

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini yang saya tulis, bahwasannya benar-benar hasil karya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh penulis lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti bahwasannya skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, November 2015

Mahasiswa

Khoirun Nisa
115080300111145



UCAPAN TERIMAKASIH

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT. atas berkah dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini. Laporan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Dalam penyusunan laporan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Allah SWT. yang selalu memberikan kemudahan, pertolongan, rezeki dan kesehatan serta Nabi Muhammad SAW. yang selalu menjadi suri tauladan sehingga penulis selalu tetap semangat dan sabar dalam menyelesaikan laporan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan mulai dari pembuatan usulan skripsi hingga terselesaikannya laporan ini serta Ibu Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran selama menyusun laporan skripsi ini.
3. Ibunda tercinta Koyimah dan Ayahanda Syamhudi serta adik tercinta Ahmad Taufik Hidayatullah yang selalu memberikan semangat dukungan baik moril maupun materil serta do'a yang selalu menyertai.
4. Sahabat terbaik Yunita Ratnasari yang selalu memberikan semangat dan dukungan sepenuh hati selama berjuang bersama hingga sekarang terselesaikannya laporan skripsi ini
5. Puput, Syahera, Rahma, Nira, Widya, Hilman, Indah, Trisna dan Echa dan team skripsi serta semuanya yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih telah membantu dengan sepenuh hati, memberikan informasi dan berjuang bersama.
6. Ani setia, Imroatiul Fathonah dan teman satu team bimbingan skripsi Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS yang telah bersedia memberi semangat dan kerjasama yang baik selama penelitian ini berlangsung.

Malang, November 2015
Penulis



RINGKASAN

KHOIRUN NISA. Skripsi tentang Perbedaan Pelarut Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antitumor dari Alga Coklat *Sargassum echinocarpum* pada Viabilitas Sel HeLa (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS** dan **Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP**).

Alga coklat banyak tumbuh diperairan Indonesia termasuk didaerah perairan Talango, wilayah timur pulau Madura. *Sargassum echinocarpum* salah satu spesies yang terdapat diperairan Talango, Madura. Alga coklat jenis *Sargassum echinocarpum* ini banyak mengandung zat gizi dan senyawa bioaktif. Warna dasar dari alga coklat adalah pigmen golongan karatenoid. Bioaktif pada alga coklat berupa polifenol, tanin yang berpotensi sebagai antitumor yaitu dengan cara menghambat kinerja enzim sel, mencegah mutagenesis yang dapat menimbulkan bahaya pada sel tumor.

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dari pelarut yang berbeda terhadap aktivitas antitumor dengan uji viabilitas sel HeLa. Serta untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak *Sargassum echinocarpum* yang berpotensi sebagai antitumor. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei – September 2015, bertempat di Laboratorium Perencanaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran.

Metode yang digunakan yaitu metode eksperimen. Eksperimen bertujuan untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan antar dua variabel. Rancangan percobaan yang dilakukan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Dimana dalam penelitian ini menggunakan perlakuan dengan 2 faktor. Faktor A dengan 3 perlakuan yaitu pelarut yang berbeda (n-heksan, etil asetat dan etanol), sedangkan faktor B dengan 4 perlakuan yaitu dosis yang berbeda (5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm) serta menggunakan ulangan sebanyak 3 kali.

Berdasarkan hasil penelitian, perlakuan yang dapat menghambat kematian sel HeLa dengan baik adalah ekstrak kasar dari hasil pelarut etanol dengan perlakuan dosis 20 ppm. Hasil dari jumlah viabilitas sel HeLa 48,85% dan jumlah kematian sel HeLa sebesar 51,15%. Sedangkan hasil terendah didapatkan dari perlakuan ekstrak kasar dari pelarut n-heksan dengan dosis 5% dengan hasil viabilitas sel HeLa sebesar 98,29% dan jumlah kematian sel HeLa sebesar 1,17%.

Pada uji LC-MS didapatkan tiga puncak waktu retensi. Waktu retensi yang dapat yaitu 2.5530, 3.9146 dan 7.2564. pada waktu retensi yang dihasilkan ditemukan senyawa yang diduga sebagai aktivitas antikanker. Senyawa-senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker meliputi *3,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone* merupakan turunan dari senyawa flavonoid, *Digoxigenin* turunan dari senyawa steroid, dan *1,3-Diaminopropane* turunan dari senyawa alkaloid

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT. atas rahmat dan hidayahnya yang telah diberikan kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan Laporan Skripsi penelitian yang berjudul “Perbedaan Pelarut Ekstrak Terhadap Aktivitas Antitumor dari Alga Coklat *Sargassum echinocarpum*”. Dalam laporan ini disajikan bahasan yang meliputi penjelasan pembuatan ekstrak alga coklat *Sargassum echinocarpum*, proses skrining fitokimia, proses uji toksisitas dan proses uji viabilitas sel HeLa. Penelitian ini bertujuan memberikan informasi kepada masyarakat bahwa ekstrak kasar dari alga coklat *Sargassum echinocarpum* berpotensi sebagai antitumor.

Penulis menyadari bahwa laporan yang sederhana ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang membangun dari pembaca. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang membutuhkan dan memberikan kontribusi positif bagi perkembangan perikanan di masa depan.

Malang, November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
UCAPAN TERIMAKASIH	iii
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Hipotesis	5
1.5 Kegunaan	5
1.6 Jadwal Penelitian	6

2. PENDAHULUAN

2.1 Alga Coklat	7
2.1.1 Kalisifikasi dan Morfologi <i>Sargassum echinocarpum</i>	7
2.2 Senyawa Bioaktif Alga Coklat	8
2.2.1 Flavonoid	9
2.2.2 Alkaloid	10
2.2.3 Steroid	10
2.3 Ekstraksi	11
2.3.1 Etanol	11
2.3.2 Etil asetat	12
2.3.3 N-heksan	12
2.4 Uji Fitokimia	13
2.5 Uji Toksisitas	14
2.6 <i>Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry</i>	15
2.7 Kanker	16
2.8 Sel HeLa	17

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian	19
3.1.1 Bahan Penelitian	19
3.1.2 Alat Penelitian	19
3.2 Metode Penelitian	20
3.2.1 Rancangan Percobaan	20
3.2.2 Prosedur Penelitian	22
a. Proses Pengeringan	22
b. Ekstraksi	23
c. Uji Fitokimia	24
d. Uji Toksisitas	25
e. Uji Viabilitas Sel HeLa	26
f. Uji <i>Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry</i>	28

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* 29

4.2 Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* 30

4.3 Hasil Fitokimia Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum*..... 32

4.4 Hasil Uji Pengaruh Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum*..... 35

 4.4.1 Perhitungan Sel..... 35

 4.4.2 Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* terhadap Viabilitas Sel HeLa 37

 4.4.3 Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* terhadap Kematian Sel HeLa 40

4.5 Hasil *Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry*..... 42

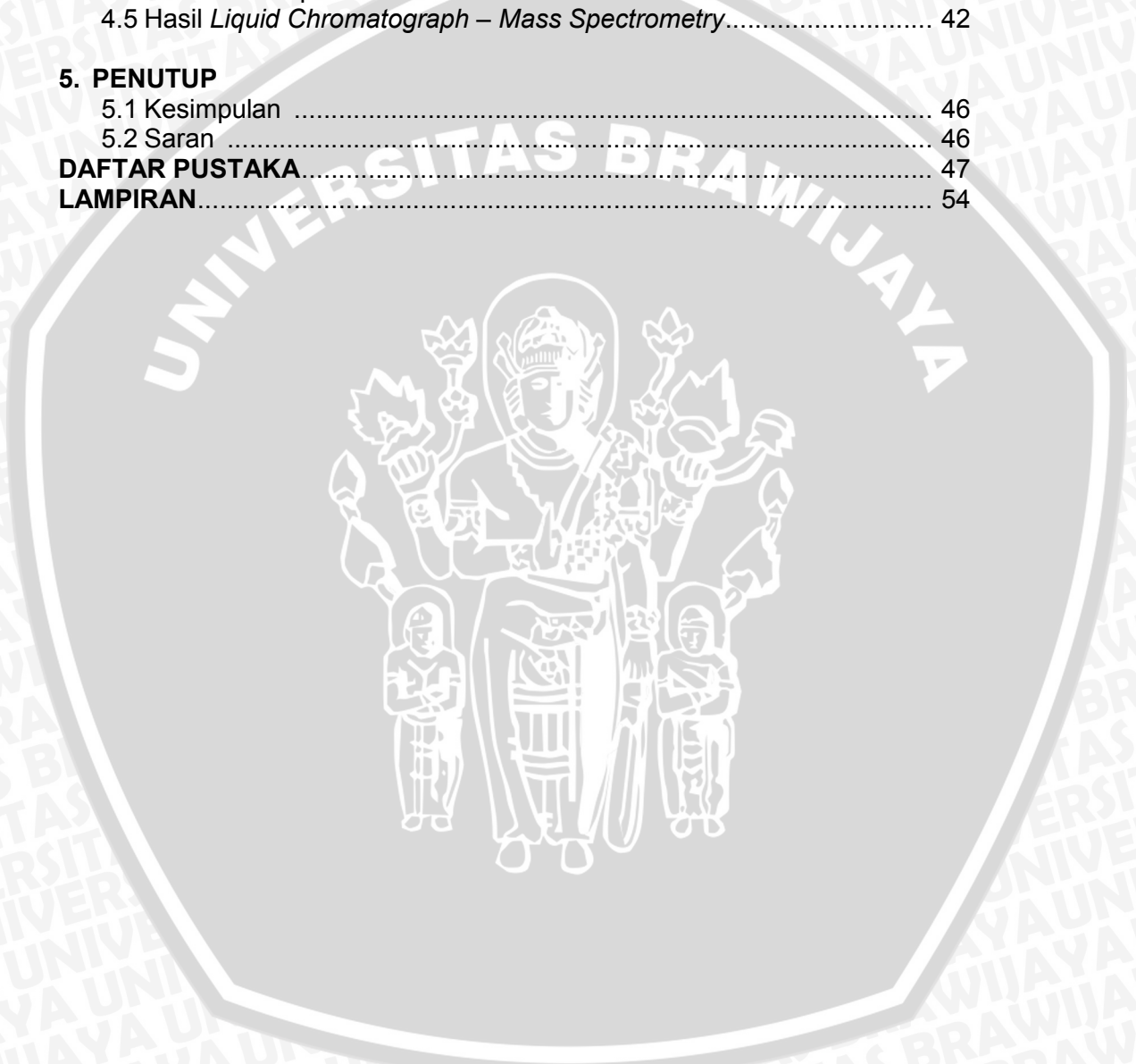
5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan 46

5.2 Saran 46

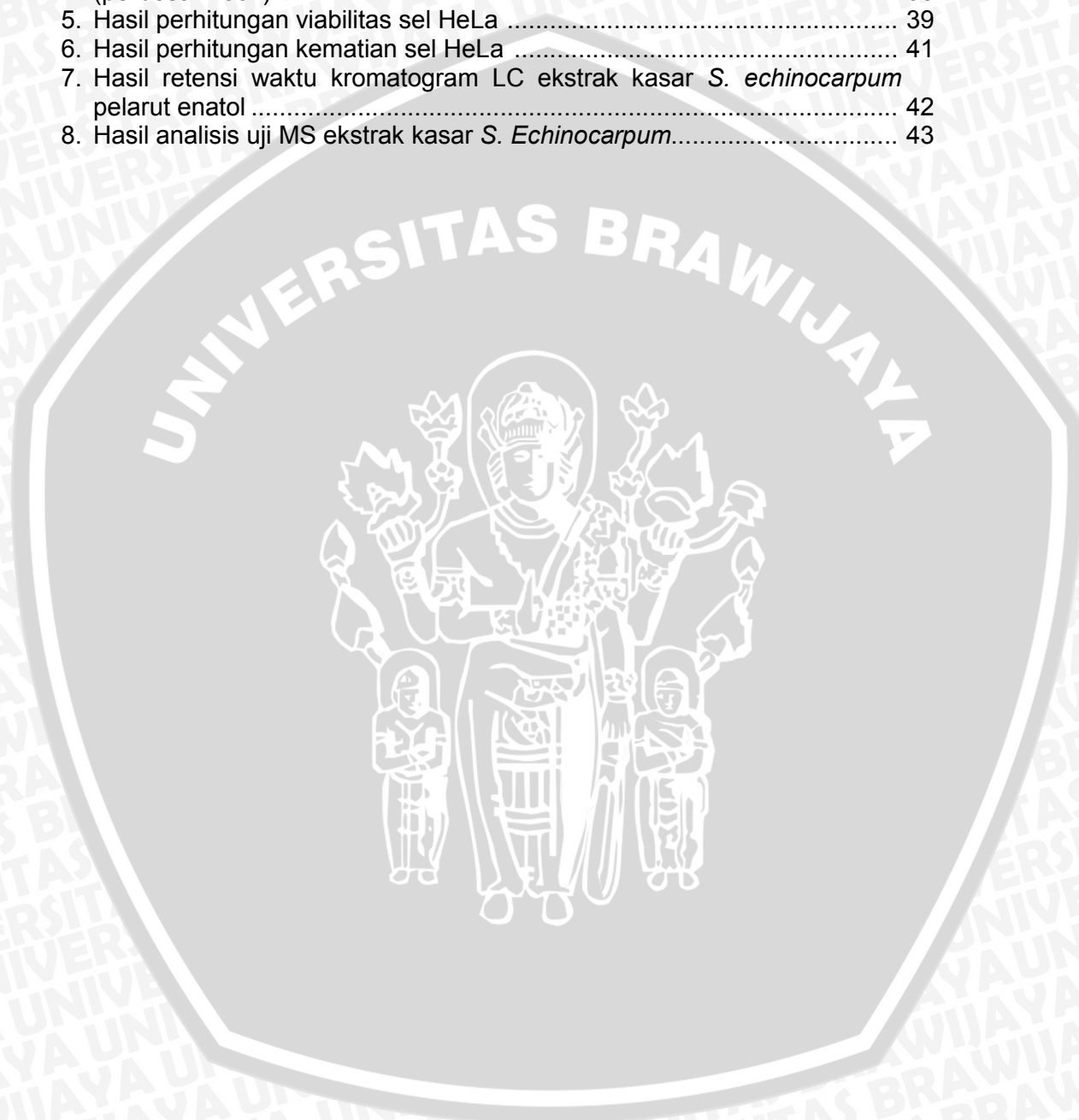
DAFTAR PUSTAKA..... 47

LAMPIRAN..... 54



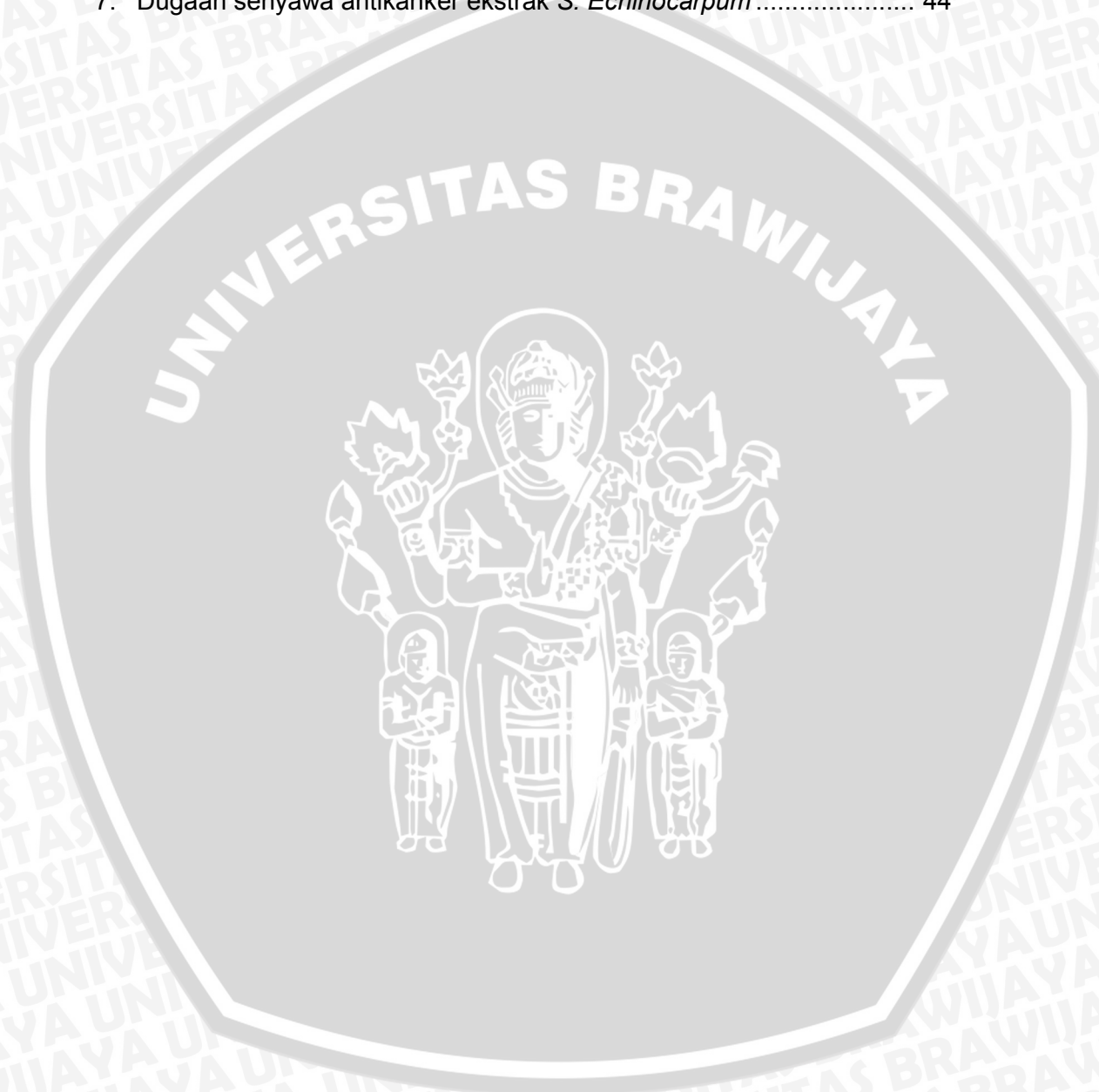
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum echinocarpum</i>	8
2. Model sistem LC-MS	16
3. Reaksi uji alkaloid	34
4. Sel HeLa yang mati dan hidup pada bilik <i>haemacytometer</i> (perbesar 200x)	36
5. Hasil perhitungan viabilitas sel HeLa	39
6. Hasil perhitungan kematian sel HeLa	41
7. Hasil retensi waktu kromatogram LC ekstrak kasar <i>S. echinocarpum</i> pelarut enatol	42
8. Hasil analisis uji MS ekstrak kasar <i>S. Echinocarpum</i>	43



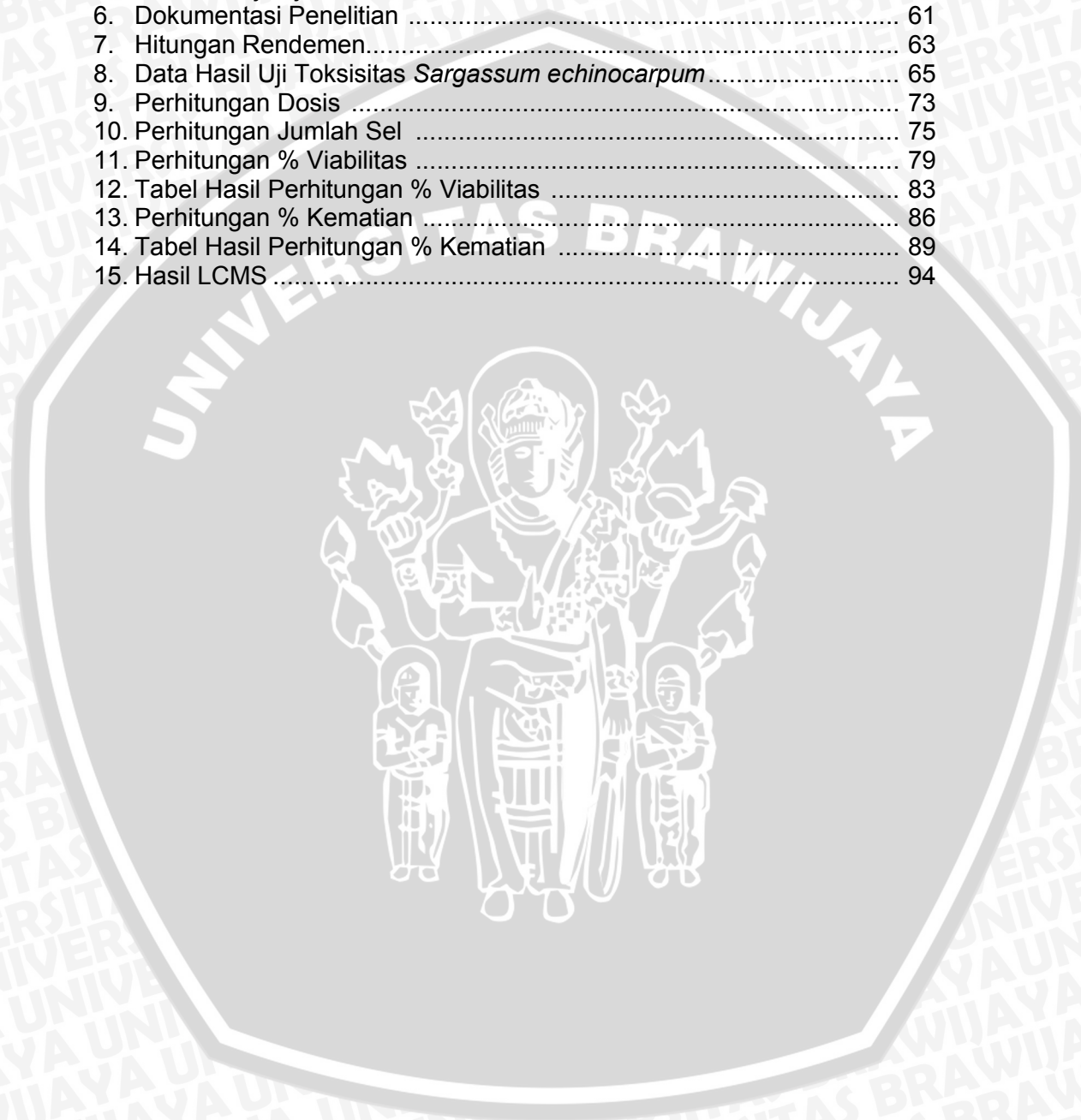
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat fisika dan kimia etanol	12
2. Sifat fisika dan kimia n-heksan	13
3. Rancangan percobaan	21
4. Data rendemen ekstrak kasar <i>Sargassum echinocarpum</i>	29
5. Data hasil uji BSLT	31
6. Data hasil fitokimia ekstrak kasar <i>Sargassum echinocarpum</i>	32
7. Dugaan senyawa antikanker ekstrak <i>S. Echinocarpum</i>	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Proses Ekstraksi	54
2. Skrining Fitokimia	55
3. Pengujian Toksisitas	57
4. Pengujian Sel HeLa	58
5. Skema kerja uji LC-MS	60
6. Dokumentasi Penelitian	61
7. Hitungan Rendemen	63
8. Data Hasil Uji Toksisitas <i>Sargassum echinocarpum</i>	65
9. Perhitungan Dosis	73
10. Perhitungan Jumlah Sel	75
11. Perhitungan % Viabilitas	79
12. Tabel Hasil Perhitungan % Viabilitas	83
13. Perhitungan % Kematian	86
14. Tabel Hasil Perhitungan % Kematian	89
15. Hasil LCMS	94



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan memiliki wilayah laut yang luas dengan garis pantai sepanjang lebih kurang 81.000 km. Melihat luas wilayah perairannya, potensi kekayaan alam yang dimiliki Indonesia cukup tinggi, dengan tingginya tingkat keragaman hayati. Perairan Indonesia memiliki berbagai jenis organisme laut. Pemanfaatan sumberdaya laut tidak hanya terbatas sebagai bahan makanan, tetapi bisa dijadikan sebagai sumber bahan kimia alam yang dapat berpotensi sebagai bahan obat-obatan (Handayani *et al.*, 2008)

Perairan Indonesia ditumbuhi oleh beragam jenis alga. Berbagai macam alga di Indonesia berdasarkan dari warna talus dikelompokkan menjadi 3 jenis, yaitu alga merah (*Rhodophyta*), alga hijau (*Chlorophyta*), dan alga coklat (*Phaeophyta*). Alga coklat atau disebut juga rumput laut coklat banyak ditemukan di daerah perairan talango, wilayah timur pulau Madura (Limantara dan Heriyanto, 2010). Terdapat sekitar 8 marga dan 6 jenis alga coklat, di antaranya telah dimanfaatkan oleh penduduk Indonesia untuk dikonsumsi langsung dan sebagai obat. Alga coklat jenis *Sargassum* tergolong tumbuhan kosmopolitan yang hidup pada rataan terumbu karang sampai daerah tubir (Kordi, 2010).

Alga coklat ini banyak mengandung zat gizi dan bioaktif termasuk jenis *Sargassum echinocarpum*. Kandungan dari warna dasar alga coklat berasal dari pigmen golongan karatenoid. Dalam proses fotosintetik pada alga coklat ini membutuhkan klorofil a, sedangkan karatenoid sebagai pigmen pelengkap. Karatenoid utama pada alga coklat merupakan fukosantin (Limantara dan Heriyanto, 2010). Selain fukosantin salah satu kandungan yang terdapat pada alga coklat *Sargassum echinocarpum* adalah senyawa fucoidan. Senyawa ini

tergolong jenis glikonutrien dari polisakarida (Phang, 2010). Firdaus *et al.*, (2012), menyatakan ekstrak dari *Sargassum echinocarpum* mengandung tanin, polifenol, saponin, glikosida, dan steroid, tergolong toksik yang moderat serta aman dikonsumsi pada dosis kurang dari 1250mg/kg BB.

