. Perlu dilakukan identifikasi KLT untuk fraksi petroleum eter, fraksi etanol, dan fraksi aquades.

DAFTAR PUSTAKA

- Anief, M., 2000, *Ilmu Meracik Obat, Teori dan Praktek*, Universitas Gajah Mada Press, Yogyakarta, hal 168 – 169
- Anonim, 1978, *Drug Reagent for Thin Layer and Paper Chromatograph*, E. Merck, Darmstadt, Germany
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal 10 – 17
- Anonim, 1989, *Materia Medika*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal 129 – 133
- Ansel, H. C., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, diterjemahkan oleh F. Ibrahim, Edisi IV, Universitas Indonesia Press, Jakarta, hal 605 – 609
- Astuti, P., 1997, Uji Efek Antagonistik Rimpang Temu Lawak (*Curcuma xanthoiza* Roxb), Daun Legundi (*Vitex trifolia* L), Daun Kayu Putih (*Eucalyptus globules* Labill), dan Daun Gandarusa (*Justica gendarussa* Burm F.) terhadap Respon Histaminik Trakea Marmut in Vitro, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada Yogyakarta
- Cassarett, L. J., and Doull. J., 1975, *Toxicology The Basic Science of Poism* Macmillan Publishing 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 /](http://www.swgc.mun.ca/biology/env1000/jchaulk/) (diakses 31 januari 2006)
- 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., Sinardi, F., (Eds), *KANKER*, Penerbit Sanata Dharma
- Dzulkarnain, B., 1998, *Tanaman Antimalaria*, <http://www.indomedia.com/intisari/1998/September/antimal/htm> (diakses Februari 2005)
- Harefa, F., 2003, *Pembudidayaan Artemia untuk Pakan Udang dan Ikan*, Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta, hal 14 - 25

- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soedira, Penerbit ITB Bandung, hal 4 – 6
- Herba, 2003, *Panduan Pengembangan Tanaman Obat*, <http://www.karyasari.com/> (diakses Februari 2005)
- Isnansetyo, A., dan Kusniatuty, 1995, *Teknik 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., Sinardi, F., (Eds), *KANKER*, Penerbit Sanata Dharma
- Loomis, T. A., 1978, *Toksikologi Dasar*, diterjemahkan oleh Imono, A. D., Edisi III, IKIP Semarang Press, Semarang
- Mangan, Y., 2003, *Cara Bijak Menaklukkan Kanker*, <http://www.karyasari.com/> (diakses Februari 2005)
- Meyer, B. M., Ferrigni, M. R., Putnam, J. E., Jacobson, L. B., and Nichols D. E., 1982, A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*, Volume 45; hal 31 – 34
- Mudjiman, 2001, *Makanan Ikan*, PT. Penebar Swadaya, Yogyakarta
- Nafrialdi, dan Gan, S., 1995, *Antikanker dalam Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal 686 – 701
- Nuratmi, B., Sundari, D., Winarno, W., 2000, Penelitian aktivitas biologi infus benalu the (*Scurulla citropurpurea* Bl. Danser) terhadap aktivitas sistem imun mencit, *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*, no 127, Jakarta, 11-12
- Rizvi, M. A., 1998, *Medical Flowers of Pakistan*, Part III, Horticultural Society of Pakistan, Karachi, hal 48 – 52
- Rupprech, J. K., Hu. Y. H., Laugghlin J. L., 1990, Annonaceous Acetogenin : Areview, *Journal of Natural Product*, 55, 237 – 347
- Sastrohamidjojo, H., 2002, *Kromatografi*, Laboratorium Analisis Kimia Fisika Pusat, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Stahl, E., 1985, *Analisa Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soedira, Penerbit ITB, Bandung
- Van Steenis, C. G. G. J., 1975, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, Pradnya Paramita, Jakarta, 31 – 69, 208 – 216

Voight, R., 1984, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, hal 570 – 571

Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E. M., 1984, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Translated by Th. A. Scott, Penerbit Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg-Tokyo



Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JURUSAN FARMASI FMIPA UII
BAGIAN BIOLOGI FARMASI

Alamat : Jl.Kaliurang Km 14,4 Yogyakarta
Telpon : (0274) 895920 Ext. 2333

SURAT KETERANGAN
Nomor:25/ UII/Jur Far/ det/VIII/2005

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

Nama : Hesty Aprianti
NIM : 01613007
Pada Tanggal : 25 Agustus 2005

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

Tanaman tersebut: *Cassia siamea*, L (johar)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 25 Agustus 2005
Bagian Biologi Farmasi
Kepala

