

Toxicity Assay of 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyde Using *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Reinner I. Lerrick, Paskalia A. Ximenes, Suwari

Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Nusa Cendana

Article Received: 12 Oktober 2023

Article Accepted: 10 November 2023

Abstract

Aromatic aldehydes including chalcones are known to have various biological activities. Such compound i.e. 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde has also proven to be a COX-II inhibitor anti-inflammation and colon and breast cancer chemoprotective agent. This study aims to determine the toxicity of 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde against *artemia salina* L. larvae according to the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The results showed that the 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde has a toxic effect with its LC₅₀ is 70.12 µg/mL.

Keywords: Chalcone, 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde, Toxicity, BSLT, *Artemia salina* Leach

Abstrak

Aldehida aromatik diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis. Salah satu golongan aldehida aromatik 2,4,5-trimetoksibenzaldehida merupakan Inhibitor COX-II yang dilaporkan memiliki banyak fungsi seperti anti-peradangan, pengurangan rasa sakit dan efek kemoprotektif terhadap kanker usus besar dan payudara. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas dari senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida terhadap larva udang *artemia salina* L. menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Uji toksisitas dengan Metode BSLT digunakan sebagai uji pendahuluan untuk mencari senyawa bioaktif antikanker baru. Efek toksik dilihat dari persentase kematian larva *artemia salina* L. menggunakan analisis probit untuk mengetahui nilai LC₅₀. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida memiliki efek toksik dengan nilai LC₅₀ adalah 70,12 µg/mL.

Kata kunci: Kalkon, 2,4,5-trimetoksibenzaldehida, toksisitas, BSLT, *Artemia salina* Leach

PENDAHULUAN

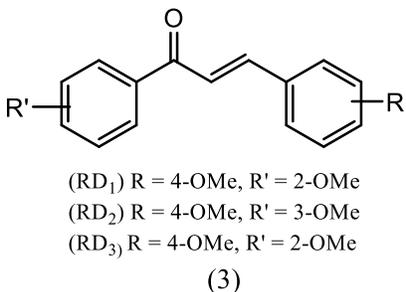
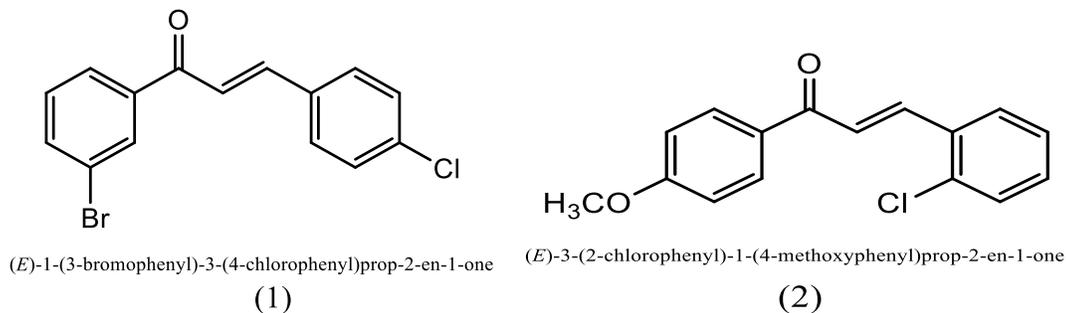
Kanker merupakan penyakit yang muncul dari transformasi sel normal menjadi sel tumor, biasanya dimulai dengan lesi prakanker yang kemudian menjadi tumor ganas¹. Kanker juga menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. Menurut data International Agency for Research on Cancer (IARC), menunjukkan jumlah penderita kanker di dunia pada tahun 2020 mencapai 19,3 juta kasus dengan angka kematian sampai 10 juta jiwa. Dibandingkan dengan

*Corresponding Author : Jl. Adisucipto-Penfui Kupang 85110 telp. (+62380-8037977)
e-mail: reinner_lerrick@staf.undana.ac.id