Bioaktif pada alga coklat berupa polifenol, tanin berpotensi sebagai antioksidan yang sangat baik. Senyawa ini juga dapat disajikan sebagai agen kemopreventif, dikarenakan kemampuannya dalam meredam radikal bebas (Nursid *et al.*, 2013). Bilan *et al.*, (2010) menyatakan selain berfungsi sebagai antioksidan bioaktif pada alga coklat juga berfungsi sebagai antidiabet, antibakteri, antivirus, antikoagulan, dan antitumor. Aktifitas tanin sebagai antitumor yaitu dengan cara menghambat kinerja enzim sel, mencegah proses mutagenesis yang dapat menimbulkan bahaya pada sel tumor (Hernawan dan Setyawan, 2003). Karatenoid belakangan ini telah diketahui tidak hanya sebagai sumber pigmentasi tetapi juga bermanfaat dalam bidang farmasi. Karatenoid berfungsi sebagai antioksidan dimana berperan dalam pencegahan kanker dan meningkatkan respon imun (Heo *et al.*, 2012).

Sel tumor pada tubuh yang dapat membesar dan mengalami mutasi gen akan berubah menjadi tumor ganas yang biasa disebut sel kanker. Mutasi gen akan menyebabkan sel membelah secara terus menerus. Pembelahan sel yang tidak terkendali akan menyerang jaringan biologis lainnya. Dalam hal ini mutasi gen dapat diakibatkan oleh kerusakan DNA (Karina dan Yamasari, 2013). Dalam bidang kedokteran penyembuhan kanker dapat dilakukan dengan dua cara yaitu konvensional dan non konvensional.

Berbagai macam telah dikembangkan melawan kanker yaitu senyawa-senyawa antimetabolik, obat-obat radiomimetik, hormon dan senyawa antagonis. Akan tetapi pengobatan ini diketahui dapat menyebabkan efek samping yang merugikan (Puji *et al.*, 2015). Kini telah dibuktikan bahwa dari senyawa bioakti

tumbuhan yakni fenolik memiliki efek proliferasi terhadap sel dan menunjukkan penghambatan sel. Selain itu senyawa fenolik dalam tanaman diduga berpotensi sebagai antikanker (Da'i *et al.*, 2007). Penelitian sebelumnya telah menyatakan senyawa pada bioaktif dari alga coklat *Sargassum* tinggi akan aktivitas antioksidan. Senyawa bioaktif diuji sebagai antikanker menggunakan viabilitas sel HeLa. Dosis yang baik digunakan dalam pengujian ini adalah sebesar 20 µg/ml (Damirtas *et al.*, 2009).

Pengambilan bioaktif antikanker dilakukan dengan cara ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi bertingkat. Penggunaan metode ekstraksi bertingkat untuk mendapatkan komponen bioaktif yang lebih murni. Sedangkan pelarut yang digunakan dalam metode ekstraksi ini adalah N-heksan, etil asetat, dan etanol. Penggunaan pelarut N-heksan, etil asetat, dan etanol dikarenakan bahan organik ini mampu memisahkan senyawa-senyawa penting dari suatu bahan (Septiana dan Ari, 2013). Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diambil. Sifat yang harus diperhatikan adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa. Pada prinsipnya pengambilan senyawa bioaktif akan mudah dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai polaritasnya (Sudarmadji *et al.*, 1989).

Ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode maserasi. Prinsip dari metode maserasi adalah perendaman sampel. Cairan menyari (pelarut) akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif yang terkandung dalam sel akan terekstrak keluar karena adanya perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Peristiwa tersebut akan terus berlangsung sampai terjadi kesetimbangan konsentrasi antara di dalam dan diluar sel (Chasani *et al.*, 2013). Metode maserasi memiliki beberapa keuntungan, yaitu mampu mengurangi rusaknya senyawa senyawa yang

terkandung dalam sampel akibat pemanasan dan tidak memerlukan alat khusus dibandingkan dengan metode Soxhlet. Metode ini sangat sederhana namun mampu memisahkan senyawa kimia yang diinginkan hanya dengan menggunakan pelarut tertentu (Harborne, 1984).

Perbedaan ekstraksi bertingkat dengan satu tahap yaitu apabila ekstraksi satu tahap hanya digunakan satu pelarut untuk ekstraksi, sedangkan ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut secara bergantian. Metode ekstraksi satu tahap dengan pelarut tunggal telah sering ditemui dalam penelitian sebelumnya. Maka dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan pelarut yang berbeda terhadap aktivitas antitumor dari alga coklat *Sargassum echinocarpum*.



1.2 Perumusan Masalah

Adapun perumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- Jenis pelarut apa dan dosis berapa yang baik digunakan hingga ekstrak *Sargassum echinocarpum* berpengaruh terhadap aktivitas antikanker pada viabilitas sel HeLa?
- Senyawa apa yang terdapat pada ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* yang bersifat sebagai aktivitas antikanker?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian isolasi, identifikasi dan uji aktivitas antikanker dari alga coklat (*Sargassum echinocarpum*) adalah untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan dosis yang digunakan untuk ekstraksi terhadap aktivitas antikanker dengan viabilitas sel HeLa.

1.4 Hipotesis

H0: Pemberian ekstrak kasar dari alga coklat *Sargassum echinocarpum* dengan perlakuan pelarut dan dosis yang berbeda diduga tidak berpengaruh dalam menurunkan % viabilitas sel HeLa.

H1: Pemberian ekstrak kasar dari alga coklat *Sargassum echinocarpum* dengan perlakuan pelarut dan dosis yang berbeda diduga berpengaruh dalam menurunkan %viabilitas sel HeLa.

1.5 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kandungan dari alga coklat (*Sargassum echinocarpum*) yang dapat digunakan sebagai bahan obat-obatan terkait kandungan senyawa bioaktif didalamnya sebagai anti tumor.

1.6 Jadwal Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Perencanaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Lembaga Ilmu dan Pengkajian Ilmiah Serpong pada bulan Mei-September 2015.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga coklat

Alga terbagi menjadi tiga yaitu alga hijau, alga merah, dan alga coklat. Salah satu spesifikasi yang membedakan dari ketiga alga ini yaitu pigmen yang terkandung didalamnya. Alga hijau mengandung pigmen khlorofil a dan b, xantofil, beta dan gama karoten. Pada alga merah mengandung pigmen khlorofil a dan d, fikobilin yang terdiri dari fikoeritrin (berwarna merah) dan fukosianin (berwarna biru). Sedangkan pada alga coklat pigmen yang terkandung yaitu khlorofil a dan c, beta karoten dan fukosantin (Suparmi dan Sahri, 2009)

Alga coklat yaitu berbentuk ganggang atau alga dalam bentuk poliseluler dan habitatnya dilaut. Alga coklat dapat tumbuh diperairan kedalaman 0,5-10 m dan kondisi laut yang berarus dan berombak. Hidup diperairan jernih yang terdapat batu karang sebagai tempat alga menempel dan dapat tumbuh subur pada daerah tropis (Khotimah *et al.*, 2013).

Digolongkan kedalam alga coklat dikarenakan warna dari alga ini coklat. Warna coklat dari alga didapatkan dari kandungan pigmen yang disebut fukosantin. Pigmen ini menyelubungi zat klorofil yang terdapat pada alga coklat. Selain didominasi dengan warna coklat pada alga coklat terdapat warna hijau-emas, warna ini dapat berasal dari kombinasi klorofil dan pigmen lain yang menyerap sinar dari sinar matahari (Nurmayati *et al.*, 2006).

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi *Sargassum echinocarpum*

Klasifikasi *Sargassum echinocarpum* menurut Atmadja *et al.* (1996), adalah sebagai berikut:

Devisi : Phaeophyta
Kelas : Phaeophyceae
Bangsa : Fucales
Suku : Sargassaceae
Marga : Sargassum
Jenis : *Sargassum echinocarpum*

Sargassum echinocarpum dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Sargassum echinocarpum*

Sargassum disebut juga dengan seaholly karena bentuk daun beregerigi bagian pinggirannya mirip dengan gergaji, dimana menyerupai daun holy. Batang *sargassum* mempunyai pelampung (*pneumatocyst*) yang berbentuk buah beri. Pelampung berfungsi untuk membantu tumbuhan *sargassum* untuk dapat mengapung (Nurmayati *et al.*, 2006). Secara umum alga coklat jenis *Sargassum* memiliki ciri-ciri yaitu bentuk talus yang umumnya silindris dan ada juga berbentuk gepeng, cabang batangnya menyerupai pohon darat yaitu rimbun, bentuk daun melebar dan sebagian memanjang, memiliki gelembung udara, dan panjang tanaman ini bisa mencapai 7 meter (Aslan, 1998).

2.2 Senyawa Bioaktif Alga Coklat

Alga banyak mengandung berbagai senyawa bioaktif sehingga dapat dikembangkan untuk dijadikan bahan nutrasetikal. Termasuk alga coklat yaitu berfungsi sebagai sumber dari metabolit sekunder yang memiliki nilai ekonomi cukup baik seperti karatenoid, laminaran, alginat, fukoidan, manitol, dan

phlorotanin. Pigmen yang dihasilkan oleh biota laut yaitu berupa karatenoid. Salah satu pigmen yang dihasilkan oleh alga coklat dari kelompok karatenoid adalah fukosantin (Nursid *et al.*, 2013).

Alga coklat mempunyai fungsi sebagai antitumor. Dalam fungsinya sebagai antitumor, senyawa yang berperan adalah senyawa yang berasal dari kelompok pigmen karatenoid yang teroksidasi dalam strukturnya, yaitu fukosantin. Selain senyawa fukosantin alga coklat juga mengandung violaksantin, flavosantin, dan neosantin a dan b. Kelompok dari pigmen karatenoid yang banyak ditemukan dari alga coklat adalah β -karoten (Biranti *et al.*, 2009).

2.2.1 Flavonoid

Flavonoid termasuk salah satu golongan yang paling banyak ditemukan pada jaringan tanaman. Senyawa flavonoid ini juga termasuk golongan senyawa phenolik yang memiliki struktur kimia $C_6-C_3-C_6$. Kerangka pada flavonoid terdapat satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan diposisi tengah terdapat satu cincin berbentuk heterosiklik. Senyawa flavonoid dapat dijadikan beberapa bagian kedalam sub-sub kelompok berdasarkan dengan kandungan pada cincin heterosiklik (Redha, 2010). Nugrahaningtyas *et al.* (2005), menyatakan flavonoid dapat digolongkan menjadi 11 kelas. Semua senyawa ini mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya.

Senyawa flavonoid dinyatakan berfungsi sebagai anti kanker. Percobaan yang dilakukan secara in-vitro pada beberapa senyawa flavonoid dapat menghambat aktivitas hialurodinase (Sundaryono, 2011). Salah satu golongan dari senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antikanker adalah genistesin. Genistesin bekerja sebagai antikanker yaitu dengan fungsinya sebagai penghambat protein-tirosin-kinase (Sukadana, 2010).

2.2.2 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan yang terdapat pada bagian batang, kulit batang, daun, bahkan biji. Senyawa alkaloid memiliki efek pada bidang kesehatan berupa sebagai obat hipertensi, pemicu sistem syaraf, mengurangi rasa sakit, dan antimikroba (Aksara *et al.*, 2013). Pada umumnya senyawa ini bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam struktur gabungan atom nitrogen sebagai bagian dari sistem siklik (Harborne, 1984).

Alkaloid berbeda dengan sebagian besar komponen tumbuhan yang lain. Sifat yang dapat membedakan dari komponen tumbuhan lain adalah dari kebasahan senyawa alkaloid. Oleh karena itu senyawa alkaloid yang terdapat pada tumbuhan terkadang berperan sebagai garan dari berbagai asam organik. Alkaloid biasanya diperoleh dengan cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut air bersifat asam yang dapat melarutkan alkaloid sebagai garam (Robinson, 1995)

2.2.3 Steroid

Steroid merupakan senyawa yang tergolong dalam polisiklik, pada inti struktur steroid memiliki kesamaan dengan inti triterpenoid tertrasiklik lain. Kesamaan terdapat pada gugus 2 netil yang terikat pada cincin, terletak pada posisi 10 dan 13. Terdapat juga rantai samping 8 karbon. Tetapi pada steroid dari tumbuhan mempunyai 1 atau 2 atom karbon tambahan. Steroid dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis yaitu sterol, sterolin, saponin, glikosida jantung dan asam empedu. Perbedaan dari setiap jenis steroid ini dapat dilihat dari bentuk substituen R pada C_{17} , C_{13} dan C_{10} yang terikat pada kerangka dasar karbon (Susilawati *et al.*, 2015).

Senyawa ini berperan penting dalam bidang kesehatan. Kandungan dari steroid banyak digunakan untuk tujuan terapeutik. Senyawa steroid banyak

diminati oleh para peneliti, bahkan telah banyak metode yang dikembangkan untuk mensintesis. Penggunaan steroid semakin berkembang, senyawa ini banyak dimanfaatkan dalam bidang farmasi (Ouali, 2015). Steroid pada alga coklat tergolong dalam kelompok senyawa fucosterol. Senyawa fucosterol mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap beberapa jenis sel tumor. Senyawa fucosterol yang terdapat pada alga coklat telah dinyatakan dapat menghambat aktivitas sel HeLa (Nursid *et al.*, 2013).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan bertujuan untuk suatu komponen atau suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan suatu bahan pelarut (solven) yang mampu memisahkan senyawa yang diinginkan. Proses pemisahan dengan cara ekstraksi terdiri dari tiga langkah yaitu proses pecampuran bahan dengan pelarut, proses pembentukan fase seimbang, dan ketiga proses pemisahan kedua fase seimbang. Pelarut yang digunakan harus sesuai dengan sifat senyawa yang akan diekstraksi agar proses ekstraksi lebih maksimal (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Prinsip dari ekstraksi adalah memisahkan komponen yang terdapat pada bahan yang akan diekstraksi dengan menggunakan pelarut tertentu. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dilakukan dengan mencampurkan bahan yang akan diekstraksi dengan pelarut yang digunakan selama waktu tertentu. Kemudian dilanjutkan dengan penyaringan bertujuan untuk memisahkan filtrat dengan residu bahan yang diekstrak (Septiana dan Asnani, 2012). Ekstraksi menggunakan metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang mudah dan sederhana dengan hasil yang baik. Kelemahan dari metode ini yaitu waktu yang cukup lama dan hasil yang kurang sempurna (Sari *et al.*, 2012).

2.3.1 Etanol

Etanol merupakan pelarut yang sering digunakan, sifat dari pelarut ini adalah larut air dan pelarut organik lainnya meliputi asam asetat, aseton, benzena, karbon tetraklorida, kloroform, dietil eter, etilena glikol, gliserol, nitrometana, piridina, dan toluene. Selain larut dalam pelarut organik, etanol juga larut dalam hidrokarbon alifatik ringan seperti pentana dan heksana, dan dapat dilarutkan dengan senyawa klorida alifatik seperti trikloroetana dan tetrakloroetilena. Etanol dapat dikonsumsi oleh manusia, dimana biasanya digunakan sebagai bahan minuman beralkohol (Hendraningrat, 2013).

Pelarut etanol biasa disebut dengan etil alkohol, pelarut ini diperdagangkan dengan istilah alkohol. Etanol merupakan senyawa organik dengan rumus C_2H_5OH . Sifat dari etanol ini apabila dalam kondisi suhu kamar berwujud cair, mudah menguap, mudah terbakar, dan tidak berwarna (Munawaroh dan Prima, 2010). Sifat fisika dan kimia etanol dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat fisika dan kimia Etanol

Karakteristik	Syarat
Rumus molekul	C_2H_5OH
Massa molekul relative	46, 07 g/ml
Titik leleh	-114, 3°C
Titik didih	78, 32 °C
Densitas pada 20°C	0, 7893 g/cm ³
Kelarutan dalam air 20 °C	Sangat larut
Viskositas pada 20 °C	1,17 cP
Kalor spesifik pada 20 °C	0, 579 kal/g °C

2.3.2 Etil asetat

Etil asetat merupakan pelarut bersifat polar, apabila pelarut ini digunakan pada saat ekstraksi senyawa yang bersifat polar menengah akan larut. Pelarut ini

merupakan senyawa organik yang mempunyai rumus kimia $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$. Etil asetat yaitu senyawa yang tergolong ester dari etanol dan asam asetat. Sifat dari pelarut ini adalah berbentuk cair, tidak berwarna, mempunyai aroma khas, karena pelarut ini bersifat polar menengah maka mudah menguap, tidak beracun dan tidak higroskopis (Kumala, 2013).

Pelarut etil asetat tergolong senyawa yang dihasilkan dari pertukaran gugus hidroksil pada asam karboksilat dengan gugus hidrokarbon yang terdapat pada etanol. Mensintesis etil asetat biasa menggunakan katalisator cair berupa asam sulfat. Penggunaan katalisator asam sulfat dapat menghasilkan konversi yang cukup tinggi yaitu dapat mencapai 98% kemurniannya (Nuryoto, 2008).

2.3.3 N-Heksan

Heksana merupakan senyawa hidrokarbon alkana, rumus kimia dari senyawa ini adalah C_6H_{14} isomer utama n-heksana memiliki rumus $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$. Penamaan senyawa ini diawali dengan *heks-* mengacu pada struktur yang mengandung enam karbon atom pada heksana. Akhiran *-ana* berasal dari *alkana* yang mengacu pada ikatan tunggal penghubung antara atom-atom karbon tersebut. Sifat dari n-heksan adalah non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010). Sifat fisika dan kimia N-Heksan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat fisika dan kimia N-Heksan

Karakteristik	Syarat
Bobot Molekul	86, 2 g/mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-95°C
Titik didih	69°C (pada 1 atm)
Densitas	0, 6603 g/ml pada 20°C

2.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji yang dilakukan untuk menentukan ciri-ciri senyawa aktif, dimana senyawa ini memiliki efek racun atau efek yang bermanfaat apabila ekstrak diuji secara biologis (bioassay). Menurut Harborne (1984) uji fitokimia meliputi berbagai macam senyawa organik yang terbentuk dan tersimpan didalam suatu organisme. Struktur kimia, biosintesis, perubahan, metabolisme serta fungsi biologisnya dari senyawa organik tersebut terjadi secara alamiah.

Pengujian ini dilakukan juga untuk mengetahui kandungan etabolit sekunder dari suatu organisme. Para peneliti yang telah melakukan uji fitokimia mengungkapkan bahwa terdapat tingginya keragaman dari metabolit sekunder yang berasal dari tanaman. Kergaman yang ditemukan terdiri dari 21.000 alkaloid, 700 asam amino, 200 glukosida cyanogenic dan glucosinolates, 20.000 terpenoid, 10.000 polifenol, 1.500 polyacetyletes dan asam lemak (Wink, 2013).

2.5 Uji Toksisitas

Toksisitas merupakan uji yang bersifat relatif yang biasanya dilakukan untuk membandingkan suatu senyawa dengan senyawa lain dengan memberikan suatu efek bahaya atas jaringan biologis tertentu pada makhluk uji yang digunakan. Uji Toksisitas yaitu salah satu cara untuk menentukan kemampuan racun (molekul) pada senyawa bioaktif untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadap racun tersebut (Soemirat, 2005).

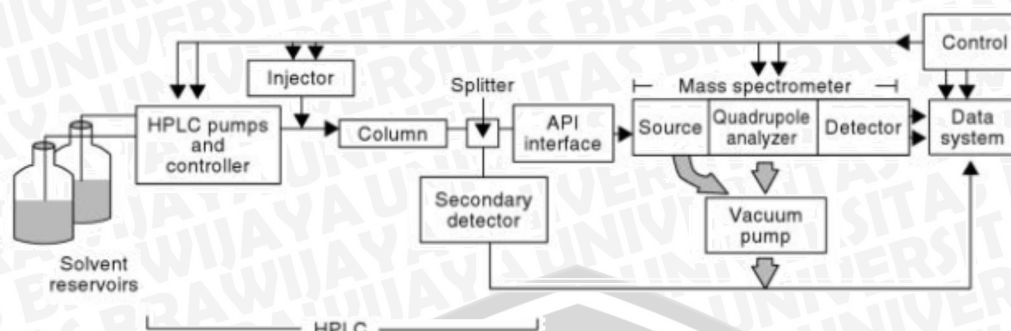
Uji toksisitas biasanya menggunakan bahan uji larva udang *artemia salina*. Menggunakan bahan uji ini karena dianggap memiliki korelasi dengan sitosik senyawa-senyawa antikanker. Nilai toksisitas dapat diketahui dengan jumlah kematian larva udang pada konsentrasi tertentu (Indrayani *et al.*, 2006).

2.6 *Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry*

Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS untuk penelitian bio-analisis dimulai pada akhir 1980-an (Bowers, 1989). Menurut Vogeser dan Christoph (2008), Kelebihan dari alat ini adalah

1. Hasil yang diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor lebih spesifik.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem lebih praktis. Alat ini tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
3. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas tinggi dan waktu yang singkat.
4. Sejumlah data kualitatif dan kuantitatif dapat diperoleh karena seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

Pada dasarnya sistem LC-MS gabungan antara sistem pompa HPLC, injeksi, kolom dan diteruskan pada spektrometer massa dengan rekasi ionisasi. Sistem pengontrol dari seluruh komponen sistem menggunakan komputer. Komputer dapat mengontrol spektrometer massa pada saat menscan jarak dan alat, mengakses, dan memproses data ion dari sistem pendeteksi ion (McMaster, 2005). Model sistem LC-MS dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Model sistem LC-MS

2.7 Kanker

Kanker adalah kata berasal dari bahasa latin yang artinya kepiting, berhubungan dengan sifat dari kanker yang menginfiltrasi jaringan disekitarnya. Ilmu yang mempelajari tentang penyakit tumor ini disenut dengan istilah “Cancerologi” atau lebih populer disebut dengan Onkologi. Tetapi dalam prakteknya dalam dunia kedokteran yang dipelajari dari penyakit ini hanya tumor-tumor ganas saja. Tumor ganas terdiri dari sel-sel kanker yang menunjukkan perkembangan yang tidak terkendali dan mengganggu fungsi dari jaringan normal disekitarnya (Koestedjo dan Soemartono, 1982).

Kanker salah satu penyakit yang sering menyebabkan kematian diseluruh dunia. Menurut organisasi kesehatan dunia (WHO) melaporkan dari tahun 2012, jumlah kasus kanker telah meningkat. Hingga saat ini kematian yang diakibatkan kanker meningkat hingga mencapai 13 juta per tahun (Marudhupandi *et al.*, 2015). Sedangkan di Indonesia kanker merupakan penyakit yang sangat mematikan nomor 7 (5,7%) setelah stroke, tuberkulosis, hipertensi, dan *diabetes militus* (Pangaribowo, 2014).

Epitel yang terus berkembang merupakan salah satu faktor terbentuknya sel kanker. Perubahan genetik yang multiple sangat mungkin terjadi pada saat sel berkembang. Perubahan menjadi ganas juga melibatkan gen-gen yang mengatur pertumbuhan sel. Perkembangan menjadi kanker didalam tubuh

melalui tiga tahap yaitu, tahap 1 disebut dengan tahap inisiasi. Pada tahap ini terjadi perubahan irreversibel pada genetik. Tahap 2 disebut dengan promosi. Dalam tahap ini diperlukan pengaruh promotor dan bersifat reversibel. Tahap 3 disebut dengan tahap progresif. Terjadi pertumbuhan sel tumor dan dapat menyebar (Ramli *et al.*, 2000).

Organ tubuh yang biasanya terserang oleh kanker antara lain paru-paru, payudara, dan sistem reproduksi (uterus, serviks, ovarium pada wanita, dan prostat pada pria), usus besar (kolon dan rektum), lambung, kulit, kelenjar getah bening, hati, otak, darah, dan rongga mulut. Pada gejala utama kanker tandanya tidak spesifik. Tanda pada gejala kanker pada fase pertama atau stadium dini seringkali tidak menunjukkan gejala klinis apapun. Fase ini disebut dengan fase "fase hening" (Wijayakusuma, 2005).

2.8 Sel HeLa

Sel HeLa merupakan *cell line* yang tumbuh sebagai sel yang semi melekat. Sel HeLa diturunkan dari sel epitel kanker serviks manusia. Sel ini pertama kali diisolasi pada tahun 1951 dari seorang wanita bernama Henrietta Lacks. Pada saat isolasi, sel kanker mencerminkan terjadinya kekacauan siklus sel. Sel kanker melakukan kekacauan pada sembarang titik dalam siklus. Disamping itu sel ini dapat membelah secara tidak terbatas pada saat sel diberi pasokan nutrisi secara terus menerus, sel ini akan menjadi abadi (Campbell *et al.*, 2002).