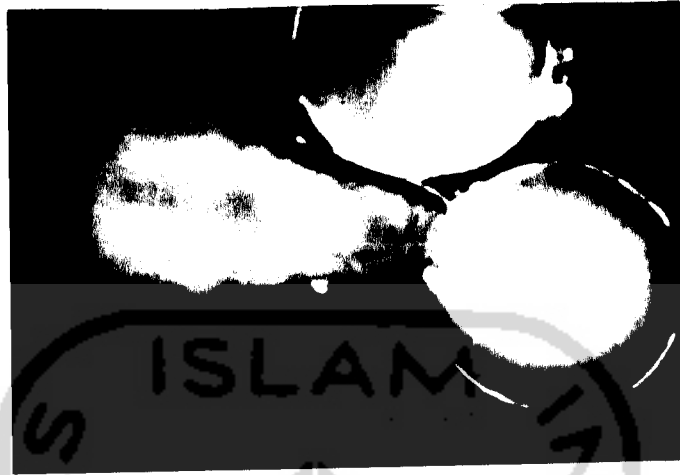



Asih Triastuti, S.F., Apt
NIP. 03.469/MP

Lampiran 2. Foto tanaman

Foto *Cassia siamea* Lamk (www.biofloraorganics.com)

Lampiran 3. Foto telur dan nauplius *Artemia salina* Leach



Telur *Artemia salina* Leach (www.swgc.mun.ca/biology/env)



Nauplius *Artemia salina* Leach (www.swgc.mun.ca/biology/env)

Lampiran 4. Foto alat-alat yang digunakan dalam uji toksisitas dengan metode *BST*



Keterangan :

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

Lampiran 5. Foto kromatogram uji senyawa alkaloid dari fraksi kloroform, dideteksi di bawah UV₃₆₆



Fase diam : Siliika Gel GF₂₅₄

Fase gerak : metanol - amonia (10 : 0,15), v/v

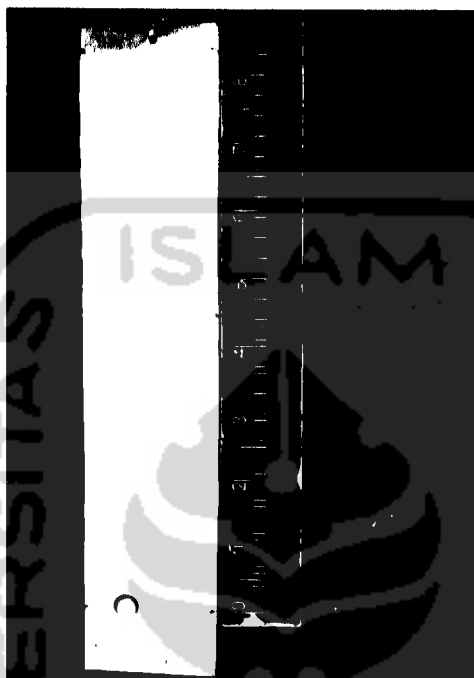
Deteksi : UV₃₆₆

Keterangan gambar :

S : Fraksi kloroform daun johar

P : Pembanding piperina

Lampiran 6. Foto kromatogram uji senyawa alkaloid dari fraksi klororform setelah disemprot dengan pereaksi semprot Dragendorff



Fase diam : Silika Gel GF₂₅₄

Fase gerak : metanol - amonia (10 : 0,15), v/v

Deteksi : Visibel, Pereaksi semprot Dragendorff

Keterangan gambar :

S : Fraksi kloroform daun johar

P : Pembanding piperina

Lampiran 7. Foto kromatogram uji senyawa terpen fraksi kloroform dideteksi di bawah UV₃₆₆



Fase diam : Siliika Gel GF₂₅₄

Fase gerak : metanol - kloroform (1 : 10), v/v

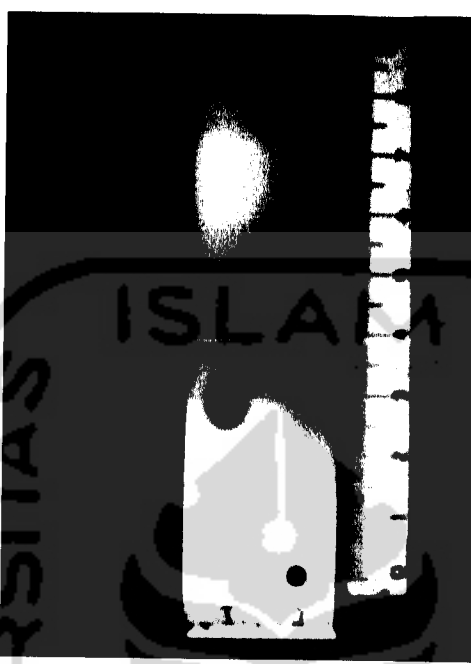
Deteksi : UV₃₆₆

Keterangan gambar :