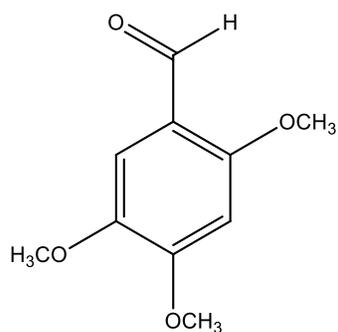
tahun 2018 sebelumnya yang mencatat ada 18,1 juta kasus dengan jumlah kematian 9,6 juta jiwa². Di Indonesia, pada tahun 2020 kasus kanker sejumlah 396.914 dengan banyaknya kematian lebih dari 22 ribu kasus yang dibandingkan tahun 2018 jumlah penderita kanker mencapai 348.809 kasus³. Angka kejadian kanker ini terus meningkat dari tahun ke tahun. Walaupun sudah banyak penelitian tentang berbagai senyawa untuk menjadi obat antikanker masih saja menunjukkan hasil yang tidak memuaskan dengan efek samping yang dapat merusak sel-sel normal tubuh¹.

Upaya penemuan obat kanker yang efektif dan selektif sebagai usaha pengobatan kanker secara kemoterapi menjadi sangat penting saat ini, di samping pengobatan secara fisik seperti pembedahan dan radioterapi. Kemoterapi adalah prosedur medis yang menggunakan obat-obatan untuk membunuh sel kanker dalam tubuh⁴. Pengembangan penelitian telah menghasilkan ratusan senyawa metabolit sekunder dengan puluhan senyawa baru yang memiliki efek fisiologis yang sangat tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker (antikanker). Salah satu senyawa yang telah terbukti memiliki berbagai aktivitas biologis adalah golongan aldehida aromatik.

Aldehida aromatik tersubstitusi tertentu telah digunakan untuk mendeteksi urea dan pigmen empedu dalam urin anak-anak, demam berdarah, campak dan berbagai infeksi⁵. Senyawa aldehida aromatik juga sering dipakai dalam pembuatan senyawa antikanker, seperti penelitian yang dilakukan oleh Brahmana⁶ yakni senyawa analog kalkon yang diperoleh dari hasil reaksi 3-bromo asetofenon dan 4-kloro benzaldehid yaitu (E)-1-(3-bromofenil)-3-(4-klorofenil) prop-2-en-1-on (1) yang mempunyai nilai $LC_{50} = 3,98 \mu\text{g/mL}$ terhadap larva *Artemia salina* Leach. Selain itu hasil penelitian yang dilakukan oleh Handayani⁷ mensintesis analog kalkon dengan mereaksikan 4-metoksiasetofenon dengan 2-klorobenzaldehid menggunakan katalis kalium hidroksida menghasilkan senyawa (E)-3-(2-klorofenil)-1-(4'-metoksifenil)prop-2-en-1-on (2) memiliki sifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan LC_{50} adalah $3,54 \mu\text{g/mL}$. Penelitian yang dilakukan oleh Dona⁸ juga menunjukkan senyawa analog kalkon (RD₁)-(RD₃) (3) yang diperoleh melalui reaksi kondensasi keton aromatik dan aldehid aromatik tersubstitusi mono-metoksi memiliki potensi sebagai senyawa antikanker dengan nilai LC_{50} berturut-turut RD₁ $1,045 \mu\text{g/mL}$; RD₂ $2,008 \mu\text{g/mL}$; RD₃ $0,617 \mu\text{g/mL}$ terhadap larva *Artemia salina* Leach. Aktivitas biologis dan kegunaan praktis yang tinggi dari aldehida aromatik inilah menjadi dasar untuk menemukan senyawa baru dengan nilai terapeutik aktif. Salah satu jenis senyawa aldehida aromatik adalah 2,4,5-trimetoksibenzaldehida.