Sel HeLa dapat tumbuh akibat terjadi infeksi terhadap sel tumor oleh Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga memiliki sifat yang berbeda dengan sel tumor pada dinding leher rahim yang normal. Sel HeLa yang telah terinfeksi oleh HPV diketahui dapat menghasilkan 2 onkogen yaitu E6 dan E7. Kedua onkogen ini diketahui dapat mengakibatkan imortal pada kultur primer keratinosit

manusia, sedangkan sel yang imortal tidak dapat bersifat tumorigenik, sehingga proses genetik dalam tubuh terjadi (Prasasti,2013).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Di dalam media yang digunakan mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan sel, meliputi asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Pada media ditambahkan serum yang mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel, dan mineral yang berfungsi kofaktor enzim (Freshney, 1986)



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga coklat *Sargassum echinocarpum* didapatkan dari perairan talangu, madura. Bahan ekstraksi yang digunakan adalah pelarut etanol, etil asetat, n-heksan dan kertas *whatman*. Setelah didapat hasil ekstraksi dilakukan pengujian fitokimia bioaktif dan uji toksisitas. Dalam pengujian fitokimia menggunakan bahan amoniak, asam sulfat 2 N, kloroform, pereaksi Meyer, Wegner, Dragendorf etanol 70%, etanol, 96%, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat. Dalam pengujian toksisitas menggunakan bahan artemia dan air laut. Dalam pengujian viabilitas sel HeLa bahan yang digunakan adalah sel HeLa yang dikultur didapatkan dari laboratorium biomedik fakultas kedokteran Brawijaya, media *Medium Complete* (MC) sebagai media kultur sel HeLa, dan kemudian sel HeLa disubkultur dengan menggunakan media *Trypsin* EDTA dan pada tahap pewarnaan sel HeLa menggunakan *trypan blue*.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah oven, *Rotary evaporator*, labu evaporator, timbangan, gelas ukur, erlenmayer, corong, *magnetic stierer*, *hotplate*. Dalam pengujian fitokimia menggunakan alat tabung reaksi, *beaker glass* 100 ml, pipet tetes, dan timbangan analitik. Dalam pengujian toksisitas menggunakan alat *beaker glass* 50 ml, toples, aerator, dan selang aerator. Proses subkultur sel HeLa menggunakan alat *Laminar air-flow*, *falcon*, inkubator dan tabung gas CO₂, *Syringe*, *Inverted microscope*, filter 0,2 µm, sumuran, *cover glass* yang dipatahkan, *sentrfuge*, *disposable pippete*. Proses pengecatan menggunakan *pippete*, *cover glass*, *microscope*.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperiman. Penelitian eksperiman merupakan metode yang cukup kuat untuk mengungkapkan hubungan antara sebab dan akibat (Budiarto dan Dewi, 2003). Menurut Darmono *et al.* (2002), kajian eksperiman adalah kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Penelitian yang menggunakan pendekatan empiris sebenarnya cukup ringkas dan jelas. Dalam penelitian tersebut bisa menggunakan lebih dari 1 hipotesis kemudian mengumpulkan data, menggunakan tes statistik untuk menguji hipotesis, menulis hasil, menyimpulkan dan menyarankan pada peneliti lain untuk memperluas hasil penelitian. Ditambahkan oleh Nazir (1988), percobaan eksperimen bertujuan untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta berapa besar hubungan tersebut dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyelidiki kontrol untuk pembandingan.

3.2.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan hubungan antara dua variabel. Kedua variabel yang digunakan dalam penelitian eksperiman yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Dalam penelitian eksperiman dimana variabel bebas dimasukkan ke dalam suatu lingkungan yang terkontrol dan hasilnya diukur. Hasil atau respons dari variabel bebas adalah variabel terikat. Perubahan pada variabel terikat dianggap disebabkan oleh faktor pada variabel bebas (Brink dan Marilyn, 2000).

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan yang digunakan. Perlakuaannya yaitu perbedaan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi senyawa bioaktif dari alga coklat *Sargassum echinocarpum*. Pelarut yang

digunakan adalah ethanol, etil asetat dan n-heksan. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah parameter uji yang diamati, yaitu pengaruh terhadap viabilitas sel hela dengan pemberian ekstrak dari alga coklat *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut yang berbeda.

Berdasarkan perlakuan, penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Dimana dalam penelitian ini menggunakan 2 faktor dengan pelarut berbeda yang terdiri dari etanol, etil asetat, dan n-heksan sebagai faktor A dan penggunaan dosis yang berbeda sebagai faktor B, serta menggunakan ulangan sebanyak 3 kali. Hubungan antara perlakuan dan ulangan yang digunakan adalah $(t - 1) (r - 1) \geq 15$. Rancangan percobaan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan percobaan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A 5	A 5(1)	A 5(2)	A 5(3)
A 10	A 10(1)	A 10(2)	A 10(3)
A 15	A 15(1)	A 15(2)	A 15(3)
A 20	A 20(1)	A 20(2)	A 20(3)
B 5	B 5(1)	B 5(2)	B 5(3)
B 10	B 10(1)	B 10(2)	B 10(3)
B 15	B 15(1)	B 15(2)	B 15(3)
B 20	B 20(1)	B 20(2)	B 20(3)
C 5	C 5(1)	C 5(2)	C 5(3)
C 10	C 10(1)	C 10(2)	C 10(3)
C 15	C 15(1)	C 15(2)	C 15(3)
C 20	C 20(1)	C 20(2)	C 20(3)

Keterangan

- A : pelarut n-heksan
- B : pelarut etil asetat
- C : pelarut etanol
- 5 : dosis 5 ppm
- 10 : dosis 10 ppm
- 15 : dosis 15 ppm
- 20 : dosis 20 ppm

Metode analisis yang digunakan adalah analisis keragaman yang meikuti bentuk sebagai berikut:



$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

Y_{ijk} : Hasil pengamatan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-i, faktor perbedaan dosis taraf ke-j, pada ulangan ke-k

μ : nilai tengah umum

α_i : pengaruh taraf ke-i dari faktor jenis pelarut

β_j : pengaruh taraf ke-j dari faktor perbedaan dosis

$(\alpha\beta)_{ij}$: pengaruh interaksi taraf ke-i dari faktor jenis pelarut dan taraf ke-j dari faktor perbedaan peplarut

E_{ijk} : galat percobaan taraf ke-i dari faktor jenis pelarut dan taraf ke-j dari faktor perbedaan dosis pada ulangan yang ke-k

Hasil penelitian ini kemudian dilakukan pengujian normalitas dengan menggunakan analysis data Ms. Office Excel untuk mengetahui nilai F, dan kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA. Jika hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan pada taraf 5% maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

3.2.2 Prosedur Penelitian

a. Proses Pengeringan

Proses pengeringan dilakukan setelah melalui proses pencucian dengan air mengalir agar bahan alga coklat terhindar dari kotoran. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan sinar matahari secara langsung selama 3 hari agar kadar airnya benar-benar berkurang. Kemudian alga coklat *Sargassum echinocarpum* yang telah kering digiling menggunakan alat penggiling yaitu blander dan disaring menggunakan ayakan ukuran 60 mesh bertujuan untuk mempermudah dalam ekstraksi bioaktif dari alga coklat ini. Dewi *et al.* (2012), menyatakan ukuran partikel dalam ekstraksi dengan metode maserasi semakin kecil, maka kandungan yang terekstrak akan semakin banyak.

b. Ekstraksi

Serbuk dari *Sargassum echinocarpum* yang telah dihasilkan diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi bertingkat. Pelarut yang digunakan dalam proses ini adalah etanol, etil asetat, dan n-heksan. Ekstraksi dilakukan sebelum dilakukannya uji fitokimia dan toksisitas. Ekstraksi dapat diartikan

sebagai cara untuk memisahkan campuran beberapa zat menjadi komponen-komponen yang terpisah (Winarno, 1988). Prinsip dari ekstraksi menggunakan pelarut yaitu memisahkan komponen yang ada pada bahan dengan menggunakan pelarut tertentu. Sehingga bahan yang akan diekstrak didapat dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan sifat kepolaran dari bahan (Septiana dan Ari, 2012).

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan cara bertingkat dari pelarut non polar ke polar. Ekstraksi diawali dengan perendaman serbuk *Sargassum echinocarpum* menggunakan pelarut n-heksan yang bersifat non polar. Kemudian dilanjutkan dengan dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar pada residu yang dihasilkan dari ekstraksi dengan n-heksan, kemudian residu dari ekstraksi etil asetat diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol yang bersifat polar. Proses ekstraksi bahan dapat dilihat pada Lampiran 1.

Perbandingan antara serbuk *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut yang digunakan adalah 1:4. Ekstraksi dilakukan dengan mengaduk sampel yang direndam menggunakan *magnetik stierer* 250 rpm selama 1x24 jam pada suhu ruang. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring whatman sehingga dihasilkan filtrat dan residu. Filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak alga coklat *Sargassum echinocarpum*.

Tahap selanjutnya yaitu uji fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui kandungan biokatif dalam ekstrak *Sargassum echinocarpum*. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid/triterpenoid. Uji toksisitas yang dilakukan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethal Test*) dimana hewan uji yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina*. Kemudian dilakukan uji viabilitas Sel HeLa.

c. Uji Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan untuk mengetahui kandungan bioaktif pada bahan yang akan diuji. Pada penelitian ini uji fitokimia yang dilakukan antara lain uji flavonoid, uji alkaloid, dan uji steroid. Proses skrining fitokimia dapat dilihat pada Lampiran 2.

1) Uji alkaloid (Harborne, 1984 dan Nafisah *et al.* 2014)

Ekstrak dari *Sargassum echinocarpumi* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 1 ml dan ditambahkan 1 ml kloroform dan 1 ml amoniak. Kemudian larutan dibagi menjadi 3 tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes asam sulfat (H_2SO_4) 2N. Kemudian dikocok dan didiamkan, kemudian dari tabung reaksi pertama ditambahkan reagen Dragendorff, tabung kedua ditambahkan reagen Mayer, dan tabung ketiga ditambahkan reagen Wegner. Dari tiap reagen yang ditambahkan masing-masing sebanyak 2-3 tetes. Apabila terbentuk endapan yang sesuai dengan ketentuan dari tiap reagen, maka sampel mengandung senyawa alkaloid.

2) Flavonoid (Nafisah *et al.* 2014 dan Sangi *et al.* 2008)

Ekstrak dari *Sargassum echinocarpum* diambil sebanyak ± 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, HCl pekat dan etanol sebanyak 2 ml. Kemudian dikocok, apabila terbentuk warna jingga sampai merah, sampel menunjukkan adanya flavonoid.

3) Saponin (Harborne, 1984)

Ekstrak dari *Sargassum echinocarpum* diambil ± 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 1 ml aquades lalu dikocok. Didiamkan, dan kemudian ditambahkan dengan HCl sebanyak 3 tetes. Apabila terbentuk busa stabil kurang dari 10 menit, maka sampel mengandung senyawa saponin.

4) Tanin (Harborne, 1984)

Ekstrak dari *Sargassum echinocarpum* diambil \pm 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Apabila terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman, menunjukkan sampel positif mengandung senyawa tanin.

5) Uji steroid/triterpenoid (Nafisah *et al.* 2014 dan Sangi *et al.* 2008)

Ekstrak dari *Sargassum echinocarpum* dimasukan kedalam tabung reaksi sebanyak \pm 1 ml, kemudian ditambahkan dengan kloroform sebanyak 3 ml atau etanol 70% 3ml. Kemudian ditambahkan dengan asam sulfat pekat sebanyak 2 ml, selanjutnya ditambahkan lagi dengan asam anhidrat sebanyak 2 ml, kemudian dikocok. Perubahan warna yang terjadi pada uji ini yaitu apabila mengandung triterpenoid akan terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan kedua pelarut dan apabila mengandung senyawa steroid akan terbentuk warna hijau kebiruan.

d. Uji Toksisitas (modifikasi Martiningsih, 2013)

Uji toksisitas dilakkukan dengan menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina*. Proses uji ini diawali dengan penyiapan hewan uji yaitu *Artemia salina* dengan cara menimbang telur *Artemia salina* sebanyak 1 g. Kemudian telur direndam selama 48 jam dalam air laut sebanyak 2 liter dan diaerasi. Setelah 48 jam telur menetas menjadi *nauplii instar* III/IV yang siap digunakan sebagai hewan uji. Kemudian dilakukan uji toksisitas dengan menggunakan larutan uji pada konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 1000 ppm. Wadah yang digunakan adalah botol vial dan ditambahkan air alut hingga volume 5 ml. Kemudian pada setiap konsentrasi dimasukkan 10 ekor larva udang. Kemudian pengamatan jumlah larva udang yang mati dilakukan setiap selang jam ke-6 selama 24 jam. Proses uji toksisitas dapat dilihat pada Lampiran 3.

e. **Uji Viabilitas Sel HeLa (modifikasi Djajanegara dan Wahyudi, 2011)**

Uji viabilitas sel HeLa dimulai dengan proses *thawing freezing* HeLa kemudian proses subkultur dan diakhiri dengan proses perhitungan jumlah sel yang mati dan hidup.

- *Thawing Freezing HeLa*

Proses *thawing* diawali dengan proses penurunan suhu penyimpanan dengan merendam atau mengalirkan air pada suatu benda. *Thawing* dalam proses ini bertujuan untuk menurunkan suhu HeLa agar bisa dikultur. Sel HeLa diambil dari Freezer dengan suhu -80°C dan kemudian dithawing hingga suhu mencapai suhu 37°C . Setelah sel mencapai suhu 37°C maka ditambahkan *medium complete* (MC) sampai 10x. Kemudian sel yang telah ditambahkan MC disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit bertujuan untuk mengendapkan sel HeLa. Sel yang didapat kemudian dimasukkan kedalam *flask* kultur dan dimasukkan kedalam inkubator bersuhu 37°C dan suasana CO_2 sebanyak 5%. Penggunaan suhu sesuai dengan suhu tubuh agar sel dapat tumbuh dengan maksimal dan kondisi CO_2 sebanyak 5% untuk menjaga kondisi pH sel agar sesuai dengan media. Menggunakan media MC bertujuan agar nutrisi sel tercukupi dan media MC diganti setiap 2-3 hari agar sel dapat berkembang biak dengan maksimal. Kemudian sel dalam *flask* kultur mencapai 80-90% konfluen, sel disubkultur kedalam *plate* kultur 96 *well*. Proses *thawing freezing* dapat dilihat pada Lampiran 4.

- Subkultur HeLa

Pada proses subkultur diawali dengan pengambilan media MC dari *plate* menggunakan mikropipet hingga tersisa endapan putih didasar *plate* yang disebut pellet. Pellet merupakan sel HeLa yang akan disubkultur. Setelah media MC diambil maka ditambahkan tripsin EDTA sebanyak 3 ml dan diinkubasi pada

suhu 37°C selama 5-10 menit yang bertujuan untuk merontokkan sel yang sebelumnya mengendap pada dasat *plate*. Kemudian tripsin EDTA yang telah digunakan diambil dari *plate* hingga tersisa hanya pellet. Kemudian pellet dimasukkan kedalam *flask* dan ditambahkan kembali MC sebanyak 3-5 ml. Penambahan MC dilakukan untuk menghilangkan sisa-sisa enzim tripsin EDTA dari dinding *flask*. Selanjutnya sel dan MC disentrifuge suhu ruang dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit untuk mengendapkan sel.

Langkah selanjutnya dilakukan pewarnaan sel dengan *trypan blue* untuk membedakan sel yang mati dan hidup. Pertama diambil 10 µl media dan sel dari *flask* dan kemudian ditambahkan *trypan blue* sebanyak 10 µl. Kemudian dicampurkan media *trypan blue* dengan sel hingga merata, lalu diambil sebanyak 20 µl dengan menggunakan mikropipet. Kemudian diletakkan diatas *heamacytometer* dengan keadaan ditutup dengan *cover glass* dan diamati dengan mikroskop perbesaran 200x. Perhitungan sel pada 2 bilik hitung yang masing-masing selebar 16 kotak persegi. Kemudian mengambil jumlah rata-rata dari kedua bilik lalu dikalikan dengan kapasitas *heamacytometer* per ml (10⁴ sel/ml) dan faktor pengenceran. Proses subkultur dapat dilihat pada Lampiran 4. Menurut Djajanegara dan Wahyudi (2009), rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\frac{n}{2} \times 10^4 \text{ sel/ml} \times P$$

Keterangan:

- n : jumlah sel dari dua bilik
- 2 : jumlah bilik *heamacytometer* yang dihitung
- 10⁴ : kapasitas *heamacytometer* (sel/ml)
- P : faktor pengencer (1)

Persentase kematian sel dengan metode perhitungan langsung dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\%Viabilitas = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{jumlah sel hidup+mati}} \times 100\%$$

$$\%kematian = 100\% - \%viabilitas$$

f. **Uji Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry (Modifikasi**

Lisdiawati, et al., 2007)

Uji LC-MS dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi ekstrak *Sargassum echinocarpum*. Pada penelitian ini uji LC-MS menggunakan metode dari Lisdiawati, et al., (2007) yang dimodifikasi oleh LIPI (2015). Langkah identifikasi ekstrak *Sargassum echinocarpum* dilakukan dengan cara 0, mg ekstrak dalrutkan dalam 0,8 mL metanol 95% dengan 0,3% asam asetat. Kemudian, sebanyak 0,2 µL campuran tersebut disuntikkan pada instrumen LC-MS dengan laju alir 0,1 mL/menit serta dilakukan proses pompa selama 10-15 menit yang dialirkan kepada katup kolom *selector*. Maka akan terjadi pemisahan menuju UV *detector*. Setelah pemisahan selesai, maka berat molekul akan terukur oleh spektrometer massa. Analisis dilakukan menggunakan mode ion positif. Sistem spektrometer massa yang digunakan adalah ESI-MS karena dapat bekerja dengan baik untuk senyawa polar. Sehingga golongan senyawa-senyawa yang terkandung pada ekstrak *Sargassum echinocarpum* akan terdeteksi. Hasil deteksi ditampilkan dalam bentuk puncak dengan beberapa waktu retensi yang berbeda-beda. Luas area dari setiap puncak yang muncul dapat menggambarkan senyawa yang dominan pada ekstrak *Sargassum echinocarpum*. Pada puncak yang dihasilkan terdiri dari beberapa spektra yang disertai dengan berat molekul senyawa yang diduga pada sampel. Skema kerja uji LC-MS dapat dilihat pada Lampiran 5.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum*

Hasil ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* didapat dari proses ekstraksi. Metode yang digunakan untuk ekstraksi yaitu maserasi bertingkat menggunakan tiga pelarut. Pelarut yang digunakan mulai yang bersifat non polar (n-heksan) kemudian semi polar (etil asetat) hingga polar (etanol). Perbandingan bahan dengan pelarut yang digunakan yaitu 1:4. Serbuk *Sargassum echinocarpum* yang digunakan sebanyak 150 g direndam dengan 600 ml pelarut.

Ekstrak yang dihasilkan dari masing-masing pelarut dipekatkan dengan *rotary evaporator* selama 24 jam. Hal ini dilakukan bertujuan memisahkan ekstrak kasar dengan pelarut yang digunakan. Menurut Sundaryono (2011), dalam penelitian yang dilakukan serbuk yang telah dimaserasi selama 24 jam dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga volumenya mencapai sepertiga. Ekstrak yang telah dihasilkan lebih dipekatkan lagi dengan menggunakan gas N₂. Hasil dari ekstraksi ditimbang untuk mengetahui nilai rendemen yang didapat dari masing-masing pelarut. Hasil rendemen yang digunakan adalah nilai dari rata-rata 3 kali ulangan. Hasil persentasi rendemen dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data rendemen ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum*

Perlakuan	Rendemen (%)			Rerata
	ulangan 1	ulangan 2	ulangan 3	
A	0,053	0,057	0,043	0,051±0,007 ^a
B	0,134	0,147	0,179	0,153±0,023 ^b
C	0,218	0,207	0,232	0,219±0,043 ^c

Keterangan:

- A : Pelarut N-heksan
- B : Pelarut etil asetat
- C : Pelarut etanol

Dari hasil yang didapat dilakukan analisis dengan menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*). Berdasarkan hasil perhitungan analisis keragaman ANOVA, berdasarkan penggunaan pelarut yang berbeda terhadap hasil ekstrak didapatkan nilai F hitung lebih besar daripada F tabel dalam taraf kepercayaan 5%. Berdasarkan hasil notasi yang didapatkan, perlakuan A dimana ekstraksi menggunakan pelarut n-heksan berbeda nyata dengan perlakuan B yaitu ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat, sedangkan perlakuan A dan perlakuan B berbeda nyata dengan perlakuan C yaitu ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol.

Hasil ekstraksi dari masing-masing pelarut yang berbeda didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan C. Hal ini disebabkan bioaktif yang terkandung pada alga coklat banyak terlarut pada pelarut yang bersifat polar, sehingga rendemen yang dihasilkan lebih banyak. Hasil rendemen yang berbeda dari masing-masing pelarut dapat disebabkan beberapa faktor antara lain faktor, suhu dan waktu ekstraksi, metode yang digunakan serta sifat pelarut. Sifat pelarut dapat berpengaruh penting dalam proses ekstraksi karena senyawa-senyawa biokatif yang terdapat pada bahan akan terlarut sesuai dengan sifat kepolaran. Menurut Pranoto *et al.* (2012), bahwa metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda pada pelarut yang berbeda kepolarannya. Pelarut polar misalnya dapat menarik senyawa alkaloid, komponen fenolik, karatenoid dan tannin, sedangkan pelarut semi polar misalnya etil asetat dapat menarik senyawa fenol dan terpenoid.

4.2 Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum*

Uji *Brine Shrimp Lethal Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* L. BSLT dilakukan dengan *invitro* untuk mengetahui seberapa besar efek

keracunan yang ditimbulkan ekstrak yang digunakan terhadap *Artemia salina*. Persentase kematian yang didapatkan masing-masing diubah menjadi angka probit dan didapatkan persamaan garis $y=bx+a$. Data kematian yang didapatkan dari hasil uji *Artemia salina* dapat dilihat pada Tabel 5. Persamaan regresi yang didapatkan dapat dilihat pada Lampiran 6.

Tabel 5. Data hasil uji BSLT

perlakuan	Konsentrasi (ppm)						Hasil LC ₅₀ (ppm)
	0	50	100	150	200	1000	
A	0	1	2	5	6	8	226,98
B	0	2	4	5	8	10	116,57
C	0	3	5	7	9	10	74,58

Berdasarkan persamaan regresi didapatkan nilai LC₅₀ pada ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol secara berturut-turut sebesar 226,98 ppm, 116,57 ppm, dan 74,58 ppm. Hasil ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* tergolong bersifat toksik dikarenakan nilai LC₅₀ yang dihasilkan masih <1000 ppm sesuai dengan pernyataan dari Albuntana *et al.* (2011) bahwasannya suatu ekstrak dikatakan bersifat aktif toksisitas apabila nilai LC₅₀ yang diperoleh $\leq 1000 \mu\text{g/ml}$.

Tingkat ketoksitas ditentukan berdasarkan pada nilai LC₅₀ yang didapatkan. Suatu bahan dikatakan sangat toksik apabila nilai LC₅₀ < 30 $\mu\text{g/ml}$, dikatakan toksik apabila nilai LC₅₀ berkisar antara 30-1000 $\mu\text{g/ml}$, dan dikatakan tidak toksis apabila nilai LC₅₀ > 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Mayer *et al.*, 2007).

Pada penelitian sebelumnya ekstrak alga coklat *Sargassum polycystum* memiliki efek toksitas cukup tinggi pada *Artemia salina*. Kategori toksitas pada *Sargassum polycystum* tergolong toksik kronik pada pengamatan selama 24 jam dengan nilai LC₅₀ 170 ppm (Riyanto *et al.*, 2013). Tetapi apabila dibandingkan

dengan hasil ekstraksi *Sargassum echinocarpum* menggunakan pelarut etil asetat dan etanol, ekstrak laga coklat *Sargassum polycystum* kurang toksik.

4.3 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum*

Fitokimia merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan. Pengujian skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada *Sargassum echinocarpum*. Menurut Marlinda *et al.* (2012), uji skrining fitokimia merupakan suatu tahap seleksi awal yang dilakukan untuk mendeteksi golongan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan. Skrining fitokimia meliputi uji alkaloid, uji triterpenoid dan steroid, uji tanin, uji flavonoid dan uji saponin. Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia hasil maserari dari masing-masing pelarut yang digunakan. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Data hasil fitokimia ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum*

Golongan senyawa bioaktif	perlakuan			Keterangan
	A (n-heksan)	B (etil asetat)	C (etanol)	
Alkaloid				(+) terbentuk endapan putih
-Reagen Mayer	+	-	+	
-Reagen Wagner	-	-	-	(+) terbentuk endapan coklat
-Reagen Dragendorff	-	-	+	(+) terbentuk endapan jingga
Flavonoid	-	+	+	(+) terbentuk warna merah, jingga, kuning
Saponin	-	-	-	(+) terbentuk busa
Tanin	-	-	+	(+) hijau kehitaman atau biru tua
Triterpenoid	-	-	-	(+) terbentuk warna merah atau ungu
Steroid	+	+	+	(+) terbentuk warna hijau atau biru

Keterangan

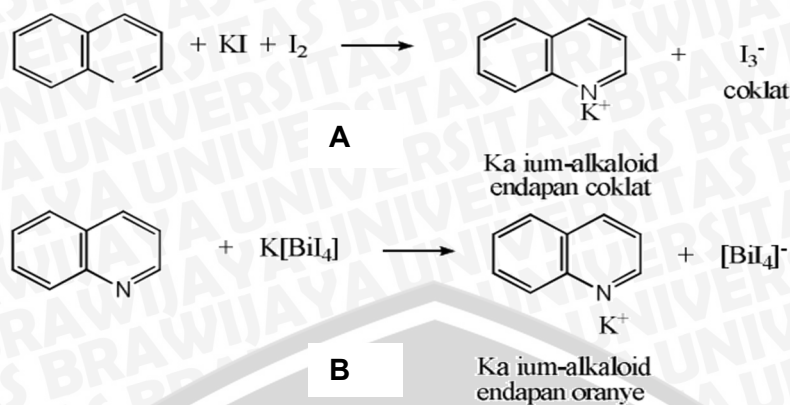
- + : mengandung senyawa atau terbentuk warna
- : tidak mengandung senyawa atau tidak terbentuk warna

Dari Tabel hasil fitokimia diatas dapat dilihat bahwa ada perbedaan antara hasil pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol. Berdasarkan data diatas metabolit sekunder yang dihasilkan oleh ekstrak pelarut etanol lebih dominan apabila dibandingkan dengan ekstrak dari pelarut etil asetat dan n-heksan. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari ekstrak pelarut etanol yaitu alkaloid dengan reagen mayer dan reagen dragendroff, flavonoid, tanin dan steroid. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari ekstrak pelarut etil asetat yaitu flavonoid dan steroid, sedangkan yang dihasilkan pada ekstrak pelarut n-heksan yaitu alkaloid dengan reagen mayer dan steroid.