J : Fraksi kloroform daun johar

T : Pembanding timol

Lampiran 8. Foto kromatogram uji senyawa terpen fraksi kloroform setelah disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat



Fase diam : Silika Gel GF₂₅₄

Fase gerak : Metanol - kloroform (1 : 10), v/v

Deteksi : Visibel, Pereaksi semprot Anisaldehyd-asam sulfat

Keterangan gambar :

J : Fraksi kloroform daun johar

T : Timol

Lampiran 9. Persentase kematian larva *Artemia salina* Leach

Fraksi		Persentase kematian pada konsentrasi $\mu\text{g/ml}$ (%)				
		1000	500	100	50	10
Petroleum eter	Rep 1	60,00	53,33	21,67	8,33	6,67
	Rep 2	48,33	61,67	33,33	8,33	8,33
	Rep 3	71,67	56,67	25,00	10,00	10,00
Kloroform	Rep 1	78,33	68,33	48,33	41,67	30,00
	Rep 2	81,67	61,67	53,33	33,33	21,67
	Rep 3	80,00	65,00	51,11	34,44	25,00
Etanol	Rep 1	75,00	65,00	38,33	28,33	16,67
	Rep 2	80,00	71,67	38,33	28,33	26,67
	Rep 3	73,33	65,00	51,67	46,67	20,00
Akuades	Rep 1	66,67	60,00	41,67	28,33	30,00
	Rep 2	76,67	51,67	41,67	36,67	21,67
	Rep 3	65,00	65,00	50,00	33,33	26,67

Lampiran 10. Hasil Analisis Probit Fraksi Petroleum Eter

PROBIT ANALYSIS

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.

PROBIT ANALYSIS

Parameter estimates converged after 11 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	1,08558	,07796	13,92478
Intercept			
	-2,91414	,18735	-15,55422

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 27,269 DF = 3 P = ,000

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

PROBIT ANALYSIS

Observed and Expected Frequencies

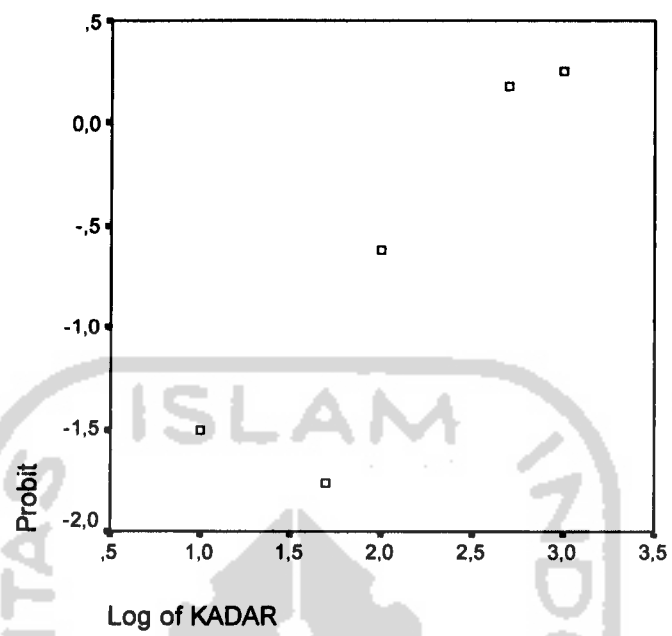
KADAR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	108,0	114,129	-6,129	,63405
2,70	180,0	103,0	91,136	11,864	,50631
2,00	180,0	48,0	41,175	6,825	,22875
1,70	180,0	7,0	25,625	-18,625	,14236
1,00	180,0	12,0	6,072	5,928	,03373

