

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Pengumpulan Bahan dan Determinasi Simplisia

Simplisia yang digunakan berupa cacing tanah yang 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 yang hasilnya menyatakan bahwa sampel merupakan *Lumbricus rubellus* Hoffmeister. Hasil determinasi dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

1.

#### 5.2. Parameter Standar Simplisia

##### 5.2.1. Parameter spesifik

###### A. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan cara mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa dari simplisia. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi karakter yang spesifik dari simplisia. Uji ini dilakukan oleh 5 orang responden. Hasil uji organoleptik dapat dilihat pada **Tabel V.1** dan **Lampiran 6**.

**Tabel V.1** Hasil pemeriksaan organoleptik

Jenis sampel	Bentuk	Warna	Bau	Rasa
Simplisia	Bengkok/Spiral	Coklat	Tajam	Pahit
Ekstrak Pekat	Kental	Coklat	Sangat tajam	Pahit

## B. Kadar sari larut dalam pelarut tertentu

Kadar sari larut dalam pelarut tertentu merupakan parameter yang menyatakan jumlah senyawa yang dapat larut dalam air dan senyawa yang dapat larut dalam etanol (Dirjen POM, 2000:31). Pada pengujian kadar sari larut air dilakukan penambahan kloroform pada air sebagai pelarut. Hal ini dikarenakan air merupakan media pertumbuhan mikroba yang paling baik maka penambahan kloroform disini digunakan sebagai pengawet untuk mencegah terjadinya pertumbuhan mikroba. Hasil penetapan kadar sari larut dalam pelarut tertentu dari simplisia dan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel V.2.**

**Tabel V.2** Hasil pemeriksaan senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

Pemeriksaan	Berat simplisia (g)	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan isi (g)	Hasil (%)	Rata-rata (%)
Kadar sari larut etanol	5,0067	25,547	25,6274	7,75	7,5
	5,0052	24,6669	24,7396	7,25	
Kadar sari larut air	5,0078	23,1973	23,2791	8,15	8,53
	5,0065	20,6095	20,6985	8,9	

### 5.2.2. Parameter Non Spesifik

#### A. Kadar air

Pemeriksaan kadar air bertujuan untuk memberi batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan. Pada pemeriksaan kadar air ini digunakan metode penetapan kadar air secara gravimetri dikarenakan simplisia tidak mengandung senyawa mudah menguap seperti minyak atsiri. Secara umum batas minimal kadar air adalah 10%. Hasil pemeriksaan kadar air dapat dilihat pada **Tabel V.3.**

**Tabel V.3** Hasil pemeriksaan kadar air

No	Bahan Awal (g)	Kadar air		Kadar (%b/b)	Rata-rata (%)
		Sebelum pengeringan (g)	Setelah pengeringan (g)		
1	2,0034	25,179	25,073	5,29	5,63
2	2,0067	22,5939	22,4741	5,97	

## B. Kadar abu

Pengujian kadar abu menggunakan prinsip pemijaran bahan pada suhu 600°C yaitu pada kondisi senyawa organik beserta turunannya akan terdekstruksi dan menguap, sehingga yang tersisa hanya mineral (organik) dan zat-zat anorganik. Tujuan pengujian kadar abu adalah untuk memberikan gambaran kandungan mineral (organik) dan zat-zat anorganik yang terdapat pada simplisia baik yang berasal dari simplisia (internal) maupun yang berasal dari proses pengolahan simplisia (eksternal) sampai terbentuknya ekstrak. Hasil pemeriksaan kadar abu total dapat dilihat pada **Tabel V.4** dan pemeriksaan kadar abu tidak larut asam pada **Tabel V.5**.

**Tabel V.4** Hasil pemeriksaan kadar abu total

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat Krus Kosong (g)	Beras Krus Isi (g)	Berat Abu Total (g)	Rata-rata Berat Abu (g)	Kadar Abu Total (%)
1	2	43,3994	43,5404	0,1411	0,1404	7,02%
2	2	38,115	38,2516	0,1366		
3	2	37,2184	37,3526	0,1342		
4	2	33,7553	33,0015	0,1498		

**Tabel V.5** Hasil pemeriksaan kadar abu tidak larut asam

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat Krus Kosong (g)	Beras Krus Isi (g)	Berat Abu Tidak Larut Asam (g)	Rata-rata Berat Abu (g)	Kadar Abu Tidak Larut Asam (%)
3	2	37,2184	37,2453	0,0269	0,0747	3,74%
4	2	33,7553	33,8031	0,0478		

### 5.3. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia yang dilakukan pada simplisia dan ekstrak menunjukkan hasil seperti yang terdapat pada **Tabel V.6**.

**Tabel V.6** Hasil penapisan fitokimia

Senyawa	Simplisia	Ekstrak
<b>Alkaloid</b>	+	+
<b>Flavonoid</b>	-	-
<b>Tanin</b>	-	-
<b>Saponin</b>	-	-
<b>Kuinon</b>	-	-
<b>Monoterpen dan Seskiterpen</b>	-	-
<b>Senyawa Fenolat</b>	-	-
<b>Triterpen dan Sesterterpen</b>	-	-

**Keterangan :**

(+) = terdeteksi      (-) = tidak terdeteksi

Berdasarkan Tabel V.6 diketahui bahwa simplisia dan ekstrak cacing tanah mengandung alkaloid, sedangkan senyawa tanin, flavonoid, kuinon, monoterpen

dan seskuiterpen, senyawa fenolat, saponin, triterpenoid dan sesquiterpen tidak terdeteksi dalam simplisia dan ekstrak cacing tanah.