Hasil yang berbeda bisa disebabkan sifat dari senyawa biokatif yang terdapat pada *Sargassum echinocarpum* bersifat polar, sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat terlarut dengan baik pada pelarut etanol. Menurut Sani *et al.* (2014), bahwa senyawa flavonoid merupakan golongan fitokimia memiliki gugus hidroksil. Maka senyawa flavonoid bersifat polar dan larut pada pelarut polar seperti etanol, metanol, aseton, air, dan lain-lain. Marimuthu *et al.* (2012), menyatakan dalam penelitiannya bahwa metabolit sekunder yang terdapat pada alga coklat *Sargassum echinocarpum* dapat larut pada pelarut yang bersifat polar. Senyawa metabolit sekunder yang larut pada pelarut polar adalah steroid, flavonoid dan fenolik. Berikut adalah penjelasan uji skrining fitokimia yang memberikan tanda positif untuk masing-masing senyawa.

a. Senyawa Alkaloid

Menurut Nafisah *et al.* (2014), pada uji alkaloid daihasilkan positif mengandung alkaloid yaitu pada reagen wagner dan dragendroff. Pada kedua reagen ini dijelaskan bahwa ion logam K^+ membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi ikatan kalium-alkaloid dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi uji alkaloid (A) reaksi kalium-alkaloid dengan reagen wagner dan (B) reaksi kalium-alkaloid dengan reagen dragendroff

b. Senyawa flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa bersifat polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil. Setelah penambahan bubuk magnesium, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hitam kemerahan. Warna hitam kemerahan diakibatkan dari reduksi oleh asam klorida pekat dan magnesium sehingga menghasilkan garam flavonoid (Harborne, 1987).

c. Senyawa tanin

Tanin dibagi menjadi dua golongan dan masing-masing golongan menghasilkan reaksi warna yang berbeda. Golongan tanin terhidrolisis akan menghasilkan warna biru kehitaman dan tanin kondensasi akan menghasilkan warna hijau kehitaman pada saat penambahan FeCl_3 . Diperkirakan FeCl_3 bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Hasil reaksi inilah yang akhirnya menimbulkan warna (Harborne, 1987).

d. Senyawa steroid

Pada pengujian steroid diperoleh hasil positif. Pada pengujian steroid dan triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Perubahan warna disebabkan adanya penambahan asam asetat anhidrat dan asam sulfat (H_2SO_4) akan berikatan dengan molekul senyawa triterpenoid atau steroid

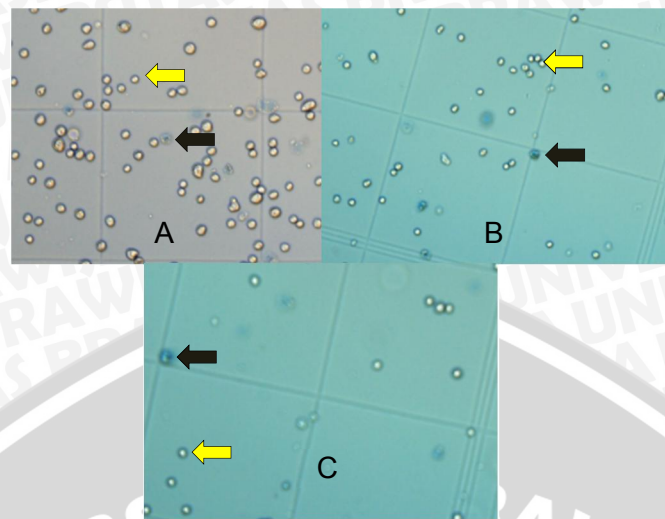
sehingga menghasilkan reaksi yang tampak pada perubahan warna (Sangi *et al.*, 2012).

4.4 Hasil Uji Pengaruh Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* terhadap sel HeLa

4.4.1 Perhitungan Sel

Dosis yang digunakan pada semua pelarut yang digunakan untuk uji viabilitas sel HeLa yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm. Pembuatan dosis diawali dengan pembuatan larutan induk ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan konsentrasi sebesar 1000 ppm. Pembuatan larutan induk membutuhkan ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 5 ml ID water sebagai media sampel. Larutan induk digunakan untuk pembuatan dosis dari 5 ppm hingga 20 ppm. Pembuatan dosis 5, 10, 15, dan 20 ppm secara berturut-turut membutuhkan larutan induk sebanyak 2,5 µl, 5 µl, 7,5 µl, dan 10 µl dilarutkan dalam 500 µl media sel. Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 8.

Hasil pengamatan sel HeLa didapatkan dari perhitungan secara langsung dengan menggunakan alat *haemocytometer* dan mikroskop. Perhitungan penjumlahan sel dapat dilihat pada Lampiran 10. Sel HeLa yang mati dan hidup pada bilik dapat dilihat pada Gambar 4 .



Gambar 4. Sel HeLa yang mati dan hidup pada bilik *haemacytometer* (perbesar 200x) (a) pelarut n-heksan dengan dosis 20 ppm (b) pelarut etil asetat dengan dosis 20 ppm dan (c) pelarut etanol dengan dosis 20 ppm

Keterangan:

- ← : Sel mati
- ← : Sel hidup

Pada Gambar 4 terlihat morfologi sel HeLa yang mati dan hidup. Keadaan sel HeLa yang mati berwarna biru kehitaman akibat pewarnaan medium *Trypan Blue* yang dapat memasuki dinding sel yang mati. Sel yang mati disebabkan oleh ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* yang mampu mengikat protein mikrotubular dan akan menghambat kemampuan mikrotubular untuk berpolimerisasi membentuk mikrotubulus, sehingga menghambat pemisahan kromosom dan proliferasi sel. Menurut Tjay dan Rahardja (2002), Zat antikanker yang dihasilkan dari tanaman, terutama produk alami seperti ekstrak mempunyai mekanisme kerja hampir sama dengan obat anti kanker golongan antimikotika yang menghambat proses mitosis pada metafase. Zat aktif yang terdapat pada ekstrak tanaman obat tersebut akan terikat pada protein mikrotubular, tepatnya tubulin pada GTP, dan akan menghambat kemampuan tubulin untuk berpolimerasi membentuk mikrotubulus sehingga menghambat pemisahan kromosom dan proliferasi.

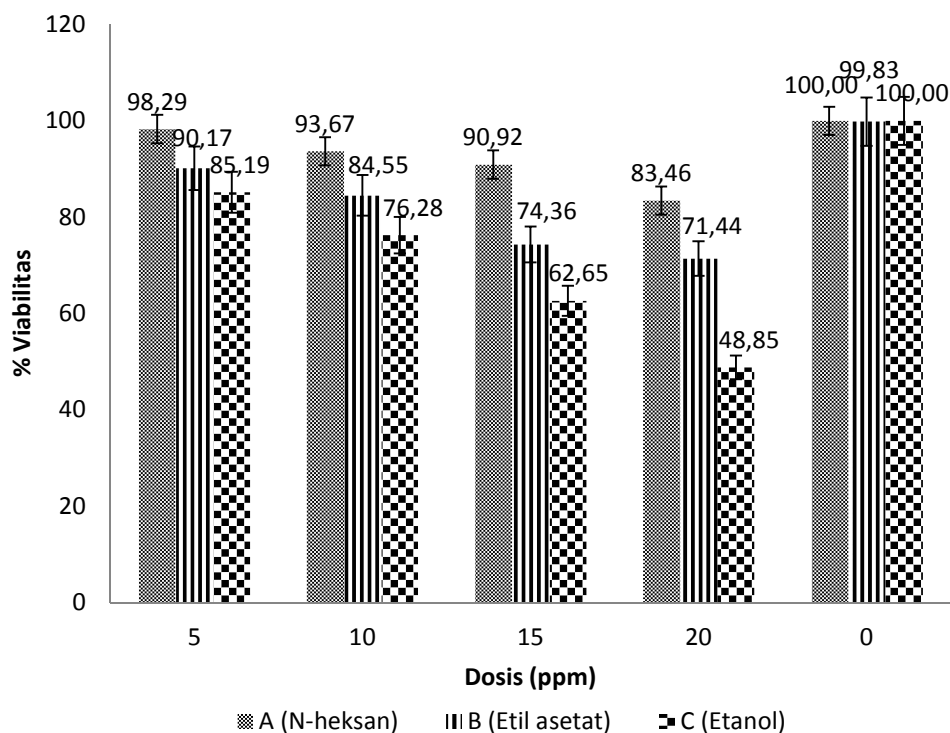
Sel yang hidup berwarna bening karena ekstrak tidak mampu mengikat protein mikrotubular pada membran sel yang dapat disebabkan oleh morfologi sel yang kuat dan dosis ekstrak. Sehingga membran sel tidak pecah dan zat *Trypan Blue* tidak dapat menembus dinding sel. Menurut Widowati dan Mudahar (2009), perhitungan sel menggunakan *haemocytometer* mudah digunakan, murah dan memberikan kesempatan secara langsung apa yang kita hitung. Penambahan *trypan blue* untuk membedakan pada saat perhitungan sel. Sel hidup dengan membran yang utuh mampu mengeksklusi *trypan blue* sehingga sel hidup tidak berwarna. Sel yang mengalami kerusakan membran akan mengambil zat warna dan berubah menjadi warna biru.

4.4.2 Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* terhadap Viabilitas Sel HeLa

Viabilitas sel merupakan pengukuran hidup atau matinya sel. Persentase viabilitas sel didapatkan dari pembagian jumlah sel yang hidup dengan total seluruh sel. Sitotoksitas yang terjadi pada sel biasanya diindikasikan dengan penurunan proliferasi sel, viabilitas sel, dan sintesis asam nukleat atau protein. Viabilitas sel bersifat segera, seperti perubahan permeabilitas membran atau gangguan pada jalur metabolisme tertentu. Oleh karena itu viabilitas sel dapat menjadi indikator sitotoksitas suatu bahan (Torneck dan Torabinejad, 1997). Hasil didapatkan dari perlakuan dua faktor yaitu jenis pelarut sebagai faktor a dan dosis sebagai faktor b.

Hasil yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*). Perhitungan uji ANOVA dapat dilihat pada Lampiran 12. Berdasarkan perhitungan analisis keragaman ANOVA, interaksi antara perbedaan pelarut dengan viabilitas sel HeLa didapatkan hasil F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Hasil dari interaksi antara dosis dengan viabilitas sel HeLa juga didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil yang didapatkan berbeda nyata. Kemudian dilanjutkan dengan uji DUNCAN untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pengaruh setiap dosis ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* berdasarkan hasil notasi yang didapatkan dari setiap perlakuan.

Dari hasil notasi yang didapatkan perlakuan C (ekstrak dengan pelarut etanol) dosis 20 ppm mendapatkan notasi a artinya berbeda nyata dengan perlakuan C dosis 15 yang mendapatkan notasi b. Perlakuan C dosis 20 dan 15 berbeda nyata dengan perlakuan C dosis 10 ppm dan perlakuan B (ekstrak dengan pelarut etil asetat) dosis 20 ppm dan 15 ppm yang mendapatkan notasi c. Perlakuan B dosis 20 dan 15 berbeda nyata dengan perlakuan C dosis 5 ppm, B 10 ppm dan A (ekstraksi dengan pelarut n-heksan) 20 ppm yang mendapatkan notasi d. Perlakuan dan dosis sebelumnya berbeda nyata dengan perlakuan B dosis 5 ppm dan perlakuan A dosis 15 ppm yang mendapatkan notasi e, dan perlakuan ini berbeda nyata dengan perlakuan A dosis 10 ppm mendapatkan notasi f. Perlakuan A dosis 10 ppm mendapatka notasi g berbeda nyata dengan perlakuan A dosis 5 ppm. Nilai rata-rata viabilitas sel HeLa yang terpapar ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil perhitungan viabilitas sel HeLa

Gambar di atas menunjukkan bahwa persentase viabilitas sel HeLa mengalami penurunan seiring penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda dan seiring dengan meningkatnya dosis yang digunakan. Pada penelitian ini didapatkan hasil rata-rata viabilitas tertinggi pada perlakuan A5 yaitu n-heksan 5 ppm dengan nilai rata-rata sebesar 98,29% dan terendah pada perlakuan C20 yaitu etanol 20 ppm dengan nilai rata-rata sebesar 48,85%. Hal ini menunjukkan pada perlakuan dengan pelarut n-heksan dan dosis 5 ppm kemungkinan hidup sel HeLa lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain, artinya aktivitas antikanker pada sel HeLa lebih rendah apabila dibandingkan dengan yang lain. Sedangkan viabilitas sel HeLa pada perlakuan dengan etanol dan dosis 20 ppm lebih rendah, artinya aktivitas antitumor pada perlakuan ini lebih tinggi. Dan apabila dibandingkan dengan kontrol negatif, ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* cukup berpengaruh terhadap viabilitas sel HeLa.

Viabilitas sel HeLa pada pelarut etanol lebih rendah disebabkan senyawa yang terkandung pada ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum*. Senyawa yang

terkandung pada alga coklat tergolong bersifat polar, sehingga pelarut etanol dapat melarutkan senyawa-senyawa yang terkandung pada alga coklat. Menurut Pratama *et al.* (2015), senyawa pada alga coklat *Sargassum duplicatum* dapat larut pada pelarut etanol. Hal ini dibuktikan pada hasil uji yang dilakukan bahwa ekstrak etanol *Sargassum duplicatum* mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid dan triterpenoid, polifenolat, dan saponin.

4.4.3 Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar *Sargassum echinocarpum* terhadap

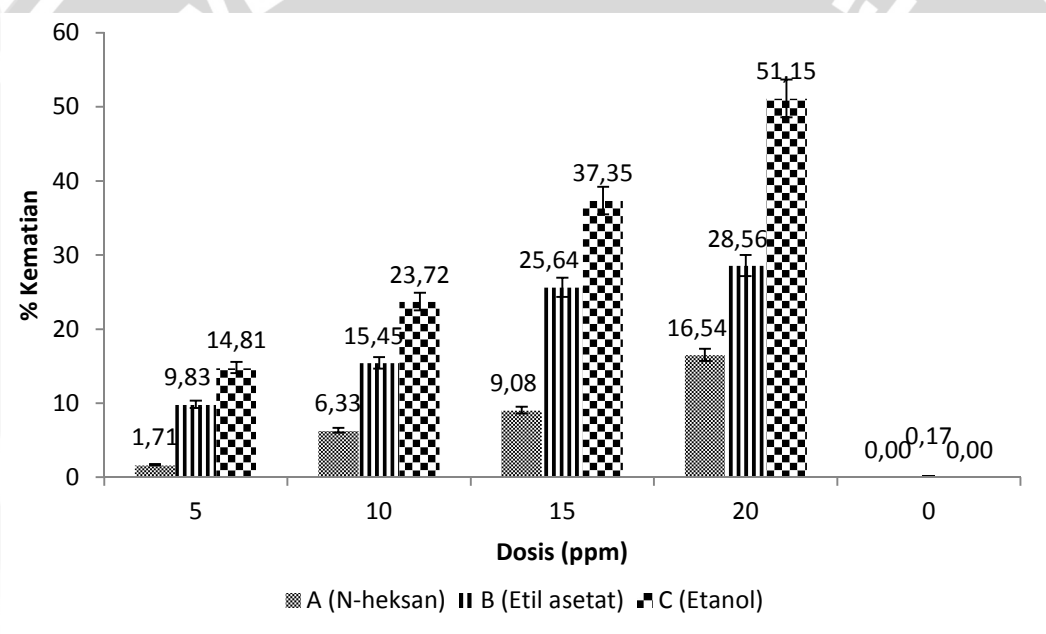
Kematian Sel HeLa

Hasil persentase kematian sel didapatkan dari pembagian jumlah sel yang mati dengan total seluruh sel. Menurut Wicaksono *et al.* (2013), Selain proliferasi, apoptosis atau kematian sel merupakan suatu program sangat penting dalam mengontrol jumlah sel.

Hasil yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan uji keragaman ANOVA (*Analysis of Variance*). Berdasarkan perhitungan analisis keragaman ANOVA, interaksi antara perbedaan pelarut dengan kematian sel HeLa didapatkan hasil F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Hasil dari interaksi antara dosis dengan kematian sel HeLa juga didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Interaksi antara dua faktor dengan kematian sel didapatkan pula hasil bahwa F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil yang didapatkan berbeda nyata. Kemudian dilanjutkan dengan uji DUNCAN untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pengaruh setiap dosis ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* berdasarkan hasil notasi yang didapatkan dari setiap perlakuan. Perhitungan uji duncan dapat dilihat pada Lampiran 14.

Dari hasil notasi yang didapatkan, perlakuan A dosis 5 ppm mendapat notasi a berbeda nyata dengan perlakuan A dengan dosis 10 dan 15 ppm yang mendapat notasi b. Perlakuan B dosis 5 ppm mendapatkan notasi c yang artinya

berbeda nyata dengan perlakuan sebelumnya. Perlakuan A dosis 20 ppm, B dosis 10 ppm dan C dosis 5 ppm mendapatkan notasi d artinya perlakuan ini berbeda nyata dengan perlakuan sebelumnya. Perlakuan sebelumnya berbeda nyata dengan perlakuan B dosis 15 ppm dan perlakuan C dosis 10 ppm karena mendapatkan notasi e. Perlakuan B dosis 20 ppm mendapatkan dosis f artinya berbeda nyata dengan perlakuan sebelumnya dan berbeda nyata dengan perlakuan C dosis 15 ppm dengan notasi g. Perlakuan C dosis 20 ppm berbeda nyata dari perlakuan yang lain karena mendapatkan notasi h. Nilai rata-rata dari perhitungan kematian sel HeLa dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil perhitungan kematian sel HeLa

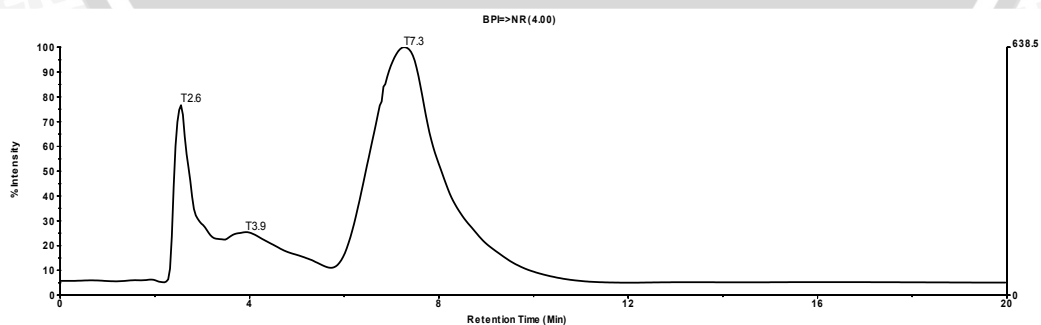
Gambar diatas menunjukkan bahwa persentase kematian sel mengalami peningkatan seiring penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda dan seiring dengan meningkatnya dosis yang digunakan. Berbanding terbalik dengan persentase viabilitas, hasil tertinggi persentase kematian sel HeLa pada perlakuan dengan pelarut etanol dan dosis 20 ppm dan terendah pada perlakuan dengan pelarut n-heksan dosis 5 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan pelarut etanol dan dosis 20 ppm lebih berpengaruh terhadap kematian

sel HeLa, artinya aktivitas antikanker pada perlakuan dengan pelarut etanol dan dosis 20 ppm lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Dan apabila dibandingkan dengan kontrol negatif pengaruh ekstrak *Sargassum echinocarpum* terhadap kematian sel HeLa cukup kuat. Menurut Costa *et al.* (2011), ekstrak *Sargassum filipendula* diujikan terhadap viabilitas sel HeLa selama 24 jam dengan konsentrasi dosis 2.0 mg/ml memiliki aktivitas proliferasi terhadap sel HeLa sebanyak 37,1%. Hasil ini apabila dibandingkan dengan ekstrak *Sargassum echinocarpum* lebih rendah. Oleh karena itu ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* kurang mampu bekerja sebagai antikanker dibandingkan dengan ekstrak *Sargassum filipendula*.

4.5 Hasil Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry

Berdasarkan hasil uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LCMS) – ESI (*Electrospray Ionisation*) ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut etanol terdeteksi memiliki puncak (peak). Senyawa-senyawa yang berhasil dapat dilihat pada waktu retensi 2.5530, 3.9146 dan 7.2564. Hasil retensi waktu kromatogram dapat dilihat pada Gambar 7.

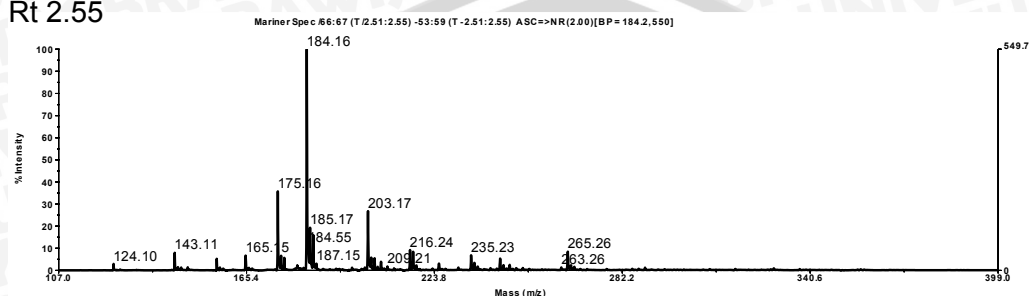
Vol injection 2 ul
Flow 0.05 ml/min
Collumn C-18 (15mm x 1 mm)
Eluent MeOH
Operating by : Puspa D N Lotulung



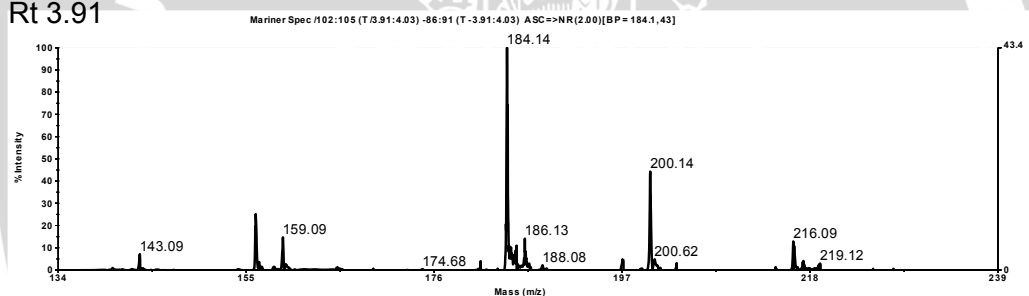
Gambar 7. Hasil retensi waktu kromatogram LC ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* pelarut etanol

Kromatogram di atas menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut etanol memiliki 3 puncak tertinggi. Berikut adalah puncak-puncak yang dihasilkan tiga waktu retensi ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan uji LC-MS ditampilkan pada Gambar 8.

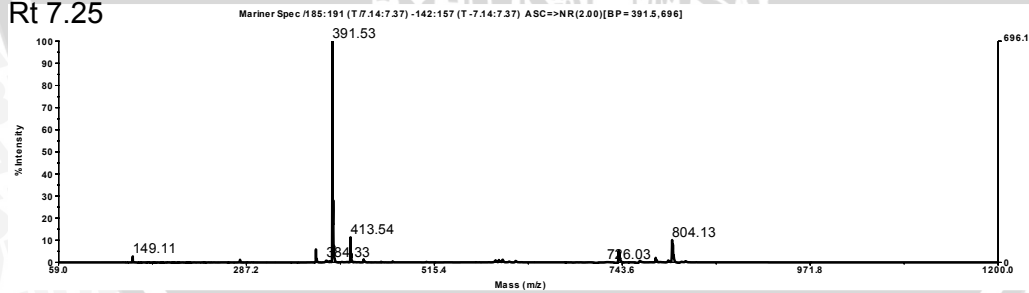
Rt 2.55



Rt 3.91



Rt 7.25



Gambar 8. Hasil analisis uji MS ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum*

Uji LC-MS ini menggunakan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol (MeOH). Ionisasi metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ atau ion muatan ganda $[M+nH]^+$. Berikut adalah dugaan senyawa yang

diduga sebagai senyawa antitumor. Senyawa yang diduga dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Dugaan senyawa antikanker ekstrak *S. echinocarpum*

Waktu Retensi	Massa Senyawa	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
2,55	185,16	<i>3,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone</i>	$C_{17}H_{14}O_5$
3.91	185,14	<i>Digoxigenin</i>	$C_{23}H_{34}O_5$
7.25	392,53	<i>1,3-Diaminopropane</i>	$C_3H_{10}N_2$

Senyawa yang terdeteksi menggunakan LC-MS dari ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* pada ketiga puncak waktu retensi adalah *3,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone*, *Harmaline*, *1,3-Diaminopropane*.

3,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone merupakan senyawa flavonol. Flavonol merupakan golongan dari senyawa flavonoid. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker (Waji dan Sugrani, 2009). Ada beberapa mekanisme flavonoid sebagai aktivitas antikanker yaitu pertama, kemampuan antioksidan dari polifenol dapat melindungi sel dari kerusakan DNA dengan membersihkan sel dari radikal bebas. Kedua, polifenol mengurangi aktivitas dari *tyrosine kinase receptors* yang berperan dalam proliferasi ganas dari sel tumor, dan ketiga polifenol menginduksi apoptosis pada sel tumor.

Dalam penelitian ini *digoxigenin* ditemukan turunan dari senyawa steroid. Gugus steroid pada *digoxigenin* yaitu *phenanthren*. Menurut Herlina *et al.* (2012) turunan dari senyawa steroid memiliki sifat sebagai antikanker. Steroid pada alga coklat tergolong dalam kelompok senyawa fucosterol. Senyawa fucosterol mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap berberapa jenis sel tumor. Senyawa fucosterol yang terdapat pada alga coklat telah dinyatakan dapat menghambat aktivitas sel HeLa (Nursid *et al.*, 2013).