Senyawa asaronaldehida atau 2,4,5-trimetoksibenzaldehida (TMBA) adalah inhibitor selektif siklooksigenase II (COX-II) dan biasanya ditemukan pada beberapa jenis tanaman seperti *Mosla scabra*, *Alpinia flabellata*, dan organisme lain⁹. Inhibitor COX-II telah dilaporkan memiliki banyak fungsi seperti anti-peradangan, pengurangan rasa sakit dan efek kemoprotektif terhadap kanker usus besar dan payudara¹⁰. Struktur senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida juga memiliki gugus trimetoksi dimana senyawa aromatik yang mengandung gugus trimetoksi diketahui menunjukkan aktivitas antikanker⁸, antibakteri dan antijamur yang baik¹¹. Oleh karena itu senyawa 2,4,5-TMBA (4) bisa menjadi kandidat senyawa antikanker. Hal ini perlu dibuktikan melalui tahap pengujian yakni uji toksisitas.



(4)

Uji toksisitas dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Uji toksisitas secara *in vitro* yang biasanya digunakan adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan metode uji toksisitas yang menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai bahan uji.

Metode ini biasanya digunakan untuk mencari senyawa antikanker baru yang berasal dari tumbuhan. Pengujian letalitas sederhana ini juga memiliki spektrum aktivitas farmakologi yang luas, pengerjaan yang mudah, murah, cepat dan cukup akurat¹².

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan uji toksistas senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida (TMBA) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi toksisitas dari senyawa 2,4,5-TMBA (4) dengan melihat presentase kematian larva udang *artemia salina* L. sehingga dapat diketahui nilai LC₅₀ dari senyawa uji tersebut. Penggunaan metode BSLT dipilih karena sensitivitasnya yang tinggi terhadap senyawa-senyawa organik, hanya sedikit sampel yang digunakan dan hasilnya dapat memberikan indikasi awal tentang potensi toksisitas senyawa terhadap organisme hidup.

Larva Udang *Artemia salina* Leach

Kista (telur istirahat) udang *artemia* L. memerlukan waktu 24-36 jam untuk menetas menjadi nauplius. Larva diberikan makanan larutan ragi instan 0,06% karena mengandung mikroorganisme yang merupakan makanannya. Uji toksisitas dengan metode BSLT menggunakan larva berumur 48 jam, karena pada umur ini larva sudah memiliki organ tubuh yang lengkap dan aktif beregenerasi, juga sudah cukup sensitif terhadap zat-zat kimia atau bahan-bahan beracun yang ada dalam lingkungan. Bentuk tubuh dari larva *artemia* L. memiliki tubuh transparan dengan beberapa pasang kaki untuk berenang dan menangkap makanan mikroskopis dari air dan aktif bergerak. Saat mati, larva akan kehilangan transparansinya dan berubah menjadi putih atau keabu-abuan, tidak bergerak, serta struktur tubuh yang rusak sehingga tidak terlihat jelas.

Toksistas 2,4,5-TMBA dengan Metode BSLT

Pada dasarnya, metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) berfungsi untuk mengukur tingkat kematian (mortalitas) larva udang *artemia* L. setelah terpapar oleh senyawa yang akan diuji. Prinsip kerja BSLT ini berdasarkan pada asumsi bahwa senyawa yang lebih toksik akan menyebabkan kematian larva udang lebih banyak dalam waktu yang lebih singkat. Larva udang *artemia* L. ditempatkan dalam larutan dengan berbagai konsentrasi, dan kemudian tingkat mortalitas diamati selama periode waktu tertentu.

Rata-rata kematian larva udang didapat dari total kematian untuk masing-masing konsentrasi dibagi dengan jumlah replikasi (3 kali). Sedangkan persentase kematian diperoleh dengan membagi rata-rata kematian larva masing-masing konsentrasi dengan jumlah larva yang

diuji pada masing-masing perlakuan (10 ekor) dan dikalikan dengan 100%. Data pengamatan kematian larva udang setelah 24 jam ditunjukkan pada Table 1.