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	3,47897	,00033	21,95579
,02	6,20240	,00209	31,76499
,03	8,95118	,00665	40,34590
,04	11,79589	,01585	48,46122
,05	14,76455	,03200	56,40785
,06	17,87305	,05808	64,34631
,07	21,13269	,09771	72,38223
,08	24,55269	,15536	80,59570
,09	28,14137	,23638	89,05452
,10	31,90667	,34713	97,82112
,15	53,66313	1,65560	148,52231
,20	81,12044	5,42924	218,45465
,25	115,63415	14,03688	325,90225
,30	158,98025	30,17898	509,48392
,35	213,53003	55,44316	852,79912
,40	282,50642	89,39090	1535,79248
,45	370,38046	130,64058	2947,39893
,50	483,50727	178,54356	5950,62906
,55	631,18685	233,79901	12538,75652
,60	827,51847	298,41776	27552,66832
,65	1094,83090	375,82892	63522,73992
,70	1470,49255	471,50419	155701,75655
,75	2021,71487	594,51854	415040,93799
,80	2881,87881	761,25667	1250209,02415
,85	4356,42269	1005,38841	4565984,91321
,90	7326,97138	1412,07028	23541176,3954
,91	8307,31553	1530,86369	35028343,8739
,92	9521,53332	1670,51160	53965185,5121
,93	11062,44814	1837,90497	86837468,3151
,94	13079,98626	2043,64303	147800935,286
,95	15833,82840	2305,10003	271251234,889
,96	19818,69999	2653,33574	553993004,150
,97	26117,14971	3151,32936	1334101631,32
,98	37691,74900	3955,48447	4297036073,59
,99	67197,81257	5645,09726	27221335939,6

Probit Transformed Responses



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	,979(a)	,959	,946	,186276

a Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,443	1	2,443	70,418	,004(a)
	Residual	,104	3	,035		
	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)	1,120	,141		7,916	,004
	PROBIT	3,112	,371	,979	8,392	,004

a Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 11. Hasil Analisis Probit Fraksi Kloroform

PROBIT ANALYSIS
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.

PROBIT ANALYSIS
Parameter estimates converged after 9 iterations.
Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	,73991	,06378	11,60092

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1,50876	,13958	-10,80926

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 6,256 DF = 3 P = ,100

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

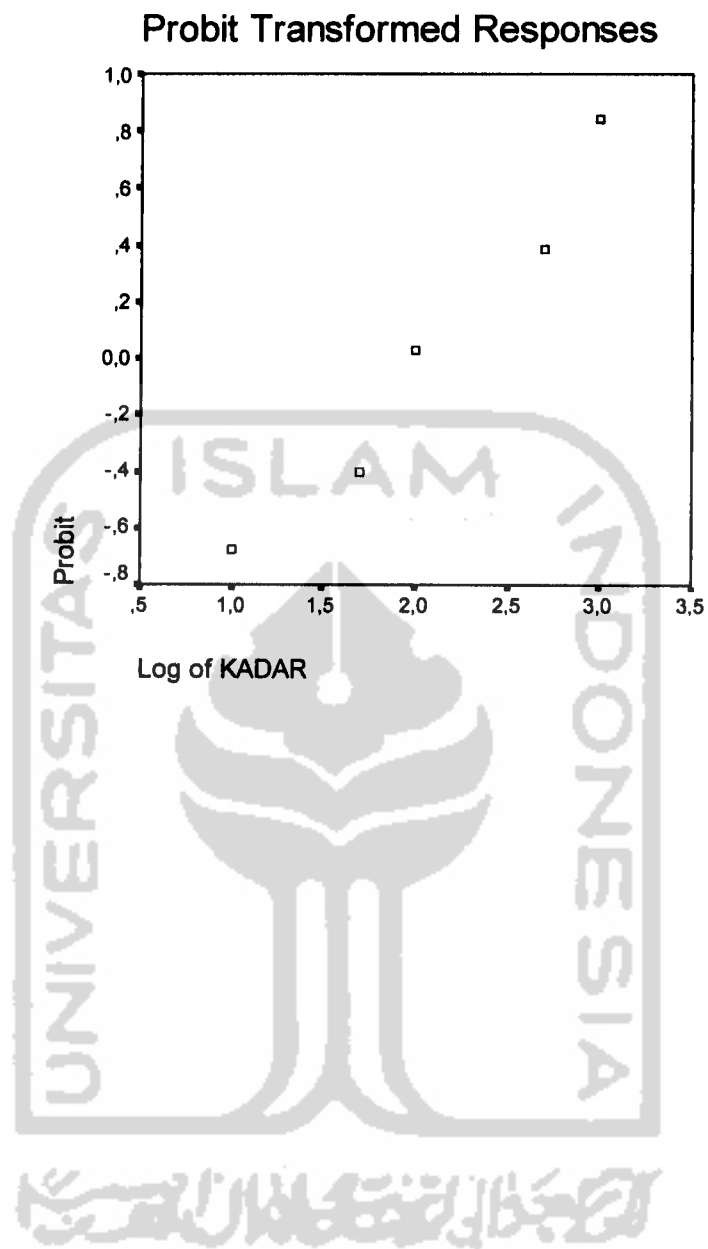
PROBIT ANALYSIS
Observed and Expected Frequencies