Berdasarkan strukturnya *1,3-Diaminopropane* merupakan turunan dari senyawa poliamina. Secara kimiawi, poliamina merupakan senyawa organik

yang mempunyai dua atau lebih gugus amino atau $-NH_2$ (Hatta, 2013). Menurut Wink (2010) senyawa poliamina golongan senyawa alkaloid. Dari segi manfaatnya, poliamina dapat digunakan untuk penanda kanker dan penemuan obat antikanker. Ditambahkan oleh Huspa (2009), menyatakan alkaloid bekerja sebagai antikanker dengan mengikat tubulin dan menghambat pembentukan komponen mikrotubulin pada kumparan mitosis sehingga metafase berhenti.



5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian tentang pengaruh ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut yang berbeda terhadap viabilitas sel HeLa dapat disimpulkan

- Ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* dengan pelarut yang berbeda dan variasi dosis telah diketahui berpengaruh terhadap viabilitas sel HeLa. Ekstrak yang terbaik terhadap viabilitas sel HeLa yaitu ekstrak menggunakan pelarut etanol dosis 20 ppm dengan nilai sebesar 48,85%.
- Senyawa yang diduga sebagai antikanker pada ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum* yaitu 3,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone, digoxigenin, dan 1,3-Diaminopropane.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu diharapkan untuk penelitian selanjutnya dilakukan pemurnian dari ekstrak kasar *Sargassum echinocarpum*, sehingga didapatkan hasil senyawa pada *Sargassum echinocarpum* lebih murni dan pada uji aktivitas antikanker pada sel HeLa didapatkan hasil lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Aksara, R., W. J. Musa, L. Alio. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L). *Jurnal Entropi*. **8**(1):514-519.
- Albuntana. A., Yasman. W. Wardhana. 2011. Uji Toksisitas Ekstrak Empat Jenis Teripang suku Holothuriidae dari Kepulauan Penjaliran Timur, Kepulauan Seribu, Jakarta Menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *J Iltek Keltrop* **3**(3):65-72.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati, S. Budiyanto. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB: Bandung. Hal 4-5.
- Aslan, L. M. 1998. Rumput Laut. Yogyakarta. Kanisius. 114 hal.
- Atmadja, W.S., A. Kadi, Sulistijo dan R. Satari. 1996. Pengendalian Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia. Puslitbang Oseanologi LIPI. www.sith.itb.ac.id/herbarium/index.php?c=herbs&view=detail&spid=229713. Diakses pada tanggal 13 Mei 2015.
- Autherhoff, H. dan K. Kovar. 1987. Identifikasi Obat. Bandung: ITB. 276 hal.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Kelly, M., Sanderson, C. J., Nifantiev, N. E., et al. 2010. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydrate Research*, 345:2038-2047
- Biranti, F., M. Nursid, B. Cahyono. 2009. Analisis Kuantitatif B-Karoten dan Uji Aktivitas Karotenoid dalam Alga Coklat *Turbinaria decurrens*. *Jurnal Sains & Matematika*. **2**(17):90-97.
- Bowers, L.D. 1989. High-performance Liquid Chromatograph/mass Spectrometry: State of the Art for the Drug Analysis Laboratory. *Review*. 35:1282-1287.
- Brink, P. J. dan M. J. Wood. 2000. Langkah Dasar dalam Perencanaan Riset Keperawatan. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. 395 hal.
- Budiarto, Eko dan Dwi Anggraeni. 2003. Pengantar Epidemiologi Edisi 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. 135 hal.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, L.G. Mitchell. 1987. *Biology*. Alih bahasa: Rahayu L., E.I.M. Adim, N. Anita, Andri, W.F. Wibowo, W. Manalu. 2002. *Biologi*. Edisi kelima. Erlangga: Indonesia. 398 hal.
- Chasani, M., R.B. Fitriaji, dan Purwati. 2013. Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang Ketapang (*Terminalia catappa* Linn.) dan Uji Toksistasnya dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Jurnal Molekul*. **8**(1):89-100
- Costa, L.S., F.G. Pereira, T.C.B. Silva, D.S. Nednaldo, C.R.B. Gomes, C.S. Lima, C.M.S.S. Pereira, A.L. Jailma, M.Silveira, R. Fagundes, Oliveira, R. Medeiros, Albuquerque, I.R. Lopes, Andrade, G.P. Viana, Rocha, dan H.A. Oliveira. 2011. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Heterofucans from the Seaweed *Sargassum filipendula*. *Journal Marine Drugs*. **9**(12):952-966

- Da'i, M., A. Fiveri dan E. Meiyanto. 2007. Efek Sitotoksik Ekstrak Tanaman Keladi Tikus (*Typhanium divaricatum*) Terhadap Sel HeLa. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **3**(4):163-167.
- Damirtas, I, A. Sahin, B. Ayhan, S. Tekin dan I. Telci. 2009. Antiproliferative Effects of the Methanolic Extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *Linearis*. *Records of natural products*. **3** (2):104-109.
- Darmono., Ani., M. Hasan. 2002. Menyelesaikan Skripsi Dalam Satu Semester. Jakarta: Grasindo. 45 hal.
- Dewi, T.H., L.U. Khasanah, dan Kawiji. 2012. Optimasi Ekstrak Oleoresin Cabai. Rawit Hijau (*Capsicum frutescens* L.) Melalui Metode Maserasi. *Jurnal Teknosains Pangan*. **1**(1): 58-67.
- Djajanegara, I. dan P. Wahyudi. 2009. Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstraksi Daun *Annona squamosa*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **7**(1):7-11.
- Firdaus, M., M. Astawan, D. Muchtadi, T. Wresdiyati, S. waspadji, S. S. Karyono. 2012. Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Rumput Laut Coklat *Sargassum echinocarpum*. *JPHPI* 2012. **15**(2): 148-155.
- Freshney, R.I. 1987. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Edisi 4. Inc.Publication: New York. 397 hal.
- Handayani, D., Y. Aldi, dan Zurniati. 2008. Uji Aktivitas Penghambatan Degranulasi Mastosit yang Tersensutisasi Terhadap Ekstrak Metanol Spon Laut (*Acahodendrilla* sp.). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. **13**(1): 43-48.
- Harborne, J. B. 1984. Metode Fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Bandung. ITB. 235 hal.
- Hatta, M. 2013. Metabolit Sekunder Poliamina Pada Tumbuhan. <https://emhatta.wordpress.com/2013/04/22/metabolit-sekunder-poliamina-pada-tumbuhan/>. Diakses pada tanggal 28 September 2015 pada pukul 10.03 WIB.
- Hendraningrat, R.W. 2013. Pengenalan Produk PT. Indo Acidatama Menggunakan Power Point. Sminar Riser Unggulan Nasional Informatika dan Komputer FTI UNSA. **2**(1):34-38.
- Heo, S., W. Yoon, K. Kim, C. Oh, Y. Choi, K. Yoon, D. Kang, Z. Qian, I. Choi, W. Jung. 2012. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Journal Food and Chemical Toxicology* (50):3336-3342.
- Herlina, T., Syarifuddin dan Z. Udin. 2012. Senyawa Aktif Antikanker Payudara dan Antimalaria dari Tumbuhan pada Ayam (*Eythrina variegata*) Seacara In Vitro. *J. Manusia dan Lingkungan* **19**(1):30-36.
- Hernawan, U. E. dan A. D. Setyawan. 2003. Ellagitanin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi. *Jurnal Biofarmasi* **1**(1): 25-38.

- Huspa, D. H. P. 2009. Senyawa Antikanker dan Insektisida Dari Genus *Aglaia*. UNPAD PESS. 144 hal.
- Indrayani, L. H. Soetipto, dan L. Sihasale. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytropha jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. **12**(2): 57-61.
- Karina, N. E. dan Y. Yamasari. 2013. Aplikasi Diagnosa Kanker Kandungan Dengan Menggunakan Metode Navive Bayes (Study Kasus:Rumah Sakit Islam Surabaya). *Jurnal Manajemen Informatika* **2**(2):1-6.
- Kastianti, N. dan Amalia, Z.Q. 2008. Laporan Penelitian Pengambilan Minyak Atsiri Kulit Jeruk dengan Metode Ekstraksi Distilasi Vakum. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik UNDIP. Semarang. 84 hal.
- Khotimah, K. Darius. B. Sasmito. 2013. Uji Aktivitas Senyawa Aktif Alga Coklat (*Sargassum fillipendulla*) Sebagai Antioksidan Pada Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*). *THPi Student Journal*. **1** (1):10-20.
- Koestedjo, R. dan H. R. Soemartono. 1982. Diagnosa Dini Penyakit Kanker dan Cara Menanggulangnya. Bandung. 37 hal.
- Kordi, M. G.H. 2010. A to Z Budi Daya Biota Akuatik untuk Pangan, Kosmetik, dan obat-obatan. Yogyakarta: Lily Publisher. 213 hal.
- Kumala, M. 2013. Karakteritik Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Polifenol dari Teh Alga Coklat (*Sargassum cristafolium*) dengan Pelarut Etil Asetat. Skripsi Teknologi Hasil Perikanan. FPIK: Universitas Brawijaya.97 hal.
- Limantara, L dan Heriyanto. 2010. Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Coklat dari Perairan Madura dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Kelautan* .**1**(15):23-32.
- Lisdiawati, V., Sumali, W., L. B. S. Kardono. 2007. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Lignan dan Asam Lemak Dari Ekstrak Daging Buah *Phaleria macrocarpa*. *Buletin Penelitian Kesehatan* **35**(3) : 115-124
- Marimuthu, J., Antonisamy, P. Essakmuthu, J. Narayanan, B. Anatham, R.J.J M. Tharmaraj, dan S. Arumugam. 2012. Phytochemical characterization of brown seaweed *Sargassum wightii*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **2**(1):109-113.
- Martiningsih. (2013). Pengaruh Pendidikan Kesehatan tentang Kanker Serviks terhadap Perubahan Pengetahuan dan Sikap dalam Upaya Pencegahan pada Ibu PKK di Desa Pulisen Kabupaten Boyolali. <http://eprints.ums.ac.id>. Di akses tanggal 11 Juli 2016 pada pukul 15.25 WIB.
- Marlinda. M., M.S. Sangi. dan S.D. wuntu. 2012. Anailisi Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill). *Jurnal Mipa Unsrat Online*. **1**(1):24-28.
- Marudhupandi, T., T.T.A. Kumar, S. Lakshmanasenthil, G. Suja, dan T. Vinothkumar.2015. In Vitro Anticancer Activity of Fucoidan From *Turbinaria conoides* Against A549 Cell Lines. *International Journal of Biological Macromolecules*. 75:919-923.

- Maulida, D. dan N. Zulkarnaen. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran, n-heksan, Aseton, dan Etanol. *Skripsi*. 56 hal.
- Mayer, A.M.S.; Rodríguez, A.D.; Berlink, R.G.S.; Hamann, M.T. 2007. Marine Compounds With Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Cardiovascular, Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Comp. Biochem. Physiol.* 145:553–581.
- McMaster, C. M. 2005. LC/MS: a Practical User's Guide. Canada. Simultaneoulsy: 151 hal.
- Mauja, A.D., H.S.J. Koleangan dan M.R.J. Runtunwene. 2013. Toksisitas Dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogk (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal MIPA UNSRAT*. 2(2):115-118.
- Munawaroh, S dan Prima A.H. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Perut (*Citrus hytrix* D.C.) Dengan Pelarut Etanol dan N-Heksan. *Jurnal Komposisi Teknik*. 2(1): Hal 73-78
- Nafisah, M., Tukiran, Suyanto, dan N. Hidayati. 2014. Uji Skrining Fitokimia pada Ekstrak Heksan, Kloroform dan Metanol dari Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbiae hirtae*). Prosiding Seminar Nasional Kimia MIPA UNESA. Hal 279-286.
- Nazir, M. 1988. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia: Jakarta.
- Nugrahaningtyas, K. D., S. Matsjen. T. D. Wahyuni. 2005. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Rimpang Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa Roxb.*). *Jurnal Biorafarmasi*. 3(1):32-38.
- Nurmayati, D., E. Sugriati, S. Mansoor. 2006. Kehidupan Tumbuhan Laut. PT. Remaja Rosdakarya:Bandung. 58 hal.
- Nursid, M., T. Wikanta, dan R. Susilowati. 2013. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Fukosantin Ekstrak Rumput Laut Coklat dari Pantai Binuangen, Banten. *JPB Kelautan dan Perikanan* 8(1). Hal 73-84.
- Nuryoto. 2008. Studi Kinerja Katalisator Lewatit Monoplus s-100 pada Reaksi Esterifikasi antara Etanol dan Asam Asetat. Review. Hal 24-27.
- Ouali, M. I. 2015. Total Synthesis of Steroids and Heterosteroids from Bistro. Review Steroid 98: Hal 9-28.
- Pangaribowo, D. A. 2014. Molecular Docking, Sintesis dan Uji Aktivitas Sitotoksik Senyawa 1-Benzoil-1,3-Dimetilurea. *Indonsia E-Journal of Applied Chemistry*. 2(1):1-6.
- Phang, S. M. (2010). Potential products from tropical algae and seaweeds, especially with reference to Malaysia. *Malaysian Journal of Science*. 29(2):160-166

- Pranoto, E., W.F. Ma'ruf. dan D. Pringgenies. 2012. Kajian Aktivitas Biokatif Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuira scabra*) Terhadap Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Perikanan*. **1(2)**:1-8
- Prasasti, T.D. 2013. Pengaruh Ekstrak Kasar Fucoidan alga cokela *Sargssum duplicatum* sebagai antikanker terhadap viabilitas sel Lala. Skripsi Teknologi Hasil Perikanan. FPIK: Universitas Brawijaya. Hal 18
- Pratama, D.M., K.M. Yuliawati, dan R.A. kodir. 2015. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Rumput Laut *Sargassum duplicatum* J.G. Agardh. dari Pantai Ujung Genteng. Prosiding Penelitian. Hal: 429-434.
- Puji, A.D.N., Sukardiman, H.T. Fadji. 2015. Uji Sitoksisitas dan Efek Ekstraksi Spons Laut *Aptos suberitoides* Terhadap Sel Kanker Serviks (HeLa) Secara In Vitro. Artikel Faculty of Mathematic and Natural Science, Sepuluh Nopember Institute of Technology: Surabaya. Hal 1-15.
- Ramli, H. M., R. Umbas, S. S. Panigoro. 2000. Deteksi Dini Kanker. Balai Penerbit FKUI: Jakarta. 149 hal.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidan dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. Review. Hal 196-202.
- Riyanto, E.I. I. Widowati, dan A. Sabdono. 2013. Skrining Aktivitas Antibakteri pada Ekstrak *Sargassum polycystum* Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* dan *Micrococcus luteus* di Pulau Panjang Jepara. *Journal of Marine Research*. **14(3569)**:115-121.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerbit ITB: Bandung. 284 hal.
- Sangi, M. S., L. I. Momuat dan M. Kumaunang. 2012. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelapah Aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains*. **12(2)**:127-134.
- Sangi, M., M. R. J. Runtuwene, H. E. I. Simbala dan V. M. A. Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem Prog*. **1(1)**:47-53.
- Sani. R.N., F.C. Nisa. R.D. Andriani., dan J.M. Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **2(2)**:121-126.
- Sari, D.K., D.H. Wardhani, A. Prasetyaningrat. 2012. Pengujian Kandungan Total Fenol *Kappahycus alvarezzi* dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik dengan Variasi Suhu Waktu. Prosiding SNST Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang ke-3 tahun 2012. Hal 40-44.
- Septiana, A. T. dan A. Asnani. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum*. *Jurnal Teknologi Pertanian* **14(2)**:79-86.
- _____. 2012. Kajian Fisiokimia Ekstrak Rumput Laut coklat *Sargassum dupicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut Dan Metode Ekstraksi. *Jurnal Agroiintek*. **6(1)**:22-28.

- Soemirat. 2005. Toksikologi Lingkungan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 117 hal.
- Sudarmadji S., Haryono B., dan Suhardi. 1989. Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty, Yogyakarta. 165 hal.
- Sukadana, M.I. 2010. Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Akar Awar-awar (*Focus septica* Burn F). *Jurnal Kimia*. **4**(1):63-70.
- Sundaryono, A. 2011. Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Total dari Gynura Segetum (*Lour*) Terhadap Peningkatan Eritrosit dan Penurunan Leukosit Pada Mencit (*Mus Musculus*). *Jurnal Exacta*. **9**(2):8-16.
- Suparmi dan A. sahari. 2009. Mengenal Potensi Rumput Laut: Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Rumput Laut dari Aspek Industri dan Kesehatan. *Jurnal Sultan Agung*. **14**(118):95-116.
- Susilawati, H. Indriati dan W. Limra. 2015. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (*Solanum torvum*). Repository University of Riau. <http://repository.unri.ac.id/>. Diakses pada tanggal 15 Mei 2015 pada pukul 20.27 WIB.
- Teruya, T., Konishi, T., Uechi, S., Tamaki, H., & Tako, M. (2007). Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. **41**:221–226.
- Tjay, T. dan K. Rahardja. 2002. Obat-obat penting, penggunaan dan efek-efek sampingnya. Ed V. Jakarta : Dirjen POM Depkes RI, 227 hal.
- Torneck C. D. dan M. Torabinejad. 1997. Biologi jaringan pulpa dan jaringan sekitar akar. Jakarta. EGC : Hal. 11-23
- Vogeser, M. dan S. Segar. 2008. A Decade of HPLC-MS/MS in the Routine Clinical Laboratory-goals for Futher Development. *Review Clinical Biochemistry*. **41**:649-662.
- Waji, R. A. dan A. Sugrani. 2009. Organik Bahan Alam Flavonoid (*Quercetin*). Makalah Kimia. Hal 1-23.
- Wicaksono, F.M., D.S.P. Sari., B.H. Sekti, Y. Sari, E. Natalia, D. Lyrawati, dan A.P. febtiyanti. 2013. Piperantha: Inovasi Terapi Kombinasi Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyntha*) dan Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Peningkatan Aktiitas FAS/FAS-L pada Regrsi Pertumbuhan Kanker Serviks Secara in vitro. Artikel. Hal 2-21
- Widowati, L. dan H. Mudahar. 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Embi Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) Bi) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 In Vitro. Artikel Media Lubang Kesehatan XIX(1): Hal. 9-14.
- Wijayakusuma, H. 2005. Atasi Kanker dengan Tanaman Obat. Puspa Swara: Jakarta. 156 hal.

Winarno, F.G. 1988. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia: Jakarta. 253 hal.

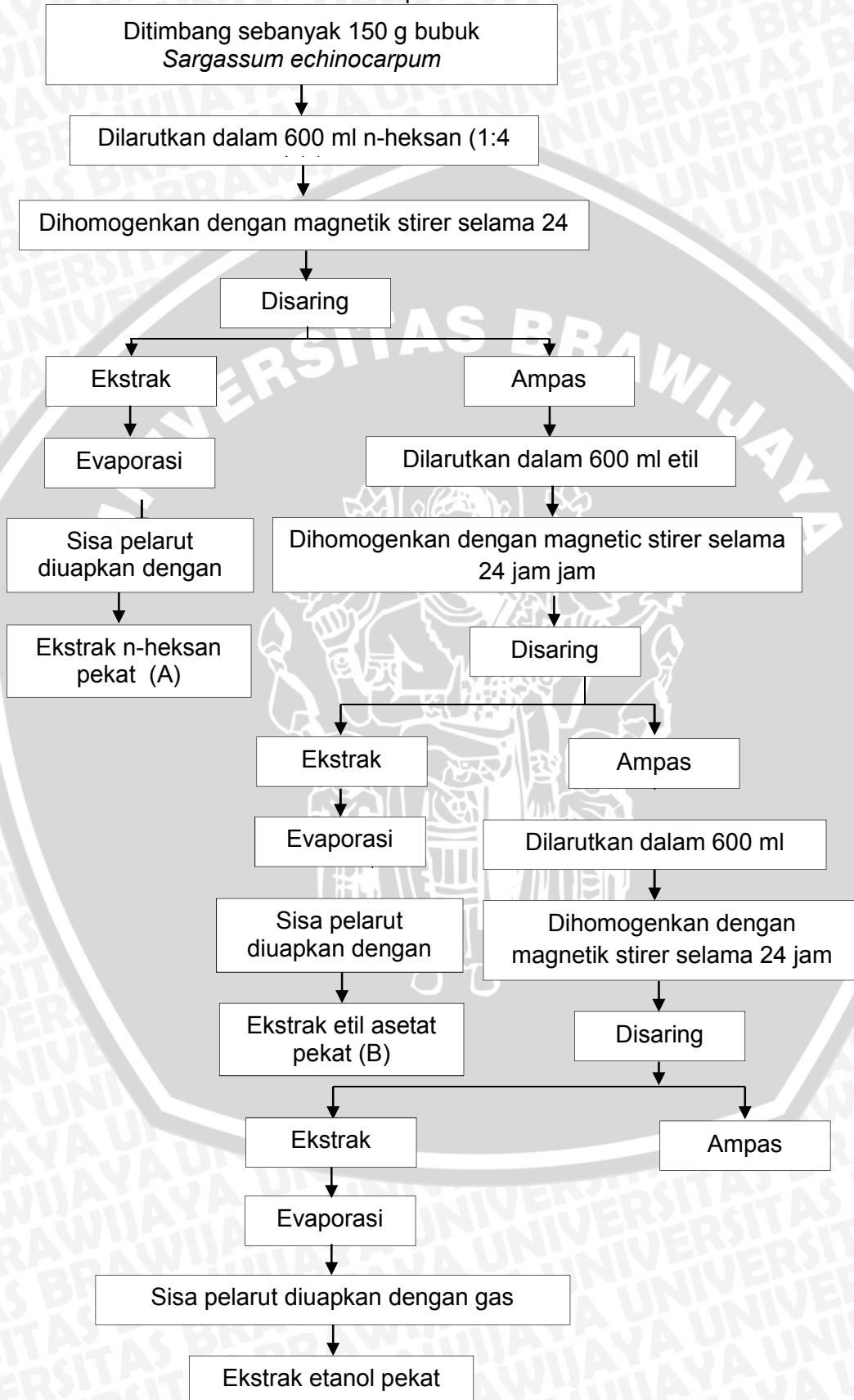
Wink, M. 2010. Biochemistry, Physiologi And Ecological Function of Secondary Metabolites. Annual Plant Reviews 40:1–19.