Tabel 1 Pengaruh berbagai konsentrasi senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida (4) terhadap kematian larva udang *Artemia salina Leach* setelah 24 jam

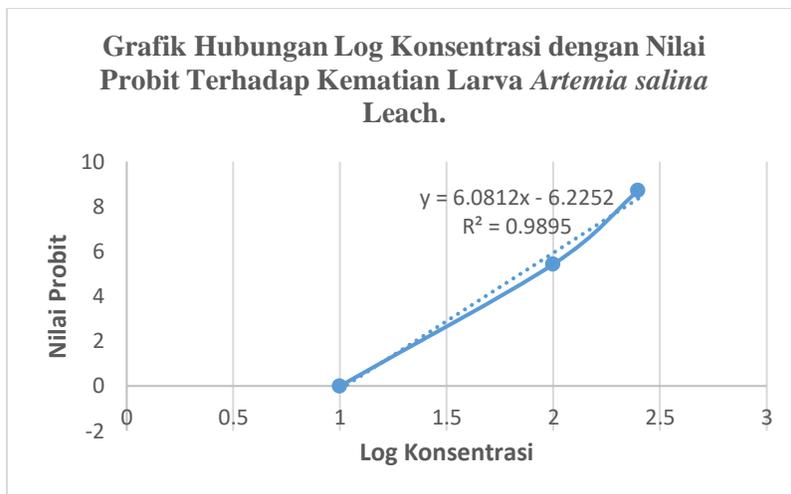
Konsentrasi senyawa 2,4,5-TMBA ($\mu\text{g/mL}$)	Hasil Uji				
	Perlakuan			Rata-rata Kematian	Persen Kematian (%)
	I	II	III		
0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
100	7	7	6	6,67	66,7
250	10	10	10	10	100
500	10	10	10	10	100
1000	10	10	10	10	100

Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa larva udang pada konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$ (kontrol) tidak terjadi kematian, ini berarti media uji atau lingkungan uji tidak memberikan dampak toksik pada larva. Sehingga adanya mortalitas larva dipastikan karena pengaruh konsentrasi senyawa uji (4). Pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ juga tidak menyebabkan kematian pada larva udang, ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi ini senyawa 2,4,5-TMBA (4) tidak memberikan efek toksik. Sedangkan, pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan peningkatan yang cukup besar dengan persentase kematian mencapai 66,7%, hal ini menunjukkan senyawa 2,4,5-TMBA (4) pada konsentrasi ini memberikan efek sangat toksik dengan mematikan lebih dari 50% populasi larva. Kemudian pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ mengakibatkan kematian larva mencapai 100%, hal ini menunjukkan pada konsentrasi ini merupakan konsentrasi maksimum efek toksik dari senyawa 2,4,5-TMBA.

Data tersebut menunjukkan semakin besar konsentrasi senyawa 2,4,5-TMBA (4) yang diberikan semakin besar pula efek toksik yang terjadi pada larva, hal ini selaras dengan teori yakni semakin besar konsentrasi senyawa atau ekstrak yang diberikan semakin besar juga efek toksiknya terhadap organisme uji¹³. Persentase kematian larva dipakai untuk menentukan nilai probit yang kemudian dihitung nilai LC_{50} .

Nilai LC_{50} adalah nilai konsentrasi dari paparan suatu zat kimia yang menyebabkan kematian pada individu organisme uji dalam kurun waktu tertentu. Nilai LC_{50} ini sebagai tolak ukur dalam menentukan kriteria efek toksik yang diberikan pada hewan uji. Ada berbagai jenis metode yang digunakan untuk menghitung nilai LC_{50} , metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode analisis probit.