KADAR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	144,0	137,061	6,939	,76145
2,70	180,0	117,0	123,716	-6,716	,68731
2,00	180,0	92,0	87,922	4,078	,48846
1,70	180,0	62,0	72,116	-10,116	,40065
1,00	180,0	45,0	39,778	5,222	,22099

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	,07853	,00060	,67172
,02	,18342	,00242	1,24397
,03	,31419	,00587	1,84136
,04	,47102	,01141	2,47529
,05	,65474	,01958	3,15077
,06	,86659	,03099	3,87116
,07	1,10805	,04633	4,63933
,08	1,38082	,06638	5,45798
,09	1,68680	,09202	6,32986
,10	2,02804	,12425	7,25784
,15	4,34868	,42854	12,85317
,20	7,97349	1,13654	20,41810
,25	13,41309	2,59797	30,67726
,30	21,39817	5,38951	44,78287
,35	32,98718	10,41853	64,67976
,40	49,74036	19,01802	93,87239
,45	74,00788	32,95174	139,06129
,50	109,42360	54,25797	213,55613
,55	161,78715	85,13084	344,17521
,60	240,72048	128,39537	585,73165
,65	362,97511	188,82571	1055,15249
,70	559,55840	275,22917	2021,13535
,75	892,67437	404,30344	4166,70928
,80	1501,66666	610,08882	9483,28027
,85	2753,37153	972,17437	25073,05697
,90	5903,98666	1725,64427	86275,87228
,91	7098,38678	1979,41639	116444,64607
,92	8671,30217	2296,49509	161361,72408
,93	10805,94228	2702,73010	231100,88574
,94	13816,83770	3240,20461	345352,77373
,95	18287,44552	3982,45555	546381,31959
,96	25420,67238	5071,00233	937279,64991
,97	38109,13924	6819,24295	1821264,37021
,98	65280,06582	10097,87775	4409630,34971
,99	152476,10555	18708,70600	17806790,2650



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	1,000(a)	,999	,999	,022509

a Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,546	1	2,546	5025,177	,000(a)
	Residual	,002	3	,001		
	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)	,209	,028		7,406	,005
	PROBIT	3,655	,052	1,000	70,888	,000

a Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 12. Hasil Analisis Probit Fraksi Etanol

PROBIT ANALYSIS

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.

PROBIT ANALYSIS

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	,77518	,06442	12,03251

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1,66275	,14230	-11,68459

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 1,773 DF = 3 P = ,621

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

PROBIT ANALYSIS

Observed and Expected Frequencies

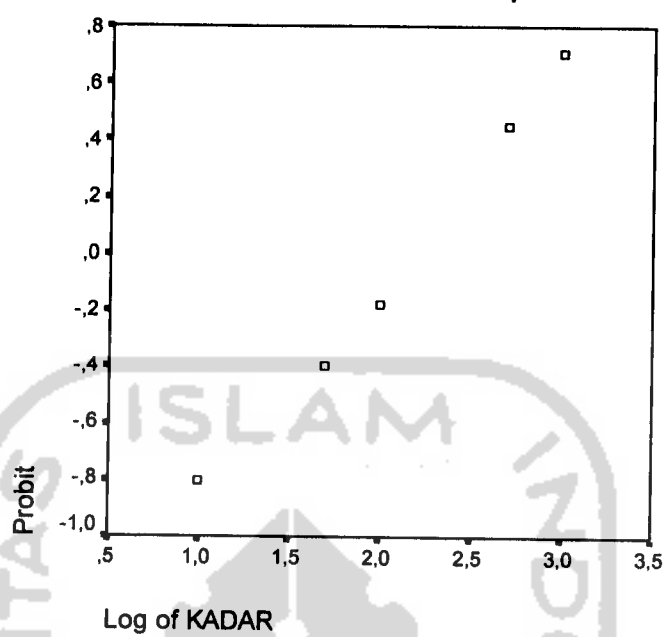
KADAR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	137,0	134,328	2,672	,74627
2,70	180,0	121,0	119,915	1,085	,66620
2,00	180,0	77,0	81,946	-4,946	,45526
1,70	180,0	62,0	65,658	-3,658	,36477
1,00	180,0	38,0	33,730	4,270	,18739

