

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi

Cacing tanah diperoleh dari tempat budidaya cacing tanah di daerah Cibodas, Lembang. Determinasi cacing tanah dilakukan di Museum Zoologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

4.2. Pembuatan Simplisia

Cacing tanah yang cirinya sudah mempunyai kalung dipuasakan selama 2-3 jam, lalu dicuci dengan air mengalir kemudian setelah bersih direbus selama ± 60 menit, kemudian ditiriskan. Setelah itu simplisia dimasukkan ke dalam oven dengan suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$, kemudian diangkat. Simplisia disimpan pada wadah tertutup rapat.

4.3. Pengujian Parameter Standar Simplisia

4.3.1. Organoleptik

Parameter organoleptik dilakukan dengan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa dari simplisia yang diuji.

(Depkes RI, 2000:31)

4.3.2. Kadar air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan metode gravimetri. Dimasukkan lebih kurang 10 gram simplisia dan ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Dilanjutkan dengan pengeringan dan ditimbang pada dengan interval waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000:17).

4.3.3. Kadar abu total

Lebih kurang 2-3 gram simplisia yang telah ditumbuk dan ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, diratakan, lalu dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas dan disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:17).

Kadar abu total dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\%$$

4.3.4. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui krus kaca atau kertas saring bebas abu, dicuci

dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Dihitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:17).

Kadar abu tidak larut asam dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\%$$

4.3.5. Kadar sari larut air

5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan 18 jam. Lalu disaring dan diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 10°C hingga bobot tetap. Kadar senyawa dihitung dalam persen terhadap simplisia awal (Depkes RI, 2000:31).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat cawan isi} - \text{berat cawan kosong}}{\text{berat simplisia awal}} \times \frac{100}{20} \times 100$$

4.3.6. Kadar sari larut dalam etanol

5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan 18 jam. Selanjutnya maserat disaring cepat dengan menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Residu dipanaskan pada

suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar senyawa larut etanol (95%) dihitung dalam persen terhadap simplisia awal (Depkes RI, 2000:31-32).

$$\text{Kadar senyawa larut etanol} = \frac{\text{berat cawan isi} - \text{berat cawan kosong}}{\text{berat simplisia awal}} \times \frac{100}{20} \times 100$$

4.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan kandungan kimia golongan alkaloid, polifenolat, tanin, flavonoid, monoterpen, seskuiterpen, steroid, triterpenoid, kuinon, dan saponin (Farnsworth, 1966:245-266).

4.4.1. Alkaloid

Simplisia ditempatkan dalam tabung reaksi, diasamkan dengan asam klorida 2N, lalu disaring. Filtrat dibasakan dengan larutan amonia 10%, kemudian ditambahkan kloroform dan dikocok kuat-kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian ke dalamnya ditambahkan asam klorida 2 N lalu dikocok kuat-kuat sampai terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, dan dibagi tiga bagian. Pada bagian 1 ditambahkan pereaksi Mayer dan adanya endapan putih atau kekeruhan menandakan positif alkaloid, pada bagian 2 ditambahkan pereaksi Dragendorff dan adanya endapan jingga-kuning atau kekeruhan menandakan positif alkaloid, dan bagian 3 digunakan sebagai blangko (Farnsworth, 1966:245).

4.4.2. Senyawa polifenolat

Simplisia ditempatkan dalam tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau,

merah-ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:255).

4.4.3. Tanin

Sejumlah kecil simplisia ditempatkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan gelatin 1% ditambahkan ke dalam filtrat. Adanya endapan putih menandakan positif tanin (Farnsworth, 1966:264).

4.4.4. Flavonoid

Simplisia ditempatkan dalam tabung reaksi, lalu dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N, dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Diambil alkohol ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dikocok kuat-kuat. Warna merah, kuning, jingga yang timbul pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Farnsworth, 1966:363).

4.4.5. Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Simplisia digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terbentuknya warna-warna menandakan positif senyawa mono dan seskuiterpen (Depkes RI, 1977:132).

4.4.6. Senyawa kuinon

Sejumlah kecil simplisia ditempatkan dalam tabung reaksi, dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan kalium hidroksida 5% ditambahkan ke

dalam filtrat dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.4.7. Saponin

Sejumlah kecil simplisia ditempatkan dalam tabung reaksi, dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit, lalu setelah dingin dikocok kuat-kuat dan terjadinya busa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin (Farnsworth, 1966:257)

4.4.8. Triterpen dan steroid

Simplisia sebanyak 50 mg digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Libermann Burchard. Terjadinya warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:257-259).

4.5. Ekstraksi

Simplisia ditimbang sebanyak 1 kilogram. Simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut air sebanyak 6 L ditambah dengan kloroform dalam maserator selama 3x24 jam dengan penggantian pelarut setiap 24 jam dan sesekali diaduk untuk menghindari penjenuhan pelarut. Ekstrak cair ditampung lalu dipekatkan. Selanjutnya ekstrak didinginkan dan disimpan di dalam wadah tertutup rapat. Ekstrak dipekatkan dengan pengadukan dan

pemanasan, kemudian ekstrak yang sudah mulai mengental dipanaskan di oven dengan suhu $\pm 90^{\circ}\text{C}$.

4.6. Fraksinasi

Ekstrak yang telah dipekatkan difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan alat corong pisah. Ekstrak dilarutkan dalam akuades, dimasukkan ke dalam corong pisah lalu ditambahkan larutan n-heksana dengan volume sebanding. Campuran dikocok dengan sesekali dibuka pipanya untuk mengeluarkan udara yang dihasilkan, didiamkan hingga terbentuk dua lapisan kemudian fraksi n-heksana ditampung dan dipekatkan.