Metode analisis probit digunakan untuk memodelkan respon biologis terhadap dosis zat kimia, dan dapat memberikan perkiraan yang akurat tentang nilai LC_{50} berdasarkan distribusi probit dari respons tersebut. Selain itu, data juga dapat diolah menggunakan *Microsoft excel* dengan grafik linear hubungan antara nilai probit dan log konsentrasi. Grafik tersebut memberikan data persamaan $Y=a+bX$ dengan y sebagai nilai probit dan x sebagai log konsentrasi serta nilai R^2 . Nilai R^2 untuk mengukur sejauh mana suatu variable berkorelasi. Nilai R^2 dikatakan baik jika mendekati 1.



Gambar 1. Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Probit Kematian Larva

Pada metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), suatu senyawa murni dianggap menunjukkan aktivitas sitotoksik bila mempunyai nilai LC_{50} kecil dari $200 \mu\text{g/mL}$ ¹³. Pada hasil penelitian ini, baik secara manual maupun dengan grafik regresi linear *Microsoft excel* (Gambar 1), mendapat persamaan regresi yang sama sehingga didapat nilai LC_{50} adalah $70.12 \mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut masuk ke dalam rentang nilai $LC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ kategori toksik.

Sifat toksik dari senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida (TMBA) dapat disebabkan oleh beberapa faktor kimia dan biologis yang berkaitan dengan struktur molekulnya. Struktur kimia yang kompleks dari 2,4,5-trimetoksibenzaldehida (TMBA) dapat membuatnya reaktif terhadap berbagai molekul dalam sistem biologis, seperti protein dan enzim. Hal ini mengganggu fungsi normal dari molekul-molekul tersebut sehingga dapat mengakibatkan kerusakan jaringan, organ, dan sistem tubuh yang lebih luas, seperti saluran pencernaan, sistem saraf, dan sistem pernapasan larva yang berakibat pada kematian larva¹⁴.

KESIMPULAN

Senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida memiliki efek toksik terhadap *Artemia salina* L dengan nilai LC₅₀ adalah 70,12 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ikhtiarudin, Ihsan, Lelani, A.Z, Hilwan Y.T, Yuharmen.2014. Sintesis Dan Uji Toksisitas Senyawa Analog Kalkon Turunan 2-Hidroksiasetofenon Dan Halobenzaldehid. *Jurnal Photon*. 5(1):57-63
2. Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buella, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395-400
3. Pusdatin Kementerian Kesehatan RI. 2019. InfoDATIN: Beban Kanker di Indonesia. In Pusat Data dan Informasi. https://scholar.google.com/scholar?hl=id&as_sdt=0%2C5&q=Infodatin%3A+Beban+Kanker+di+Indonesia&btnG=
4. WHO. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2020: Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2020 [Internet]. 2022 [cited 2022 april 21]. Available from: <http://www.globocan.iarc.fr/>
5. Soni, P. K., Halve, A. K., & Shinde, C. P. 2015. *Remarkable Utility Of Aromatic Aldehydes, Halogens And Cyano Groups In The Synthesis Of Pharmacologically Significant Compounds: A Review*
6. Brahmana, E. M., Teruna, H. Y., & Zamri, A. 2013. Sintesis dan Uji Toksisitas Senyawa (E)-1-(3-Bromofenil)-3-(4-Klorofenil) prop-2-en-1-on. *Jurnal ICA (Indonesian Chemia Acta)*, 4(1), 21-25
7. Handayani, S., Teruna, H. Y., & Zamri, A. 2013. Sintesis Analog Kalkon (E)-3-(2-klorofenil)-1-(4'-metoksi fenil)-prop-2-en-1-on dan Uji Toksisitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethal Test (BSLT). *Jurnal ICA (Indonesian Chemia Acta)*, 4(1), 17-20
8. Dona, R., & Zamri, A. 2015. Sintesis Dan Uji Toksisitas Senyawa Analog Kalkon Tersubstitusi Metoksi. *Photon: Jurnal Sain dan Kesehatan*, 5(2), 9-14
9. Zhao, H., Caldora, H. P., Turner, O., Douglas, J. J., & Leonori, D. 2022. A Desaturative Approach for Aromatic Aldehyde Synthesis via Synergistic Enamine, Photoredox and Cobalt Triple Catalysis. *Angewandte Chemie*, 134(18), e202201870
10. Liu, B., Qu, L., & Yan, S. 2015. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer cell international*, 15(1), 1-6