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	,13930	,03597	,37219
,02	,31304	,09427	,74962
,03	,52326	,17362	1,16951
,04	,77012	,27477	1,63485
,05	1,05459	,39903	2,14752
,06	1,37813	,54805	2,70939
,07	1,74252	,72370	3,32250
,08	2,14985	,92807	3,98913
,09	2,60243	1,16343	4,71174
,10	3,10279	1,43224	5,49306
,15	6,42631	3,37882	10,39254
,20	11,46237	6,65698	17,31949
,25	18,83121	11,85589	26,96743
,30	29,41016	19,79392	40,36780
,35	44,45435	31,59082	59,10449
,40	65,79052	48,75113	85,69899
,45	96,13494	73,27402	124,28701
,50	139,63287	107,87287	181,76632
,55	202,81219	156,49378	269,76058
,60	296,35483	225,37654	408,30264
,65	438,59238	325,01152	633,53596
,70	662,94571	473,97193	1015,15394
,75	1035,37337	707,47028	1699,68850
,80	1700,98685	1099,31168	3033,31891
,85	3033,98696	1829,27564	5985,29210
,90	6283,80269	3456,90291	14136,20406
,91	7491,97907	4029,33361	17405,97078
,92	9069,14925	4758,31126	21824,36663
,93	11189,13475	5711,94185	27992,64554
,94	14147,70747	7003,23357	36971,12443
,95	18488,07348	8833,94054	50787,02949
,96	25317,35128	11602,05947	73768,00430
,97	37261,50377	16215,45737	116763,71241
,98	62284,10402	25293,57873	215091,62922
,99	139970,65086	50930,99397	563821,40817

Probit Transformed Responses



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)	,999	,998	,035325

a Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,544	1	2,544	2038,529	,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	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,375	,041		9,156	,003
	PROBIT	3,523	,078	,999	45,150	,000

a Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 13. Hasil Analisis Probit Fraksi Aquades

PROBIT ANALYSIS

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.

PROBIT ANALYSIS

Parameter estimates converged after 8 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KADAR	,58332	,06194	9,41758

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1,31394	,13727	-9,57179

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3,119 DF = 3 P = ,374

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

PROBIT ANALYSIS

Observed and Expected Frequencies

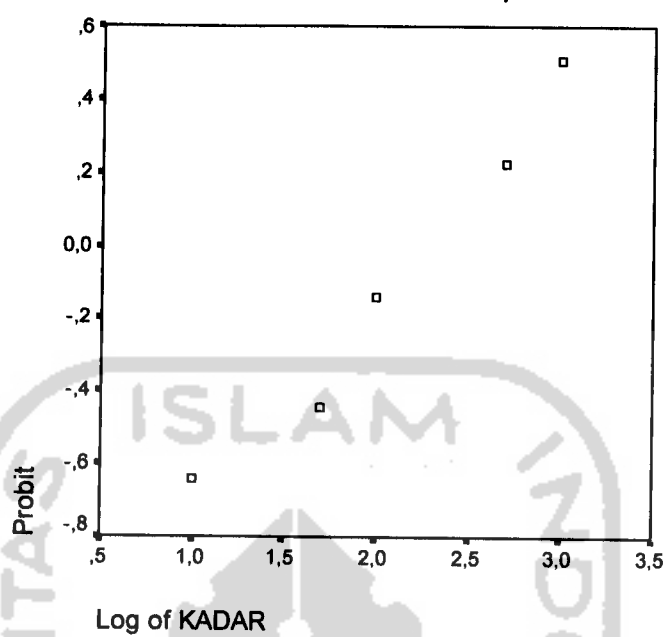
KADAR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,00	180,0	125,0	120,346	4,654	,66859
2,70	180,0	106,0	108,491	-2,491	,60273
2,00	180,0	80,0	79,460	,540	,44145
1,70	180,0	59,0	67,209	-8,209	,37338
1,00	180,0	47,0	41,851	5,149	,23250