Wink, M. 2013. Evolution of Secondary Metabolites in Legumes (*Fabaceae*). *South African Journal of Botany*. (89):164-175



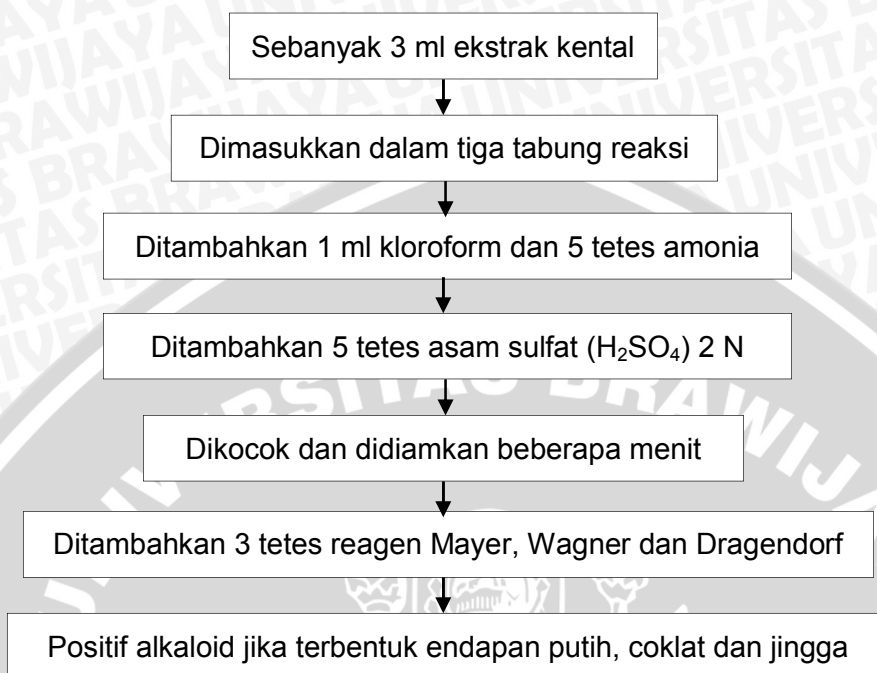
Lampiran 1. Skema Proses Ekstraksi (Modifikasi Septiana dan Asnani, 2012)

a. Skema Proses Ekstraksi Sampel dari Pelarut Non Polar ke Polar

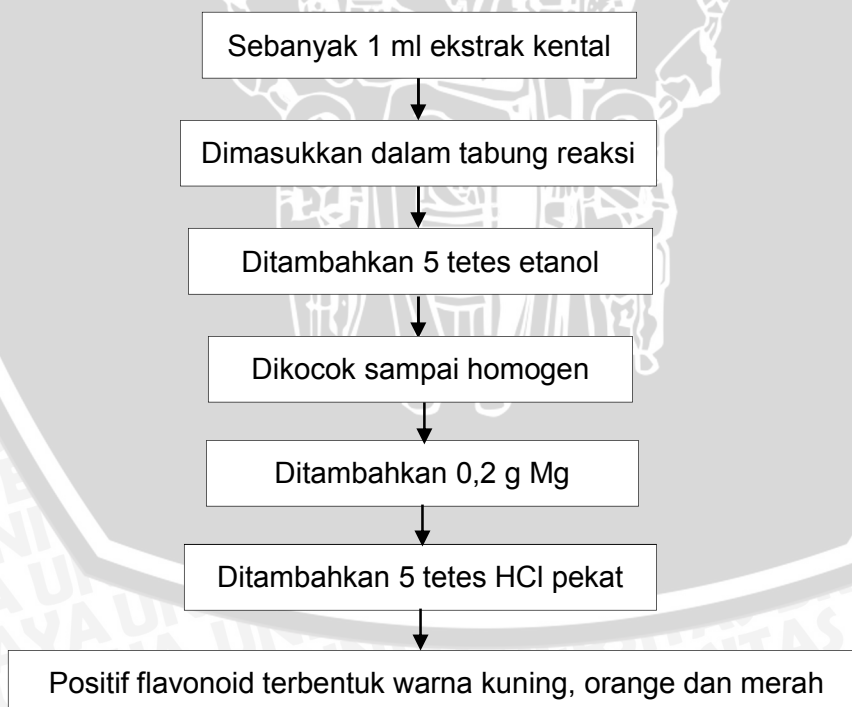


Lampiran 2. Skrining Fitokimia

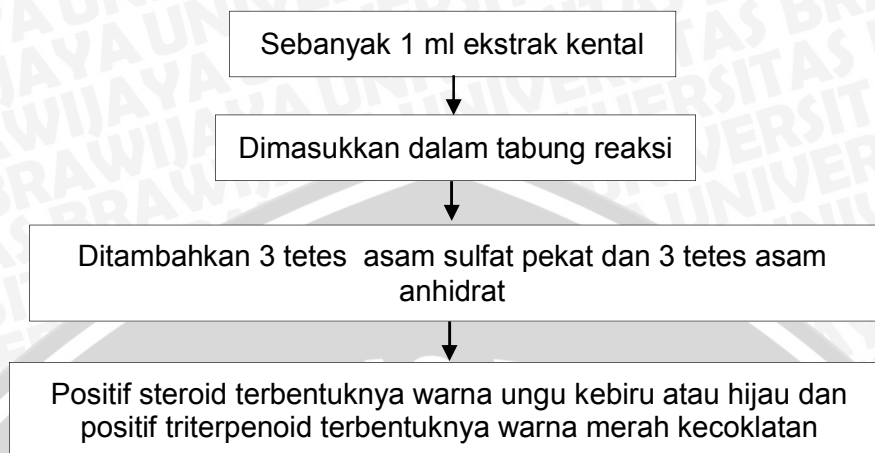
a. Uji Alkaloid (Modifikasi Harborne, 1984 dan Nafisah *et al.*, 2014)



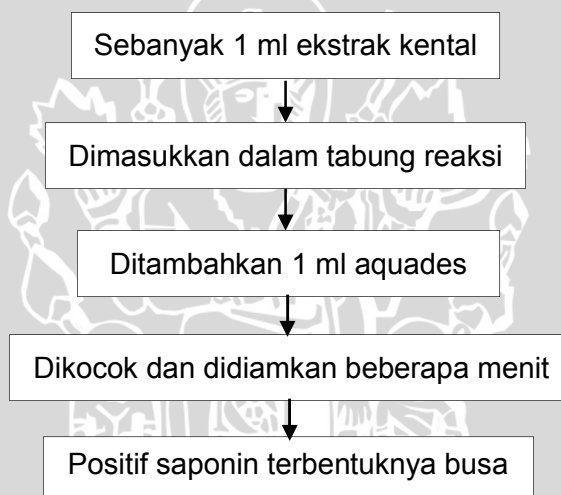
b. Flavonoid (Modifikasi Nafisah *et al.*, 2014 dan Sangi *et al.*, 2008)



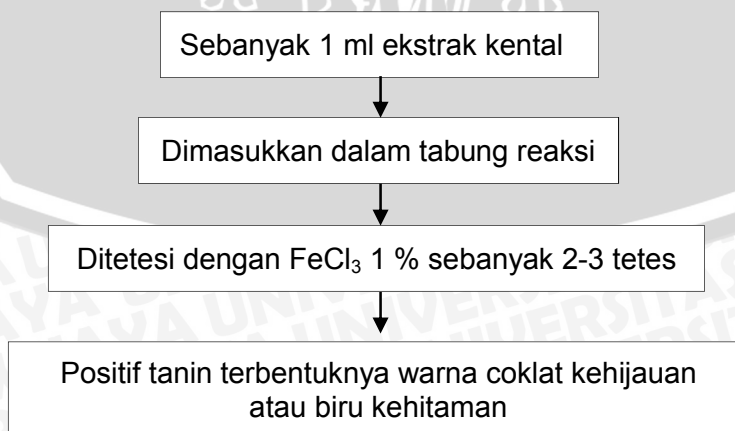
- c. Uji Steroid/Triterpenoid (Modifikasi Nafisah *et al.*, 2014 dan Sangi *et al.*, 2008)



- d. Uji Saponin (Harborne, 1987)

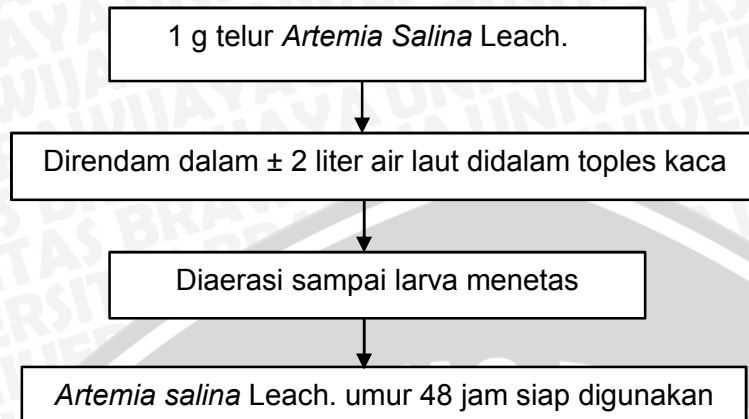


- e. Uji Tanin (Harborne, 1987)

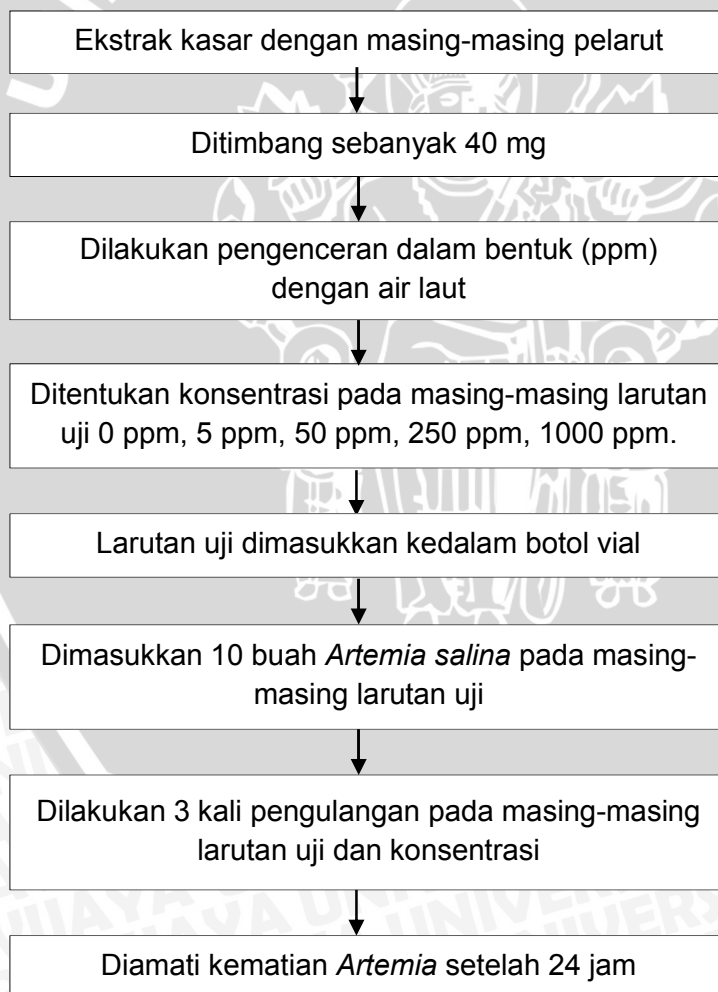


Lampiran 3. Pengujian Toksisitas

a) Penetasan Telur *Artemia salina* Leach. (Muaja *et al.* 2013)



b) Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach (Modifikasi Martiningsih. 2013).



Lampiran 4. Pengujian sel HeLa

- Proses *Thawing* sel HeLa

Diambil 1 *flask Freezing* HeLa dengan kepadatan 10^6 dari freezer

Di *thawing* dengan suhu 37°C sampai separuh

Ditambahkan 10x volum *Medium Complete*

Disentrifus suhu ruang 1000 rpm selama 8 menit

Dibuang supernatan dan pellet diresuspensi dengan 7 ml MC

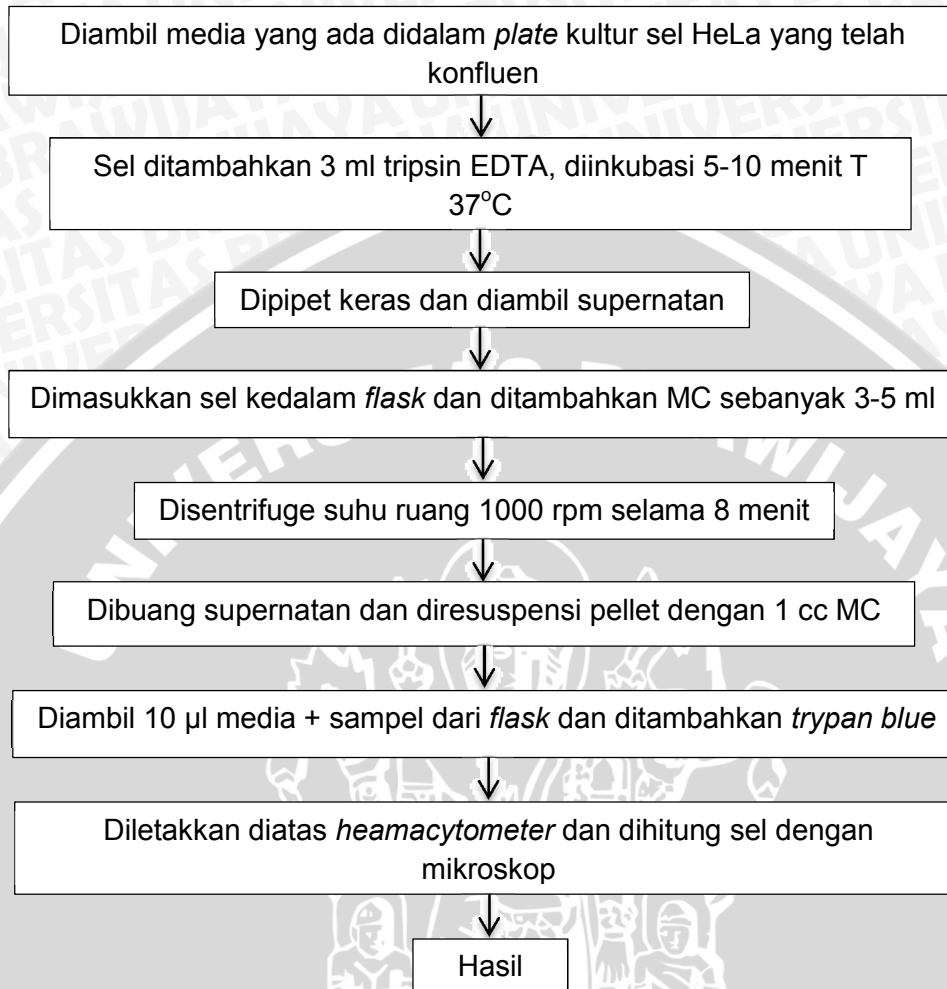
Ditanam dalam *flask* kultur dengan suasana CO_2 5% dan suhu inkubator 37°C

Diganti media pertumbuhan 2-3 hari sekali

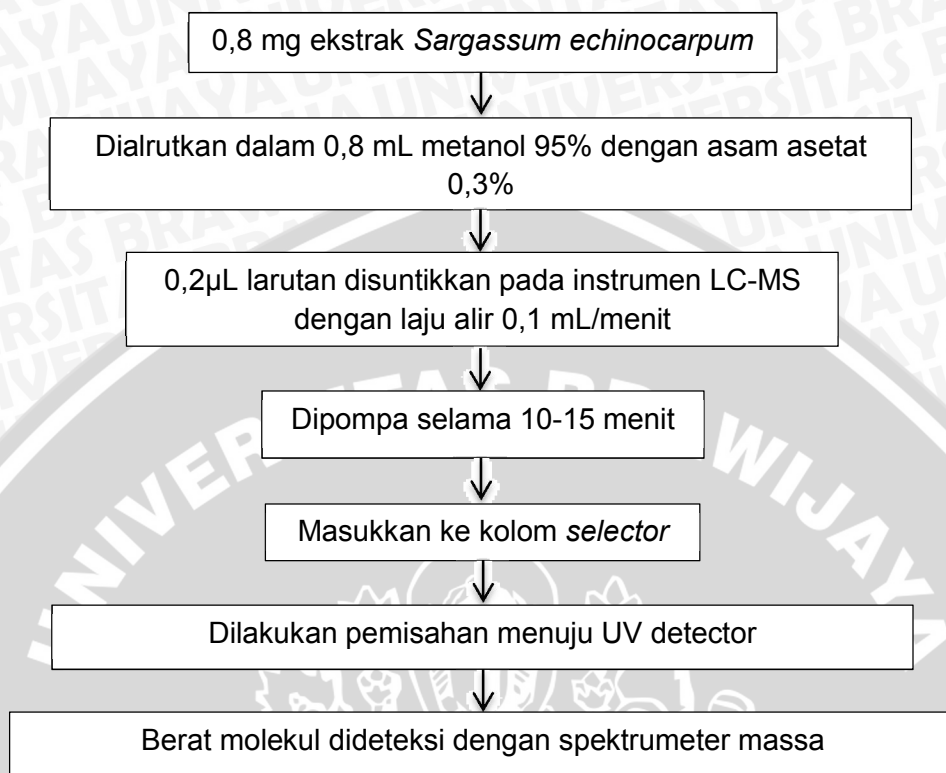
Diamati pertumbuhan sel hingga 80-90% konfluen

Disubkultur kedalam *plate* kultur

- Proses subkultur sel HeLa



Lampiran 5. Skema kerja uji LC-MS (Modifikasi Lisdiawati, *et al.*, 2007)



Lampiran 6. Dokumentasi penelitian

- Preparasi Sampel



Sampel segar *S. echinocarpum*



Pencucian sampel *S. echinocarpum*



Penjemuran *S. echinocarpum*



Penghalusan dan penimbangan *S. echinocarpum*



Proses Ekstraksi



Sampel *S. echinocarpum* 150 g



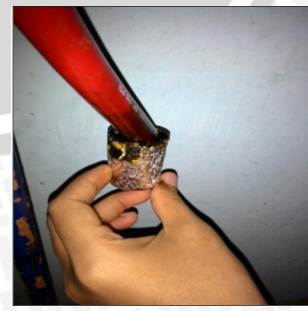
Penambahan pelarut dan proses ekstraksi



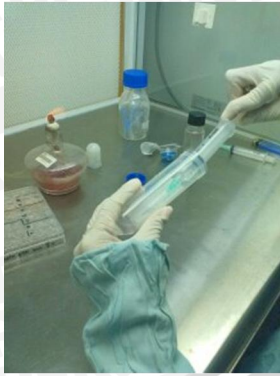
Proses penyaringan



Proses evaporasi dan nitrogen



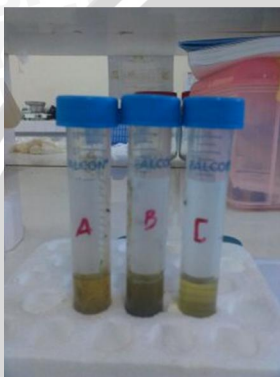
- Proses kultur sel HeLa



Persiapan medium



pewarnaan blue



Persiapan sampel



penempatan sel pada *Haemacytometer*



Subkultur sel HeLa



perhitungan dengan mikroskop



Lampiran 7. Hitungan Rendemen

Jenis Pelarut	Rendemen (%)			Jumlah	Rerata	stdv
	1	2	3			
N-heksan	0,053	0,057	0,043	0,153	0,051	0,007
Etil asetat	0,134	0,131	0,179	0,443	0,148	0,027
Etanol	0,218	0,201	0,232	0,651	0,217	0,015

$$FK = \frac{(0,053+0,057+0,043+\dots+0,232)^2}{9} +$$

$$= \frac{1,558}{9}$$

$$= 0,173$$

$$JKT = (0,053^2+0,057^2+0,043^2+\dots+0,232^2)-FK$$

$$= 0,217 - 0,173$$

$$= 0,044$$

$$JKP = \frac{(0,153^2+0,443^2+0,651^2)}{3} - FK$$

$$= 0,042$$

$$JKG = KJT - JKP$$

$$= 0,002$$

SIDIK RAGAM (ANOVA)

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%	0,05
Perlakuan	2	0,042	0,020854	62,25697**	5,14	10,92	6
Galat	6	0,002	0,000335				2,446912
Total	8	0,044					

** = berbeda nyata

UJI BNT

$$BNT_a = t_{a (db galat)} \times \sqrt{\frac{2 \times KTG}{ulangan}}$$

$$= t_{0,05(6)} \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0003}{3}}$$

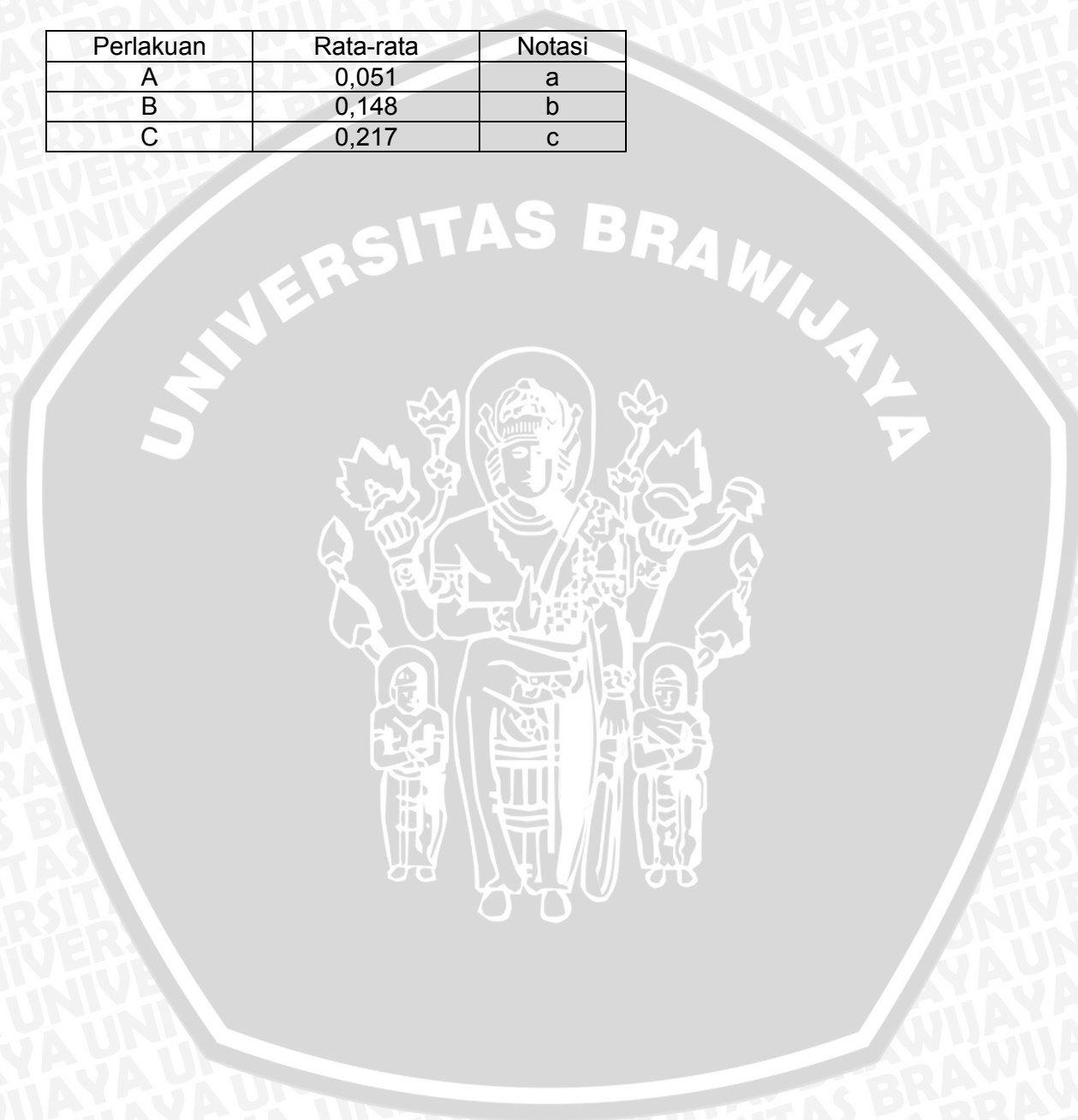
$$= 2,446912 \times \sqrt{0,002}$$

$$= 2,446912 \times 0,015$$

$$= 0,034$$

NOTASI

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A	0,051	a
B	0,148	b
C	0,217	c



Lampiran 8. Data Hasil Uji Toksisitas *Sargassum echinocarpum*.

Jumlah *Artemia salina* setelah uji toksisitas 24 jam

Tabel Data Uji Toksisitas

Konsentrasi (ppm)	Pelarut		
	n-heksan	Etil asetat	Etanol
0	0	0	0
50	1	2	3
100	2	4	5
150	5	5	7
200	6	8	9
1000	8	10	10

a. N-heksan

Pengolahan data dengan analisa probit dengan pelarut n-heksan dimulai dengan mencari % kematian *Artemia* yaitu dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah } Artemia \text{ mati}}{\text{jumlah } Artemia \text{ uji}} \times 100 \%$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100 \% = 0 \%$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100 \% = 10 \%$$

$$100 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100 \% = 20 \%$$

$$150 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 \% = 50 \%$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{6}{10} \times 100 \% = 60 \%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{8}{10} \times 100 \% = 80 \%$$

Hasil dari % kematian *Artemia* pada setiap variasi konsentrasi ditentukan nilai

% probit dengan melihat tabel probit presentase mortalitas dibawah ini :

% Mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.40	7.51	7.58	7.65	7.75	7.58	8.09

Keterangan:

: kisaran angka (+) 1-9 % Mortalitas

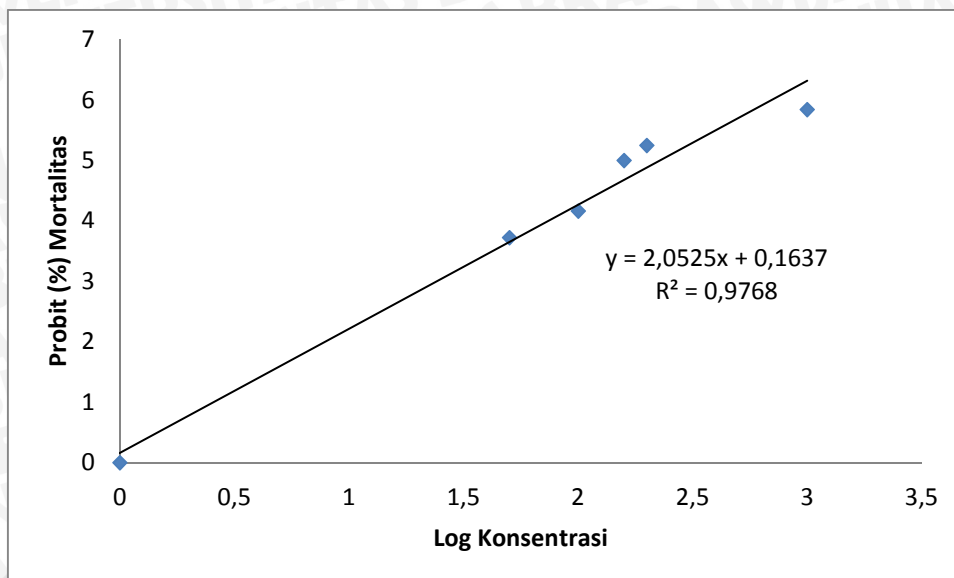
Respon mortalitas ulangan 1 yakni 0%, 10 %, 50 %, 50 %, 60 % maka nilai probit yang diperoleh berdasarkan tabel yakni 0; 3,72; 4,16; 5,00; 5,25; dan 5,84.

Kemudian konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, dan 1000 ppm dilogartmakan sebagai berikut:

Log 0 = 0, log 50 = 1,7, log 100 = 2, log 150 = 2,2, log 200 = 2,3, dan log 1000 = 3 (nilai % probit ditunjukkan dengan blok warna hijau).

Sehingga didapatkan log konsentrasi dan % probit mortalitas, kemudian dimasukkan kedalam *microsoft excel* sehingga diperoleh persamaan pada grafik.

Log Konsentrasi	% Probit
0	0
1,7	3,72
2	4,48
2,2	5,00
2,3	5,25
3	5,84



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan Probit % Mortalitas Ekstrak Kasar N-heksan *Padina australis* Ulangan 1.

Didapatkan persamaan $Y = 2,0525x + 0,1637$

Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi yang menyebabkan sebanyak 50% kematian hewan uji.

$$Y = 2,0525x + 0,1637$$

$$5 = 2,0525x + 0,1637$$

$$5 - 0,1637 = 2,0525x$$

$$4,8363 = 2,0525x$$

$$x = 4,8363 / 2,0525$$

$$x = 2,356$$

Anti Log dari 2,337 = 226,98 ppm

LC₅₀ = 226,98 ppm

b. Etil asetat

Pengolahan data dengan analisa probit dengan pelarut etil asetat dimulai dengan mencari % kematian *Artemia* yaitu dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah } Artemia \text{ mati}}{\text{jumlah } Artemia \text{ uji}} \times 100 \%$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100 \% = 0 \%$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100 \% = 20 \%$$

$$100 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 \% = 40 \%$$

$$150 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 \% = 50 \%$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{8}{10} \times 100 \% = 80 \%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{10}{10} \times 100 \% = 100 \%$$

Hasil dari % kematian *Artemia* pada setiap variasi konsentrasi ditentukan nilai

% probit dengan melihat tabel probit presentase mortalitas dibawah ini :

% Mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.40	7.51	7.58	7.65	7.75	7.58	8.09

Keterangan:

: kisaran angka (+) 1-9 % Mortalitas

Respon mortalitas ulangan 1 yakni 0%, 10 %, 50 %, 50 %, 60 % maka nilai probit yang diperoleh berdasarkan tabel yakni 0; 4,16; 4,75; 5,00; 5,84; dan 7,33.