11. Rajput, S.B., Shinde, R.B., Routh, M.M., & Karuppayil, S.M. 2013. Anti-Candida properties of asaronaldehyde of *Acorus gramineus* rhizome and three structural isomers. *Chinese Medicine*, 8(18), 1-8
12. Muaja, A.D., Koleangan, H.S.J., & Runtuwene, M.R.J. 2013. Uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode soxhletasi. *Jurnal MIPA*, 2(2) 115-118
13. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. J., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(05), 31-34
14. Irianti, T. T., Sugiyanto., Kuswandi, M., Nuranto, S. 2017. *Toksikologi Lingkungan*. Ugm Press.

METODOLOGI

Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Air laut yang digunakan dalam penetasan larva udang merupakan *artificial sea water* yang mengandung : 23 g NaCl, 11 g MgCl₂.6H₂O, 4 g Na₂SO₄, 1,3 g CaCl₂.2H₂O, 0,7 g KCl dalam aquades 1000 mL. pH *artificial sea water* dikontrol dengan ditambahkan Na₂CO₃, untuk lingkungan hidup larva *Artemia Salina* Leach berkisar 7,5-8,5. *Artificial sea water* yang digunakan sebanyak 2000 mL dan dimasukkan dalam wadah plastik tempat pembiakan.

Wadah plastik berbentuk persegi panjang dibagi menjadi dua ruang, yaitu ruang terang dan ruang gelap yang ditutupi dengan menggunakan selotip hitam. Kedua ruang tersebut dibatasi dengan sterofoam. Bagian tengah dari sterofoam dilubangi sebagai tempat keluarnya larva yang telah menetas, diberikan aerator sebagai oksigen dan lampu pijar sebagai pencahayaan yang berguna untuk menghangatkan suhu pada proses pembiakan dan merangsang menetasnya telur. Kista udang *Artemia salina* yang dipakai sebanyak 50 mg dan dimasukkan di dalam ruang gelap dalam wadah pembiakan.

Telur akan menetas setelah 24 jam, dan larva akan berenang secara alami menuju ruang terang. Kemudian larva dipindahkan ke wadah lainnya dengan keadaan yang sama (air laut dengan pH berkisar 7,5-8,5 dan seluruh bagian wadah terkena cahaya lampu pijar) dan ditambahkan 15 mL larutan ragi 0,06 % sebagai makanan untuk larva. Larva yang digunakan untuk hewan uji pada metode BSLT adalah larva yang sudah berumur 48 jam, aktif bergerak dan bersifat fototropik.

Pembuatan Suspensi Ragi

Ragi ditimbang sebanyak 0,009 g kemudian dilarutkan dengan air laut 15 mL. Larutan ragi ini digunakan untuk memberi makan larva udang yang berumur 24 jam dan pada saat dilakukan pengujian.

Pembuatan Konsentrasi Senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida

Sampel senyawa 2,4,5-trimetoksibenzaldehida yang diuji dalam uji toksisitas ini adalah hasil sintesis dari minyak calamus oleh peneliti sebelumnya. Sampel senyawa 2,4,5-TMBA (4) sebanyak 10 mg dilarutkan dengan aseton dalam labu takar 10 mL (larutan induk, konsentrasi 1000 µg/mL), kemudian dari larutan induk dibuat dengan cara pengenceran bertingkat, menggunakan rumus pengenceran :