Fraksi yang tidak larut n-heksana difraksinasi kembali menggunakan etil asetat. Fraksi ditambah etil asetat dengan volume sebanding dimasukkan ke dalam corong pisah, dikocok dengan sesekali dibuka pipanya untuk mengeluarkan udara yang dihasilkan, didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, kemudian fraksi etil asetat ditampung dan dipekatkan. Selanjutnya diperoleh fraksi air berupa lapisan yang tidak larut dalam etil asetat dan dipekatkan (Tengo dkk, 2013:3).

4.7. Pemantauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ketiga fraksi ditotolkan pada plat KLT, kemudian plat KLT disemprotkan dengan pereaksi Dragendorff. Hasil positif alkaloid ditunjukkan pada fraksi dengan terbentuknya warna merah atau jingga pada plat KLT (Cordell, 1981:11).

4.8. Kromatografi Cair Vakum

Ekstrak sedikit dilarutkan dalam pelarut, atau ekstrak dibuat serbuk dengan adsorben (silika gel). Sebanyak ± 30 g silika gel dimasukkan ke dalam kolom dalam keadaan kering tidak bercampur dengan pelarut di luar kolom, kemudian kolom divakum. Selanjutnya ekstrak yang tercampur dengan silika gel dimasukkan ke bagian atas kemudian dihisap perlahan-lahan. Di atas lapisan silika gel yang tersalut ekstrak kemudian diletakkan kertas saring. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang sesuai, dimulai dari pelarut yang non polar lalu kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengelusan. Masing-masing fraksi dikumpulkan dan diuapkan dengan cara diangin-angin (Hostettmann, dkk., 1995:33).

4.9. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Disiapkan pelat kaca tebal khusus untuk KLT preparatif, lalu ditotolkan fraksi hasil kromatografi kolom, kemudian disiapkan eluen yang sama dengan yang digunakan untuk pemantauan KLT fraksi. Bejana (*chamber*) dijenuhkan terlebih dahulu dengan cara memasukkan kertas saring ke dalam bejana yang telah berisi eluen, kemudian didiamkan hingga kertas saring terbasahi sempurna. Pelat kaca yang telah berisi totolan isolat berupa garis dimasukkan ke dalam bejana. Pelat didiamkan hingga diperoleh bercak berupa pita yang telah memisah sempurna. Bercak pita yang diduga senyawa target dikerok, lalu dimasukkan ke dalam vial. Pelarut metanol ditambahkan ke dalam vial, lalu larutan disaring hingga silika gel terpisah dan diperoleh isolat pekat. Isolat pekat yang diperoleh

tersebut kemudian diuji kemurniannya menggunakan kromatografi lapis tipis (Gandjar & Rohman, 2007:368).

4.10. Uji Kemurnian

4.10.1. KLT Pengembangan tunggal

KLT pengembangan tunggal dilakukan dengan menggunakan tiga komposisi eluen yang berbeda, yaitu yang bersifat nonpolar (kloroform:etil asetat = 1:1), semipolar (kloroform:metanol = 3:2), dan polar (etil asetat:metanol = 3:7). Isolat murni ditandai dengan dihasilkan satu bercak (Jannati, 2013:40).

4.10.2. KLT Dua Dimensi

KLT dua dimensi dilakukan dengan menggunakan dua komposisi eluen yang berbeda, yaitu yang bersifat kurang polar dan lebih polar. Pertama dilakukan elusi dengan menggunakan eluen yang kurang polar (kloroform:etil asetat = 1:1). Tahap kedua, plat KLT diputar 90° dari arah semula dan dielusi menggunakan eluen yang lebih polar (kloroform:metanol = 3:2). Isolat murni ditandai dengan dihasilkan satu bercak. Jika ada penguraian, maka akan ada bercak di luar garis. (Gandjar & Rohman, 2007:364-365)

4.11. Karakterisasi Isolat

4.11.1. Penampak Bercak Dragendorff

Isolat ditotolkan pada plat KLT, kemudian disemprotkan penampak bercak Dragendorff. Hasil positif alkaloid ditunjukkan pada isolat dengan terbentuknya warna merah atau jingga pada plat KLT.

4.11.2. Spektrofotometer uv-sinar tampak

Tahap pertama berupa pengkondisian alat yang dilanjutkan dengan analisa spektra serapan sampel dan pelarut pada rentang panjang gelombang (λ) = 200-800 nm, untuk menentukan panjang gelombang maksimum dan pola spektra sampel dan pelarut. Selanjutnya isolat dilarutkan di dalam metanol p.a. dengan konsentrasi 0.2-0.8 mg/5 mL (sesuai sampel yang tersedia), ditempatkan di dalam kuvet silika 1 cm, lalu dicatat λ_{maks} dan pola spektra serapannya pada kisaran λ = 200-400 nm. Secara umum data dari alat spektrofotometer uv-sinar tampak ditampilkan sebagai nilai A (absorbansi) atau e (absorptifitas molar, L.cm⁻¹.mol⁻¹) pada sumbu ordinat (Y) dan nilai λ (panjang gelombang, nm) pada sumbu absis (X). Selanjutnya kedua nilai parameter tersebut (e dan λ) dijadikan dasar karakterisasi komponen untuk menentukan jenis transisi elektronik yang mungkin terjadi, sehingga dapat diprediksi jenis gugus fungsional dan sifat struktur senyawa berupa struktur alipatik atau aromatik (Murhadi dkk, 2004:4).