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	,01838	,00175	,08687
,02	,05392	,00677	,21256
,03	,10672	,01598	,37523
,04	,17835	,03049	,57565
,05	,27084	,05153	,81561
,06	,38649	,08053	1,09752
,07	,52789	,11909	1,42419
,08	,69788	,16901	1,79882
,09	,89958	,23232	2,22497
,10	1,13640	,31130	2,70653
,15	2,99051	1,04247	6,10940
,20	6,45232	2,70979	11,73038
,25	12,48054	6,10908	20,66580
,30	22,57019	12,56169	34,68023
,35	39,08080	24,17433	56,78353
,40	65,79739	44,10697	92,47977
,45	108,91896	76,75319	152,42927
,50	178,86602	128,08419	257,64687
,55	293,73262	207,17088	449,31129
,60	486,23588	329,70220	809,77631
,65	818,63853	524,27434	1513,23182
,70	1417,49170	845,37382	2957,07236
,75	2563,43431	1404,82698	6140,30931
,80	4958,37994	2458,99293	13932,70921
,85	10698,20877	4700,47048	36377,72983
,90	28152,90287	10576,15037	122214,93755
,91	35564,53563	12858,19356	163851,44667
,92	45843,37095	15896,02950	225343,23110
,93	60605,58763	20067,38543	319957,81227
,94	82777,90317	26027,64125	473383,38918
,95	118124,73154	35007,02996	740165,60763
,96	179379,16363	49576,61620	1251694,76707
,97	299790,96690	76019,79840	2388574,86473
,98	593362,46271	134130,55627	5641433,83757
,99	1740376,34193	327994,36130	21878310,0213

Probit Transformed Responses



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	1,000(a)	,999	,999	,028625

a Predictors: (Constant), PROBIT

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,545	1	2,545	3106,081	,000(a)
	Residual	,002	3	,001		
	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)	-,026	,040		-,658	,557
	PROBIT	4,541	,081	1,000	55,732	,000

a Dependent Variable: LOGKADAR

Lampiran 14. Hasil Analisis Two-Way Anova antara Fraksi Kloroform dan Etanol

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Fraksi	1	Kloroform	15
	2	Etanol	15
Konsentrasi fraksi	1	1000 mg/ml	6
	2	500 mg/ml	6
	3	100 mg/ml	6
	4	50 mg/ml	6
	5	10 mg/ml	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Persentase kematian

Fraksi	Konsentrasi fraksi	Mean	Std. Deviation	N
Kloroform	1000 mg/ml	80.00	1.67	3
	500 mg/ml	65.00	3.33	3
	100 mg/ml	50.92	2.51	3
	50 mg/ml	36.48	4.53	3
	10 mg/ml	25.56	4.19	3
	Total	51.59	20.35	15
Etanol	1000 mg/ml	76.11	3.47	3
	500 mg/ml	67.22	3.85	3
	100 mg/ml	42.78	7.70	3
	50 mg/ml	34.44	10.59	3
	10 mg/ml	21.11	5.09	3
	Total	48.33	21.92	15
Total	1000 mg/ml	78.06	3.24	6
	500 mg/ml	66.11	3.44	6
	100 mg/ml	46.85	6.79	6
	50 mg/ml	35.46	7.37	6
	10 mg/ml	23.34	4.83	6
	Total	49.96	20.85	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Persentase kematian

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12039.320 ^a	9	1337.702	47.355	.000
Intercept	74888.042	1	74888.042	2651.033	.000
FRAKSI	79.642	1	79.642	2.819	.109
KNTRS	11873.818	4	2968.455	105.083	.000
FRAKSI * KNTRS	85.860	4	21.465	.760	.564
Error	564.973	20	28.249		
Total	87492.335	30			
Corrected Total	12604.293	29			

a. R Squared = .955 (Adjusted R Squared = .935)

Estimated Marginal Means

1. Fraksi

Estimates

Dependent Variable: Persentase kematian

Fraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kloroform	51.592	1.372	48.729	54.455
Etanol	48.333	1.372	45.471	51.196

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Persentase kematian

(I) Fraksi	(J) Fraksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
Kloroform	Etanol	3.259	1.941	.109	-.790	7.307
Etanol	Kloroform	-3.259	1.941	.109	-7.307	.790

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Persentase kematian

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	79.642	1	79.642	2.819	.109
Error	564.973	20	28.249		

The F tests the effect of Fraksi. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2. Konsentrasi fraksi

Estimates

Dependent Variable: Persentase kematian

Konsentrasi fraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1000 mg/ml	78.055	2.170	73.529	82.581
500 mg/ml	66.112	2.170	61.586	70.638
100 mg/ml	46.850	2.170	42.324	51.376
50 mg/ml	35.462	2.170	30.936	39.988
10 mg/ml	23.335	2.170	18.809	27.861