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume awal

M_1 = Konsentrasi awal

M_2 = Konsentrasi akhir

V_2 = Volume akhir

Pelarut yang digunakan adalah aseton, karena senyawa 2,4,5-TMBA (4) dapat larut didalamnya dan juga karena aseton bersifat volatil yang cepat menguap serta murah dan mudah didapat. Pada uji ini, variasi konsentrasi larutan (4) dalam aseton adalah 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL dan 10 µg/mL merujuk pada penelitian yang telah dilakukan oleh Parra dkk., (2001). Pemilihan variasi konsentrasi ini untuk melihat pengaruh konsentrasi senyawa uji dengan respon biologis dan mencari nilai LC50 yang tepat karena konsentrasi yang mematikan lebih dari 50%. Setiap konsentrasi diambil 1 mL dan dimasukkan dalam masing-masing vial yang diberi label. Kemudian diuapkan pelarutnya dengan desikator sampai semua pelarut habis. Senyawa uji (4) siap untuk dilanjutkan pada tahap berikutnya yakni uji toksistas dengan menggunakan metode BSLT.

Pengelompokan Perlakuan Terhadap *Artemia Salina* Leach.

Dalam pengujian toksisitas ini dibuat 6 pengelompokan perlakuan yang dilakukan 3 kali pengulangan untuk masing-masing kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok 1 sebagai kontrol yaitu vial yang berisi DMSO 50 µL serta 10 larva udang bersama air laut buatan.
2. Kelompok 2 yaitu vial yang berisi sampel senyawa 2,4,5-TMBA 10 µg dan DMSO 50 µL, serta 10 larva udang bersama air laut buatan.

3. Kelompok 3 yaitu vial yang berisi sampel senyawa 2,4,5-TMBA 100 µg dan DMSO 50 µL, serta 10 larva udang bersama air laut buatan.
4. Kelompok 4 yaitu vial yang berisi sampel senyawa 2,4,5-TMBA 250 µg dan DMSO 50 µL, serta 10 larva udang bersama air laut buatan.
5. Kelompok 5 yaitu vial yang berisi sampel senyawa 2,4,5-TMBA 500 µg dan DMSO 50 µL, serta 10 larva udang bersama air laut buatan.
6. Kelompok 6 yaitu vial yang berisi sampel senyawa 2,4,5-TMBA 1000 µg dan DMSO 50 µL, serta 10 larva udang bersama air laut buatan.

Prosedur Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Setiap vial ditambahkan 50 µL DMSO dan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach bersama air laut sampai batas kalibrasi 5 mL. Kemudian pada masing-masing vial ditambahkan 1 tetes larutan ragi instan sebagai makanan larva. Vial disimpan dekat lampu pijar agar temperatur tetap stabil. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam pada masing-masing vial. Data yang diperoleh dianalisis untuk menentukan nilai LC50 dengan metode kurva menggunakan tabel analisis probit.

Pengolahan dan Analisis Data

Hasil pengamatan kematian larva pada setiap konsentrasi, dianalisis efek toksisitasnya dengan rumus persentase kematian:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva total awal}} \times 100\%$$

Hasil persentase dibandingkan dengan kontrol, jika pada vial kontrol ada yang mati maka digunakan rumus abbot:

$$\% \text{ Kematian Larva Udang} = \frac{T - K}{10} \times 100\%$$

Dimana : T = jumlah larva mati,
K = jumlah larva mati pada kontrol
10 = jumlah larva uji

Kemudian menentukan log konsentrasi dan dibuat grafik dengan persamaan garis lurus (Metode Hubert) hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi:

$$Y = a + bX$$

Dimana : Y = nilai probit,
X = log konsentrasi x 100
a = intersep
b = slope

Nilai intersep (a) dan slope (b) dapat dihitung dengan rumus:

$$b = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2} \quad \text{dan} \quad a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

Analisis data ini juga dapat melalui Microsoft Office Excel dengan grafik linear hubungan antara nilai probit dan log konsentrasi. Sehingga dapat dihitung nilai LC50 dengan mensubstitusikan nilai 5 (probit 50% kematian hewan uji) sama dengan Y dalam persamaan garis lurus dan didapat nilai X yang merupakan nilai log konsentrasi.

$$LC_{50} = \text{anti log } X$$