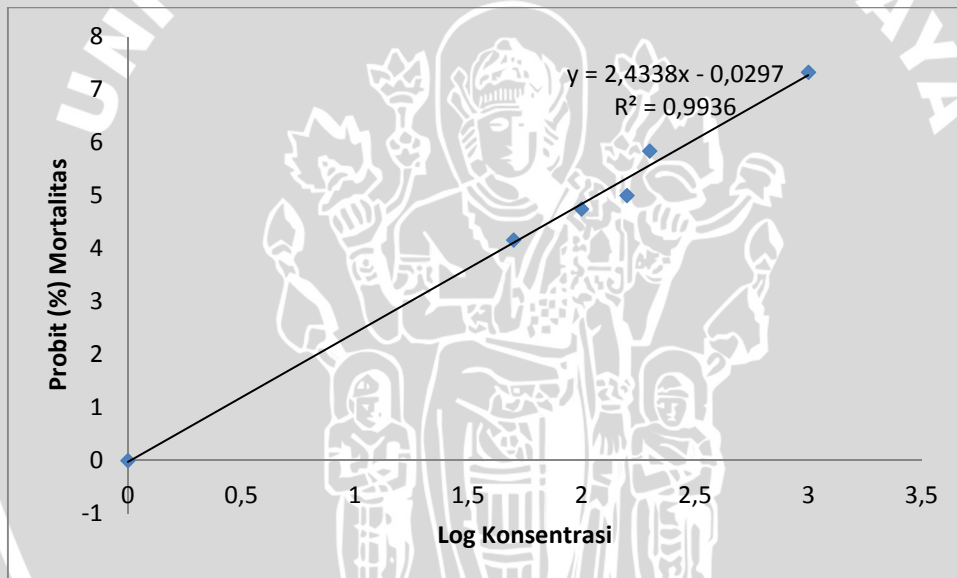
Kemudian konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, dan 1000 ppm dilogartmakan sebagai berikut:



Log 0 = 0, log 50 = 1,7, log 100 = 2, log 150 = 2,2, log 200 = 2,3, dan log 1000 = 3 (nilai % probit ditunjukkan dengan blok warna hijau).

Sehingga didapatkan log konsentrasi dan % probit mortalitas, kemudian dimasukkan kedalam *microsoft excel* sehingga diperoleh persamaan pada grafik.

Log Konsentrasi	% Probit
0	0
1,7	4,16
2	4,75
2,2	5,00
2,3	5,84
3	7,33



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan Probit % Mortalitas Ekstrak Kasar N-heksan *Padina australis* Ulangan 1.

Didapatkan persamaan $Y = 2,4338x - 0,0297$

Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi yang menyebabkan sebanyak 50% kematian hewan uji.

$$Y = 2,4338x - 0,0297$$

$$5 = 2,4338x - 0,0297$$

$$5 + 0,0297 = 2,4338x$$

$$5,0297 = 2,4338x$$

$$x = 5,0297 / 2,4338$$

$$x = 2,0666$$

$$\text{Anti Log dari } 2,0666 = 116,57 \text{ ppm}$$

$$\text{LC}_{50} = 116,57 \text{ ppm}$$

c. Etanol

Pengolahan data dengan analisa probit dengan pelarut etanol dimulai dengan mencari % kematian *Artemia* yaitu dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah } Artemia \text{ mati}}{\text{jumlah } Artemia \text{ uji}} \times 100 \%$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100 \% = 0 \%$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100 \% = 30 \%$$

$$100 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 \% = 50 \%$$

$$150 \text{ ppm} = \frac{7}{10} \times 100 \% = 70 \%$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{9}{10} \times 100 \% = 90 \%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{10}{10} \times 100 \% = 100 \%$$

Hasil dari % kematian *Artemia* pada setiap variasi konsentrasi ditentukan nilai

% probit dengan melihat tabel probit presentase mortalitas dibawah ini :

% Mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	0.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.40	7.51	7.58	7.65	7.75	7.58	8.09

Keterangan:



: kisaran angka (+) 1-9 % Mortalitas

Respon mortalitas ulangan 1 yakni 0%, 10 %, 50 %, 50 %, 60 % maka nilai probit yang diperoleh berdasarkan tabel yakni 0; 4,48; 5,00; 5,52; 6,28; dan 7,33.

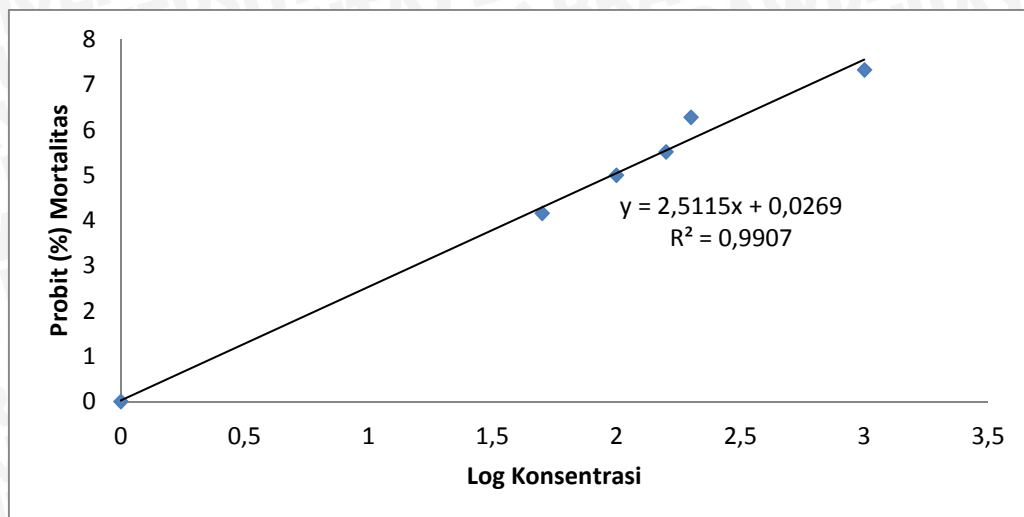
Kemudian konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, dan 1000 ppm dilogartmakan sebagai berikut:

Log 0 = 0, log 50 = 1,7, log 100 = 2, log 150 = 2,2, log 200 = 2,3, dan log 1000 = 3 (nilai % probit ditunjukkan dengan blok warna hijau).

Sehingga didapatkan log konsentrasi dan % probit mortalitas, kemudian dimasukkan kedalam *microsoft excel* sehingga diperoleh persamaan pada grafik.

Log Konsentrasi	% Probit
0	0
1,7	4,48
2	5,00
2,2	5,52
2,3	6,28
3	7,33





Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan Probit % Mortalitas Ekstrak Kasar N-heksan *Padina australis* Ulangan 1.

Didapatkan persamaan $Y = 2,5115x + 0,0269$

Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi yang menyebabkan sebanyak 50% kematian hewan uji.

$$Y = 2,5115x + 0,0269$$

$$5 = 2,5115x + 0,0269$$

$$5 - 0,0269 = 2,5115x$$

$$4,703 = 2,5115x$$

$$x = 4,703 / 2,5115$$

$$x = 1,8726$$

$$\text{Anti Log dari } 2,0666 = 74,58 \text{ ppm}$$

$$\text{LC}_{50} = 74,58 \text{ ppm}$$

Lampiran 9. Perhitungan dosis

- Pembuatan Larutan Induk

Diketahui : Sampel = 5 mg

Volume metanol = 5 ml

1 ppm = $\frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$

Volume = 5 ml \longrightarrow 1 ppm = $\frac{0.005 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$

Konsentrasi larutan induk

$$\frac{1 \text{ ppm}}{x} = \frac{0.005/5 \text{ ml}}{5 \text{ mg}/5 \text{ ml}}$$

$$\frac{1 \text{ ppm}}{x} = \frac{0.005}{5} \times \frac{5}{5}$$

$$\frac{1 \text{ ppm}}{x} = \frac{0.025}{25}$$

$$0.025 x = 25$$

$$x = \frac{25}{0.025} = 1000 \text{ ppm}$$

- Perhitungan dosis

Diketahui : media sel 500 μ l

dosis (5ppm, 10ppm, 15ppm, dan 20ppm)

- Konsentrasi 5 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 500 \times 5$$

$$V_1 \times 1000 = 2500$$

$$V_1 = \frac{2500}{1000}$$

$$V_1 = 2,5 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 500 \times 10$$

$$V_1 \times 1000 = 5000$$

$$V_1 = \frac{5000}{1000}$$

$$V_1 = 5 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 15 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 500 \times 15$$

$$V_1 \times 1000 = 7500$$

$$V_1 = \frac{7500}{1000}$$

$$V_1 = 7,5 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 20 ppm

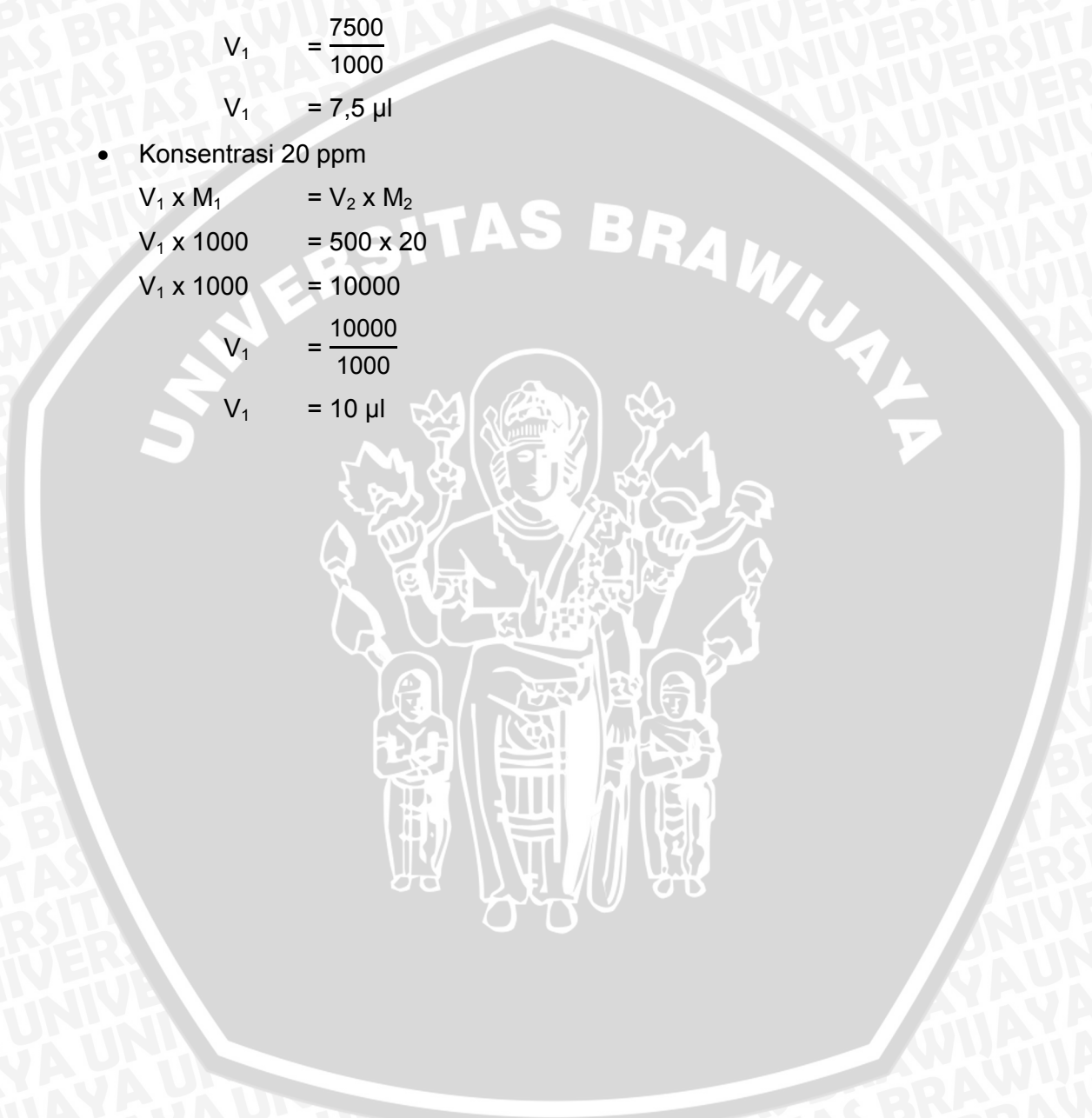
$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 500 \times 20$$

$$V_1 \times 1000 = 10000$$

$$V_1 = \frac{10000}{1000}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{l}$$



Lampiran 10. Perhitungan Jumlah Sel

Rumus Penjumlahan Sel Pada *Haemocytometer* (Djajanegara dan Wahyudi, 2009)

$$\sum \text{Sel} = \frac{n}{2} \times 10^4 \times P$$

Keterangan

- n = jumlah sel dari dua bilik
- 2 = jumlah bilik *haemocytometer*
- 10^4 = kapasitas *haemocytometer*
- P = faktor pengenceran (1)

n-heksan (5ppm)

Hidup

a) $\sum \text{Sel} = \frac{385+365}{2} \times 10^4 = 375 \times 10^4$

b) $\sum \text{Sel} = \frac{289+270}{2} \times 10^4 = 279,5 \times 10^4$

c) $\sum \text{Sel} = \frac{456+261}{2} \times 10^4 = 358,5 \times 10^4$

Mati

a) $\sum \text{Sel} = \frac{6+8}{2} \times 10^4 = 7 \times 10^4$

b) $\sum \text{Sel} = \frac{5+6}{2} \times 10^4 = 5,5 \times 10^4$

c) $\sum \text{Sel} = \frac{1+9}{2} \times 10^4 = 51 \times 10^4$

n-heksa (10ppm)

Hidup

a) $\sum \text{Sel} = \frac{195+134}{2} \times 10^4 = 164,5 \times 10^4$

b) $\sum \text{Sel} = \frac{259+134}{2} \times 10^4 = 196,5 \times 10^4$

c) $\sum \text{Sel} = \frac{235+313}{2} \times 10^4 = 274 \times 10^4$

Mati

a) $\sum \text{Sel} = \frac{14+11}{2} \times 10^4 = 12,5 \times 10^4$

b) $\sum \text{Sel} = \frac{20+13}{2} \times 10^4 = 16,5 \times 10^4$

c) $\sum \text{Sel} = \frac{11+13}{2} \times 10^4 = 12 \times 10^4$

n-heksan (15ppm)

Hidup

a) $\sum \text{Sel} = \frac{118+148}{2} \times 10^4 = 133 \times 10^4$

b) $\sum \text{Sel} = \frac{117+163}{2} \times 10^4 = 140 \times 10^4$

Mati

a) $\sum \text{Sel} = \frac{18+10}{2} \times 10^4 = 14 \times 10^4$

b) $\sum \text{Sel} = \frac{18+11}{2} \times 10^4 = 14,5 \times 10^4$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{132+154}{2} \times 10^4 = 143 \times 10^4$$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{12+14}{2} \times 10^4 = 13 \times 10^4$$

n-heksan (20ppm)

Hidup

Mati

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{37+44}{2} \times 10^4 = 40,5 \times 10^4$$

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{6+9}{2} \times 10^4 = 7,5 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{79+89}{2} \times 10^4 = 84 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{21+17}{2} \times 10^4 = 19 \times 10^4$$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{264+296}{2} \times 10^4 = 280 \times 10^4$$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{55+48}{2} \times 10^4 = 51,5 \times 10^4$$

Etil asetat (5ppm)

Hidup

Mati

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{174+188}{2} \times 10^4 = 181 \times 10^4$$

$$\sum \text{Sel} = \frac{15+27}{2} \times 10^4 = 21 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{307+323}{2} \times 10^4 = 315 \times 10^4$$

$$\sum \text{Sel} = \frac{36+27}{2} \times 10^4 = 31,5 \times 10^4$$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{259+227}{2} \times 10^4 = 243 \times 10^4$$

$$\sum \text{Sel} = \frac{25+29}{2} \times 10^4 = 27 \times 10^4$$

Etil asetat (10ppm)

Hidup

Mati

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{181+155}{2} \times 10^4 = 168 \times 10^4$$

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{23+34}{2} \times 10^4 = 28,5 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{272+199}{2} \times 10^4 = 235,5 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{49+57}{2} \times 10^4 = 53 \times 10^4$$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{382+375}{2} \times 10^4 = 378,5 \times 10^4$$

$$c) \sum \text{Sel} = \frac{59+59}{2} \times 10^4 = 59 \times 10^4$$

Etil asetat (15ppm)

Hidup

Mati

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{166+155}{2} \times 10^4 = 160,5 \times 10^4$$

$$a) \sum \text{Sel} = \frac{53+57}{2} \times 10^4 = 55 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{131+92}{2} \times 10^4 = 111,5 \times 10^4$$

$$b) \sum \text{Sel} = \frac{45+38}{2} \times 10^4 = 41,5 \times 10^4$$



$$c) \sum Sel = \frac{110+96}{2} \times 10^4 = 103 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{31+35}{2} \times 10^4 = 33 \times 10^4$$

Etil aetat (20ppm)

Hidup

$$a) \sum Sel = \frac{77+104}{2} \times 10^4 = 90,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{137+157}{2} \times 10^4 = 147 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{100+171}{2} \times 10^4 = 135,5 \times 10^4$$

Mati

$$a) \sum Sel = \frac{25+48}{2} \times 10^4 = 36,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{56+70}{2} \times 10^4 = 63 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{51+49}{2} \times 10^4 = 50 \times 10^4$$

Etanol (5ppm)

Hidup

$$a) \sum Sel = \frac{267+243}{2} \times 10^4 = 255 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{219+178}{2} \times 10^4 = 198,5 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{177+126}{2} \times 10^4 = 151,5 \times 10^4$$

Mati

$$a) \sum Sel = \frac{39+42}{2} \times 10^4 = 40,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{27+35}{2} \times 10^4 = 31 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{22+41}{2} \times 10^4 = 31,5 \times 10^4$$

Etanol (10ppm)

Hidup

$$a) \sum Sel = \frac{199+214}{2} \times 10^4 = 206,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{93+87}{2} \times 10^4 = 90 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{106+115}{2} \times 10^4 = 110,5 \times 10^4$$

Mati

$$a) \sum Sel = \frac{51+85}{2} \times 10^4 = 68 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{33+18}{2} \times 10^4 = 25,5 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{25+46}{2} \times 10^4 = 35,5 \times 10^4$$

Etanol (15ppm)

Hidup

$$a) \sum Sel = \frac{127+94}{2} \times 10^4 = 110,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{102+89}{2} \times 10^4 = 95,5 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{95+87}{2} \times 10^4 = 91 \times 10^4$$

Mati

$$a) \sum Sel = \frac{70+67}{2} \times 10^4 = 68,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{66+46}{2} \times 10^4 = 56 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{57+49}{2} \times 10^4 = 53 \times 10^4$$



Etanol (20ppm)

Hidup

$$a) \sum Sel = \frac{61+69}{2} \times 10^4 = 65 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{75+91}{2} \times 10^4 = 83 \times 10^4$$

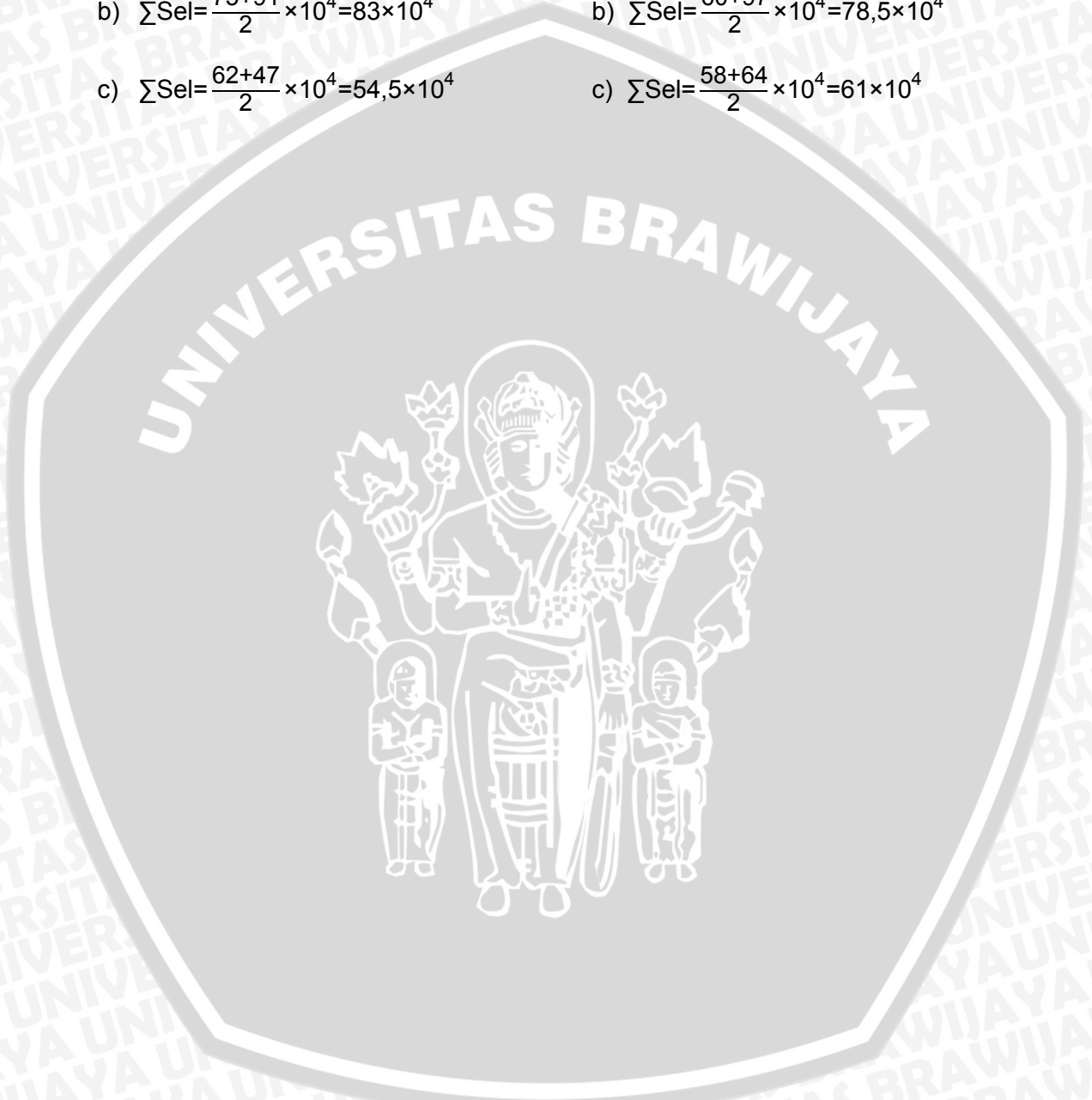
$$c) \sum Sel = \frac{62+47}{2} \times 10^4 = 54,5 \times 10^4$$