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Persentase kematian

(I) Konsentrasi fraksi	(J) Konsentrasi fraksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1000 mg/ml	500 mg/ml	11.943*	3.069	.001	5.542	18.344
	100 mg/ml	31.205*	3.069	.000	24.804	37.606
	50 mg/ml	42.593*	3.069	.000	36.192	48.994
	10 mg/ml	54.720*	3.069	.000	48.319	61.121
500 mg/ml	1000 mg/ml	-11.943*	3.069	.001	-18.344	-5.542
	100 mg/ml	19.262*	3.069	.000	12.861	25.663
	50 mg/ml	30.650*	3.069	.000	24.249	37.051
	10 mg/ml	42.777*	3.069	.000	36.376	49.178
100 mg/ml	1000 mg/ml	-31.205*	3.069	.000	-37.606	-24.804
	500 mg/ml	-19.262*	3.069	.000	-25.663	-12.861
	50 mg/ml	11.388*	3.069	.001	4.987	17.789
	10 mg/ml	23.515*	3.069	.000	17.114	29.916
50 mg/ml	1000 mg/ml	-42.593*	3.069	.000	-48.994	-36.192
	500 mg/ml	-30.650*	3.069	.000	-37.051	-24.249
	100 mg/ml	-11.388*	3.069	.001	-17.789	-4.987
	10 mg/ml	12.127*	3.069	.001	5.726	18.528
10 mg/ml	1000 mg/ml	-54.720*	3.069	.000	-61.121	-48.319
	500 mg/ml	-42.777*	3.069	.000	-49.178	-36.376
	100 mg/ml	-23.515*	3.069	.000	-29.916	-17.114
	50 mg/ml	-12.127*	3.069	.001	-18.528	-5.726

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Persentase kematian

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	11873.818	4	2968.455	105.083	.000
Error	564.973	20	28.249		

The F tests the effect of Konsentrasi fraksi . This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

3. Fraksi * Konsentrasi fraksi

Dependent Variable: Persentase kematian

Fraksi	Konsentrasi fraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kloroform	1000 mg/ml	80.000	3.069	73.599	86.401
	500 mg/ml	65.000	3.069	58.599	71.401
	100 mg/ml	50.923	3.069	44.522	57.324
	50 mg/ml	36.480	3.069	30.079	42.881
	10 mg/ml	25.557	3.069	19.156	31.958
Etanol	1000 mg/ml	76.110	3.069	69.709	82.511
	500 mg/ml	67.223	3.069	60.822	73.624
	100 mg/ml	42.777	3.069	36.376	49.178
	50 mg/ml	34.443	3.069	28.042	40.844
	10 mg/ml	21.113	3.069	14.712	27.514

Post Hoc Tests

Konsentrasi fraksi

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Persentase kematian

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Konsentrasi fraksi	(J) Konsentrasi fraksi				Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni 1000 mg/ml	500 mg/ml	11.94*	3.07	.009	2.27	21.62
	100 mg/ml	31.21*	3.07	.000	21.53	40.88
	50 mg/ml	42.59*	3.07	.000	32.92	52.27
	10 mg/ml	54.72*	3.07	.000	45.04	64.40
500 mg/ml	1000 mg/ml	-11.94*	3.07	.009	-21.62	-2.27
	100 mg/ml	19.26*	3.07	.000	9.59	28.94
	50 mg/ml	30.65*	3.07	.000	20.97	40.33
	10 mg/ml	42.78*	3.07	.000	33.10	52.45
100 mg/ml	1000 mg/ml	-31.21*	3.07	.000	-40.88	-21.53
	500 mg/ml	-19.26*	3.07	.000	-28.94	-9.59
	50 mg/ml	11.39*	3.07	.014	1.71	21.06
	10 mg/ml	23.51*	3.07	.000	13.84	33.19
50 mg/ml	1000 mg/ml	-42.59*	3.07	.000	-52.27	-32.92
	500 mg/ml	-30.65*	3.07	.000	-40.33	-20.97
	100 mg/ml	-11.39*	3.07	.014	-21.06	-1.71
	10 mg/ml	12.13*	3.07	.008	2.45	21.80
10 mg/ml	1000 mg/ml	-54.72*	3.07	.000	-64.40	-45.04
	500 mg/ml	-42.78*	3.07	.000	-52.45	-33.10
	100 mg/ml	-23.51*	3.07	.000	-33.19	-13.84
	50 mg/ml	-12.13*	3.07	.008	-21.80	-2.45

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Persentase kematian

Konsentrasi fraksi	N	Subset				
		1	2	3	4	5
Duncan ^{a, b} 10 mg/ml	6	23.34				
50 mg/ml	6		35.46			
100 mg/ml	6			46.85		
500 mg/ml	6				66.11	
1000 mg/ml	6					78.06
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 28.249.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