Mati

$$a) \sum Sel = \frac{63+78}{2} \times 10^4 = 70,5 \times 10^4$$

$$b) \sum Sel = \frac{60+97}{2} \times 10^4 = 78,5 \times 10^4$$

$$c) \sum Sel = \frac{58+64}{2} \times 10^4 = 61 \times 10^4$$



Lampiran 11. Perhitungan % Viabilitas

Perhitungan % Viabilitas

Rumus :

$$\text{Viabilitas} = \frac{\sum \text{sel hidup}}{\sum \text{sel hidup} + \sum \text{sel mati}} \times 100\%$$

n-heksan

(5ppm)

a) $\% \text{Viabilitas} = \frac{375}{375+7} \times 100\% = 98,17$

b) $\% \text{Viabilitas} = \frac{279,5}{279,5+5,5} \times 100\% = 98,07$

c) $\% \text{Viabilitas} = \frac{358,5}{358,5+5} \times 100\% = 98,62$

(10ppm)

a) $\% \text{Viabilitas} = \frac{164,5}{164,5+12,5} \times 100\% = 92,94$

b) $\% \text{Viabilitas} = \frac{196,5}{196,5+16,5} \times 100\% = 92,25$

c) $\% \text{Viabilitas} = \frac{274}{274+13} \times 100\% = 95,80$

(15ppm)

a) $\% \text{Viabilitas} = \frac{133}{133+14} \times 100\% = 90,48$

b) $\% \text{Viabilitas} = \frac{140}{140+14,5} \times 100\% = 90,61$

c) $\% \text{Viabilitas} = \frac{143}{143+13} \times 100\% = 91,67$

(20ppm)

a) $\% \text{Viabilitas} = \frac{40,5}{40,5+7,5} \times 100\% = 84,38$

$$b) \%Viabilitas = \frac{84}{84+19} \times 100\% = 81,55$$

$$c) \%Viabilitas = \frac{280}{280+51,5} \times 100\% = 84,46$$

Etil asetat

5ppm

$$a) \%Viabilitas = \frac{181}{181+21} \times 100\% = 89,60$$

$$b) \%Viabilitas = \frac{315}{315+31,5} \times 100\% = 90,91$$

$$c) \%Viabilitas = \frac{243}{243+27} \times 100\% = 90,00$$

10ppm

$$a) \%Viabilitas = \frac{168}{168+28,5} \times 100\% = 85,50$$

$$b) \%Viabilitas = \frac{235,5}{235,5+53} \times 100\% = 81,63$$

$$c) \%Viabilitas = \frac{378,5}{378,5+59} \times 100\% = 86,51$$

15ppm

$$a) \%Viabilitas = \frac{160,5}{160,5+55} \times 100\% = 74,48$$

$$b) \%Viabilitas = \frac{111,5}{111,5+41,5} \times 100\% = 72,88$$

$$c) \%Viabilitas = \frac{103}{103+33} \times 100\% = 75,74$$

20ppm

$$\text{a) \%Viabilitas} = \frac{90,5}{90,5+36,5} \times 100\% = 71,26$$

$$\text{b) \%Viabilitas} = \frac{147}{147+63} \times 100\% = 70,00$$

$$\text{c) \%Viabilitas} = \frac{135,5}{135,5+50} \times 100\% = 73,05$$

Etanol

5ppm

$$\text{a) \%Viabilitas} = \frac{255}{255+40,5} \times 100\% = 86,29$$

$$\text{b) \%Viabilitas} = \frac{198,5}{198,5+31} \times 100\% = 86,49$$

$$\text{c) \%Viabilitas} = \frac{151,5}{151,5+31,5} \times 100\% = 82,79$$

10ppm

$$\text{a) \%Viabilitas} = \frac{206,5}{206,5+68} \times 100\% = 75,23$$

$$\text{b) \%Viabilitas} = \frac{90}{90+25,5} \times 100\% = 77,92$$

$$\text{c) \%Viabilitas} = \frac{110,5}{110,5+35,5} \times 100\% = 75,68$$

15ppm

$$\text{a) \%Viabilitas} = \frac{110,5}{110,5+68,5} \times 100\% = 61,73$$

$$\text{b) \%Viabilitas} = \frac{95,5}{95,5+56} \times 100\% = 63,04$$

$$\text{c) \%Viabilitas} = \frac{91}{91+53} \times 100\% = 63,19$$



20ppm

$$\text{a) \%Viabilitas} = \frac{65}{65+70,5} \times 100\% = 47,97$$

$$\text{b) \%Viabilitas} = \frac{83}{83+78,5} \times 100\% = 51,39$$

$$\text{c) \%Viabilitas} = \frac{54,5}{54,5+61} \times 100\% = 47,19$$



Lampiran 12. Tabel Hasil Perhitungan %Viabilitas

Faktor A	Faktor B	Ulangan			TOTAL	Rerata	STD
		1	2	3			
A	5	98,17	98,07	98,62	294,86	98,29	0,29596
	10	92,94	92,25	95,80	281,00	93,67	1,88377
	15	90,48	90,61	91,67	272,76	90,92	0,65099
	20	84,38	81,55	84,46	250,39	83,46	1,65551
B	5	89,60	90,91	90,00	270,51	90,17	0,66916
	10	85,50	81,63	86,51	253,64	84,55	2,57732
	15	74,48	72,88	75,74	223,09	74,36	1,43320
	20	71,26	70,00	73,05	214,31	71,44	1,53047
C	5	86,29	86,49	82,79	255,57	85,19	2,08457
	10	75,23	77,92	75,68	228,83	76,28	1,44185
	15	61,73	63,04	63,19	187,96	62,65	0,80269
	20	47,97	51,39	47,19	146,55	48,85	2,23716
TOTAL		958,02	956,75	964,71	2879,48	959,83	

Faktor A	Faktor B				Total	Rerata
	5	10	15	20		
A (N-Heksan)	294,86	281,00	272,76	250,39	1099,01	274,75
B (Etil Asetat)	270,51	253,64	223,09	214,31	961,55	240,39
C (Ethanol)	255,57	228,83	187,96	146,55	818,92	204,73
Total	820,95	763,47	683,81	611,25	2879,48	
Rerata	273,65	254,49	227,94	203,75		

$$FK = \frac{\sigma^2}{r \times n} = \frac{2879,48^2}{12 \times 3} = \frac{8291385,58}{36} = 230316,27$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Total Perlakuan} &= 98,17^2 + 92,94^2 + 90,48^2 + 84,38^2 + \dots + 48,85^2 - FK \\ &= 236958 - 230316,27 \\ &= 6641,67 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Ulangan} &= \frac{958,02^2 + 956,75^2 + 964,71^2}{12} - FK \\ &= 230319,3127 - 230316,27 \\ &= 3,05 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Perlakuan} &= \frac{294,86^2 + 281,00^2 + 272,76^2 + 250,39^2 + \dots + 146,55^2}{3} - FK \\ &= 236897,22 - 230316,27 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= 6580,95 \\
 \text{JK Galat} &= 6641,67 - 6580,95 \\
 &= 60,72 \\
 \text{JK A} &= \frac{1099,01^2 + 961,55^2 + 818,92^2}{12} - \text{FK} \\
 &= 233585 - 230316,27 \\
 &= 3269,0836 \\
 \text{JK B} &= \frac{820,95^2 + 763,47^2 + 683,81^2 + 611,25^2}{9} - \text{FK} \\
 &= 233118,1 - 230316,27 \\
 &= 2801,88 \\
 \text{JK AB} &= \text{JK Perlakuan} - \text{JK A} - \text{JK B} \\
 &= 6580,95 - 3269,0836 - 2801,8786 \\
 &= 509,99
 \end{aligned}$$

TABEL ANOVA						
SK	Db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Ulangan	2	3,05	1,52	0,60		
Perlakuan	11	6580,95	598,27	236,46	2,22	3,09
A	2	3269,08	1634,54	646,04	3,40	5,61
B	3	2801,88	933,96	369,14	3,01	4,72
AB	6	509,99	85,00	33,59	2,51	3,67
Galat	24	60,72	2,53			
Total	35	13225,67				

Uji berganda duncan			
perlakuan A	1,59062		
Nilai	2	3	
JND 1%	3,955	4,126	
JNT	6,29092	6,562913868	
Perlakuan	rata-rata	Selisih	notasi
C	204,73	0,00	a
B	240,39	35,66	b
A	274,75	34,37	c



Uji berganda duncan			
Perlakuan B	1,37752		
Nilai	2	3	
JND 1%	3,955	4,125	
JNT	5,44809	5,682273	
Perlakuan	rata-rata	Hasil	notasi
20	203,75	0,00	A
15	227,94	24,19	B
10	254,49	26,55	C
5	273,65	19,16	D

Interaksi	0,795312										
Nilai	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
JND 1%	3,955	4,126	4,239	4,322	4,386	4,437	4,48	4,516	4,546	4,573	4,596
JNT	3,145459	3,28146	3,37132718	3,43734	3,48823803	3,5288	3,563	3,591629	3,6154879	3,6369614	3,65525
Perlakuan	Rata-rata	Selisih	Notasi								
C20	48,85	0,00	A								
C15	62,65	13,80	B								
B20	71,44	8,78	C								
B15	74,36	2,93	C								
C10	76,28	1,92	C								
A20	83,46	12,03	D								
B10	84,55	1,08	D								
C5	85,19	1,73	D								
B5	90,17	6,71	E								
A15	90,92	0,75	E								
A10	93,67	3,49	F								
A5	98,29	4,62	G								

Lampiran 13. Perhitungan % Kematian

Rumus:

$$\% \text{kematian} = 100 - \% \text{viabilitas}$$

n-heksan**5ppm**

a) $\% \text{kematian} = 100 - 98,17 = 1,83$

b) $\% \text{kematian} = 100 - 98,07 = 1,93$

c) $\% \text{kematian} = 100 - 98,62 = 1,38$

10ppm

a) $\% \text{kematian} = 100 - 92,94 = 7,06$

b) $\% \text{kematian} = 100 - 92,25 = 7,75$

c) $\% \text{kematian} = 100 - 95,80 = 4,20$

15ppm

a) $\% \text{kematian} = 100 - 90,48 = 9,52$

b) $\% \text{kematian} = 100 - 90,61 = 9,39$

c) $\% \text{kematian} = 100 - 91,67 = 8,33$

20ppm

a) $\% \text{kematian} = 100 - 84,38 = 15,63$

b) $\% \text{kematian} = 100 - 81,55 = 18,45$

c) $\% \text{kematian} = 100 - 84,46 = 15,54$

Etil asetat**5ppm**

a) $\% \text{kematian} = 100 - 89,60 = 10,40$

b) $\% \text{kematian} = 100 - 90,91 = 9,09$

c) $\% \text{kematian} = 100 - 90,00 = 10,00$

10ppm

- a) %kematian = $100-85,50=14,50$
- b) %kematian = $100-81,63=18,37$
- c) %kematian = $100-86,51=13,49$

15ppm

- a) %kematian = $100-74,48=25,52$
- b) %kematian = $100-72,88=27,12$
- c) %kematian = $100-75,74=24,26$

20ppm

- a) %kematian = $100-71,26=28,74$
- b) %kematian = $100-70,00=30,00$
- c) %kematian = $100-73,05=26,95$

Etanol

5ppm

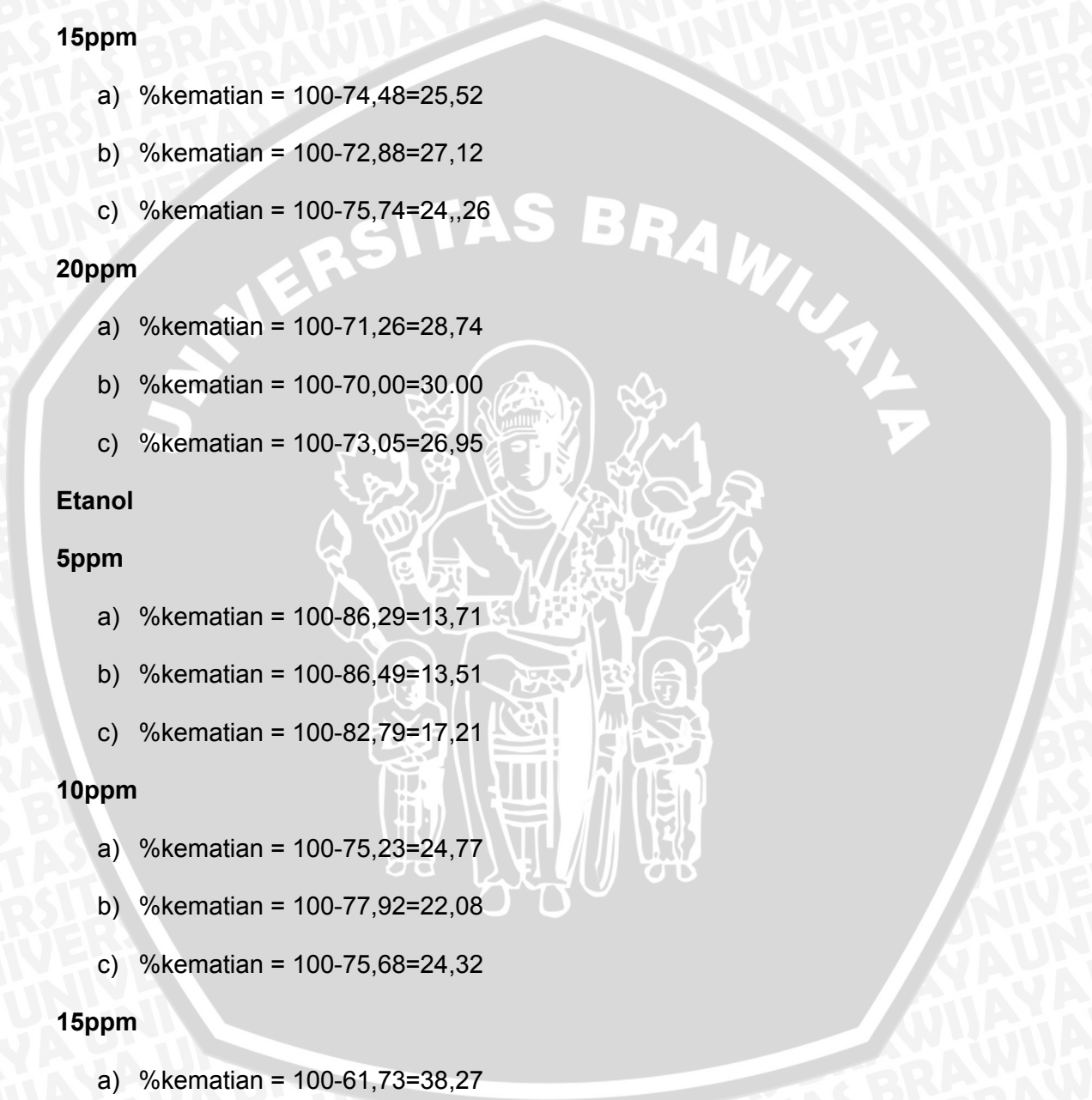
- a) %kematian = $100-86,29=13,71$
- b) %kematian = $100-86,49=13,51$
- c) %kematian = $100-82,79=17,21$

10ppm

- a) %kematian = $100-75,23=24,77$
- b) %kematian = $100-77,92=22,08$
- c) %kematian = $100-75,68=24,32$

15ppm

- a) %kematian = $100-61,73=38,27$
- b) %kematian = $100-63,04=36,96$
- c) %kematian = $100-63,19=36,81$



20ppm

a) $\%kematian = 100 - 47,97 = 52,03$

b) $\%kematian = 100 - 51,39 = 48,61$

c) $\%kematian = 100 - 47,19 = 52,81$



Lampiran 14. Tabel hasil perhitungan % kematian

Faktor A	Faktor B	Ulangan			Total	Rerata	STD
		1	2	3			
A	5	1,83	1,93	1,38	5,14	1,71	0,29596
	10	7,06	7,75	4,20	19,00	6,33	1,88377
	15	9,52	9,39	8,33	27,24	9,08	0,65099
	20	15,63	18,45	15,54	49,61	16,54	1,65551
B	5	10,40	9,09	10,00	29,49	9,83	0,66916
	10	14,50	18,37	13,49	46,36	15,45	2,57732
	15	25,52	27,12	24,26	76,91	25,64	1,43320
	20	28,74	30,00	26,95	85,69	28,56	1,53047
C	5	13,71	13,51	17,21	44,43	14,81	2,08457
	10	24,77	22,08	24,32	71,17	23,72	1,44185
	15	38,27	36,96	36,81	112,04	37,35	0,80269
	20	52,03	48,61	52,81	153,45	51,15	2,23716
Total		241,98	243,25	235,29	720,52	240,17	

TABEL DUA ARAH antara faktor A dan faktor B						
Faktor A	Faktor B				Total	Rata-rata
	5	10	15	20		
A (N-Heksan)	5,14	19,00	27,24	49,61	100,99	25,25
B (Etil Asetat)	29,49	46,36	76,91	85,69	238,45	59,61
C (Ethanol)	44,43	71,17	112,04	153,45	381,08	95,27
Total	79,05	136,53	216,19	288,75	720,52	
Rata-rata	26,35	45,51	72,06	96,25		

$$FK = \frac{\sigma^2}{r \times n} = \frac{720,17^2}{12 \times 3} = \frac{519154}{36} = 14420,943$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Total Perlakuan} &= 1,83^2 + 7,06^2 + 9,52^2 + 15,63^2 + \dots + 51,15^2 - FK \\ &= 21062,6 - 14420,943 \\ &= 6641,673 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Ulangan} &= \frac{241,98^2 + 243,25^2 + 235,29^2}{12} - FK \\ &= 14424 - 14420,943 \\ &= 3,05 \end{aligned}$$

$$JK \text{ Perlakuan} = \frac{5,14^2 + 19,00^2 + 27,24^2 + 49,61^2 + 29,49^2 + \dots + 153,45^2}{3} - FK$$

$$= 21001,9 - 14420,943$$

$$= 6580,95$$

$$\text{JK Galat} = 6641,67 - 6580,95$$

$$= 60,72$$

$$\text{JK A} = \frac{100,99^2 + 238,45^2 + 381,08^2}{12} - \text{FK}$$

$$= 17690,027 - 14420,943$$

$$= 3269,0836$$

$$\text{JK B} = \frac{79,05^2 + 136,53^2 + 216,19^2 + 288,75^2}{9} - \text{FK}$$

$$= 17222,822 - 14420,943$$

$$= 2801,88$$

$$\text{JK AB} = \text{JK Perlakuan} - \text{JK A} - \text{JK B}$$

$$= 6580,95 - 3269,0836 - 2801,8786$$

$$= 509,99$$

TABEL ANOVA

SK	Db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Ulangan	2	3,0465508	1,5232754	0,60207		
Perlakuan	11	6580,9511	598,26828	236,462	2,22	3,09
A	2	3269,0836	1634,5418	646,042	3,4	5,61
B	3	2801,8786	933,95954	369,142	3,01	4,72
AB	6	509,98889	84,998148	33,595	2,51	3,67
Galat	24	60,722019	2,5300841			
Total	35	13225,671				

Uji berganda Duncan			
Perlakuan B	1,37752		
Nilai	2	3	
JND 1%	3,93	4,099	
JNT	5,41366	5,64646	
Perlakuan	rata-rata	selisih	notasi
5	26,35	0,00	a
10	45,51	19,16	b
15	72,06	26,55	c
20	96,25	24,19	d



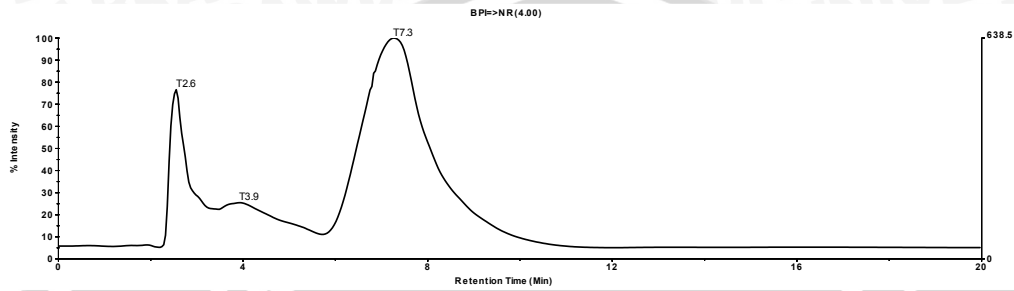
Interaksi	0,79531191										
Nilai	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
JND 1%	3,955	4,126	4,239	4,322	4,386	4,437	4,48	4,516	4,546	4,573	4,596
JNT	3,1454586	3,2814569	3,371327	3,43734	3,48824	3,53	3,56	3,5916	3,6155	3,636961	3,65525
Perlakuan	Rata-rata	selisih	Notasi								
A5	1,71	0,00	A								
A10	6,33	4,62	B								
A15	9,08	2,75	B								
B5	9,83	3,49	C								
C5	14,81	4,98	D								
B10	15,45	0,64	D								
A20	16,54	1,08	D								
C10	23,72	7,19	E								
B15	25,64	1,92	E								
B20	28,56	4,84	F								
C15	37,35	8,78	G								
C20	51,15	13,80	H								



Lampiran 15. Hasil LCMS

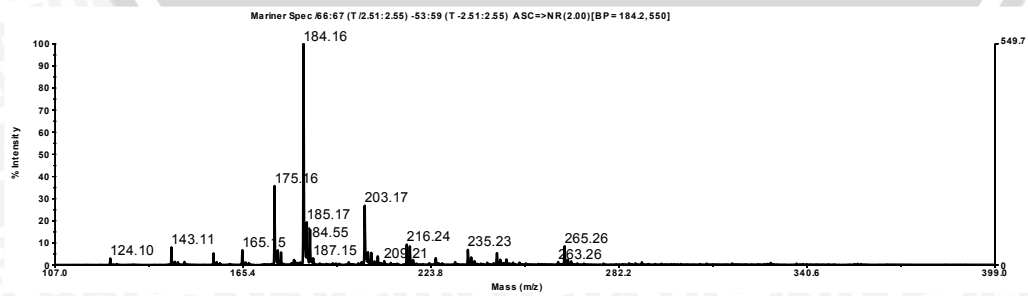
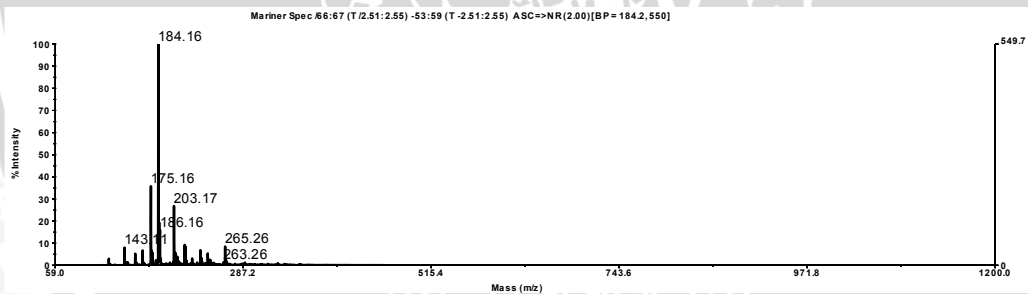
Fati Sargassum
 Vol injection 2 ul
 Flow 0.05 ml/min
 Collumn C-18 (15mm x 1 mm)
 Eluent MeOH
 Operating by : Puspa D N Lotulung

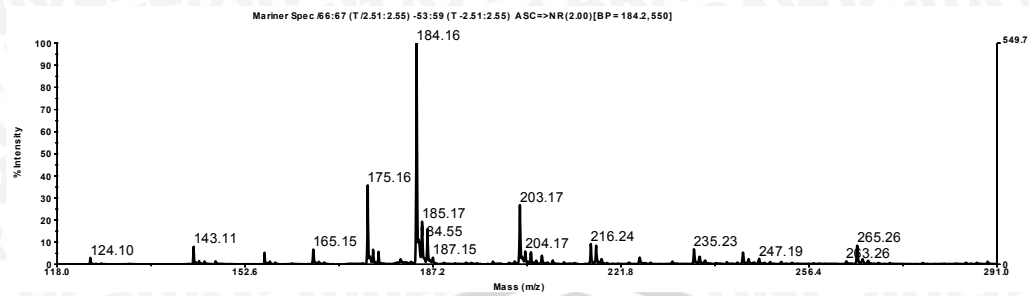
LC MS –ESI pos ion



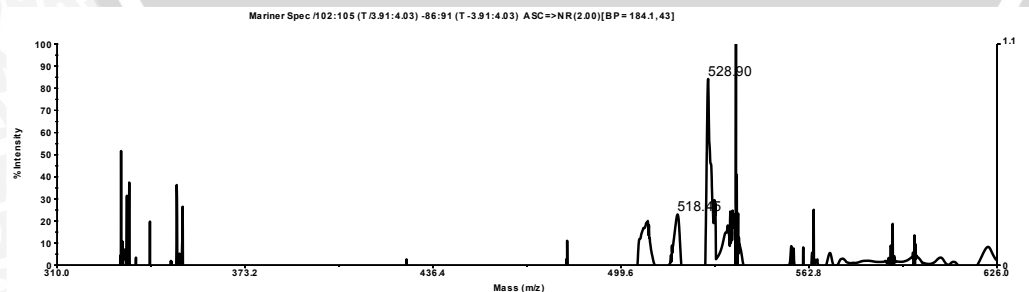
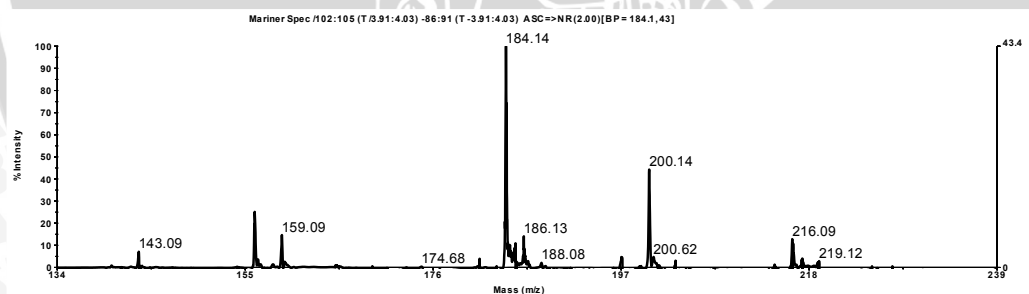
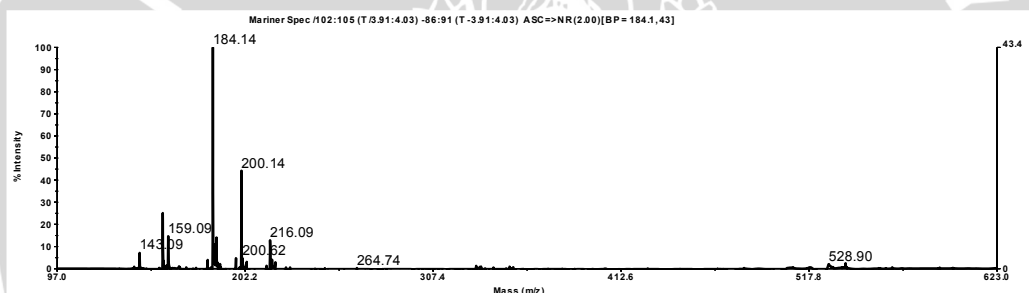
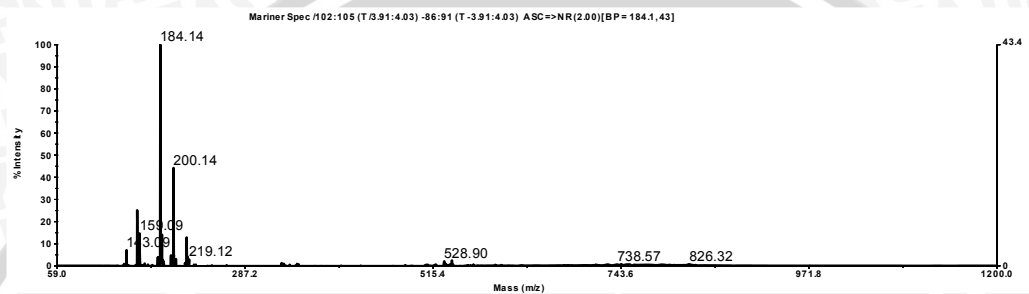
Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	2.553000	2.203833	3.486667	489	6399.44
2	3.914617	3.486667	5.702533	162	3021.00
3	7.256433	5.702533	12.027616	639	28181.55

Rt 2.55





Rt 3.91



Rt 7.25