#### **5.4. Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi cara dingin yaitu maserasi dengan pelarut air. Simplisia cacing tanah yang digunakan sebanyak 1 kg dengan perbandingan simplisia dengan pelarut adalah 1 : 6. Simplisia diekstraksi selama 3x24 jam, sehingga jumlah pelarut yang digunakan adalah 18 L dengan penambahan kloroform 1000:2,5 setiap 24 jam. Tujuan penambahan kloroform ini adalah sebagai pengawet untuk mencegah terjadinya pertumbuhan mikroba karena air merupakan media pertumbuhan mikroba yang paling baik. Selanjutnya ekstrak cair dipisahkan dengan pengadukan dan pemanasan, selanjutnya ekstrak yang sudah mulai mengental dipanaskan di oven dengan suhu  $\pm 90^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.5. Fraksinasi**

Tahap selanjutnya adalah fraksinasi yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama senyawa yang satu dengan golongan senyawa lainnya berdasarkan kepolarannya. Metode fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstraksi Cair-Cair (ECC) dan Kromatografi Cair Vakum. Sebanyak 90 gram ekstrak pekat dilarutkan dalam 900 mL aquadest. Secara bertahap residu diekstraksi dengan menggunakan n-Heksana dan etil asetat. Senyawa akan lebih terlarut pada pelarut yang memiliki kemiripan sifat dengan senyawa tersebut. Syarat pelarut yang digunakan dalam ECC adalah dua cairan yang tidak bercampur selama proses ekstraksi cair-cair (ECC). (Harbone, 1987:8-9).

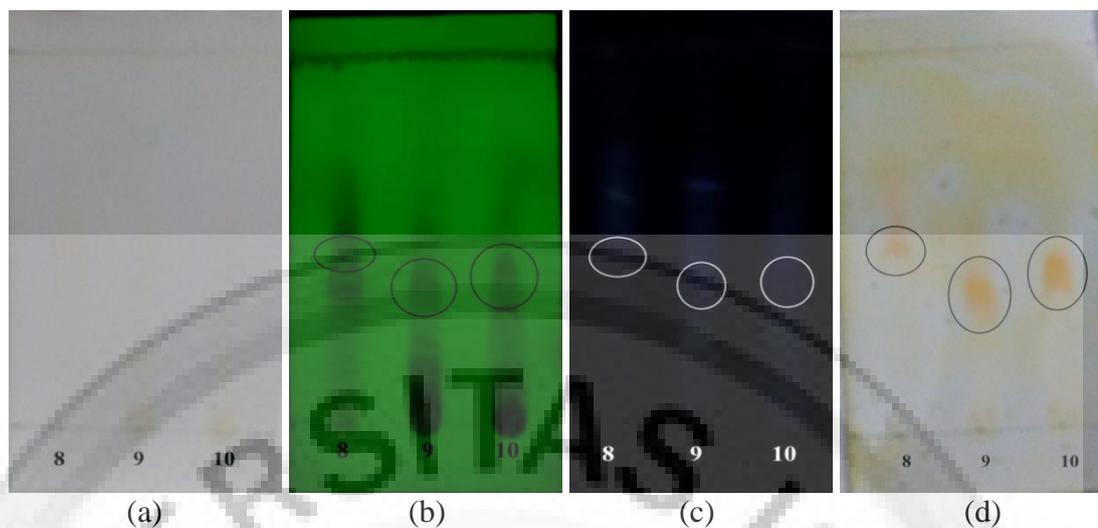
Dari hasil fraksinasi dengan metode ECC diperoleh fraksi n-heksana sebanyak 3 gram, fraksi etil asetat sebanyak 2,5 gram, dan fraksi air sebanyak 17 gram. Selanjutnya setiap fraksi dipantau dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan berbagai komposisi fasa gerak dan fasa diam berupa silika gel GF<sub>254</sub>. Pada pemisahan secara KLT, kepolaran fase diam umumnya tidak berubah, maka variasi kepolaran hanya bisa dibuat pada fase gerak. Analit yang memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan kepolaran fase gerak akan cenderung terbawa oleh fase gerak tersebut sedangkan semakin jauh kepolaran analit dengan kepolaran fase gerak maka semakin sedikit analit yang terbawa oleh fase gerak tersebut (Harborne, 1987:13). Setelah melakukan beberapa pengujian dengan variasi fase gerak, didapatkan fase gerak yang menghasilkan pemisahan paling optimal adalah kloroform : metanol (3:7). Hasil pemantauan KLT dapat dilihat pada **Gambar V.1**



**Gambar V.1** Kromatogram pemantauan fraksi hasil ECC, FD: silika gel GF<sub>254</sub>, FG: CHCl<sub>3</sub>:MeOH (3:7), N= n-heksana, E= etil asetat, A= air, (a) penampak bercak sinar tampak 254 nm, (b) penampak bercak sinar tampak 366 nm, (c) penampak bercak reagen Dragendorff.

Berdasarkan Gambar V.1, setelah dideteksi oleh penampak bercak Dragendorff didapati warna jingga pada fraksi etil asetat. Oleh karena itu fraksi

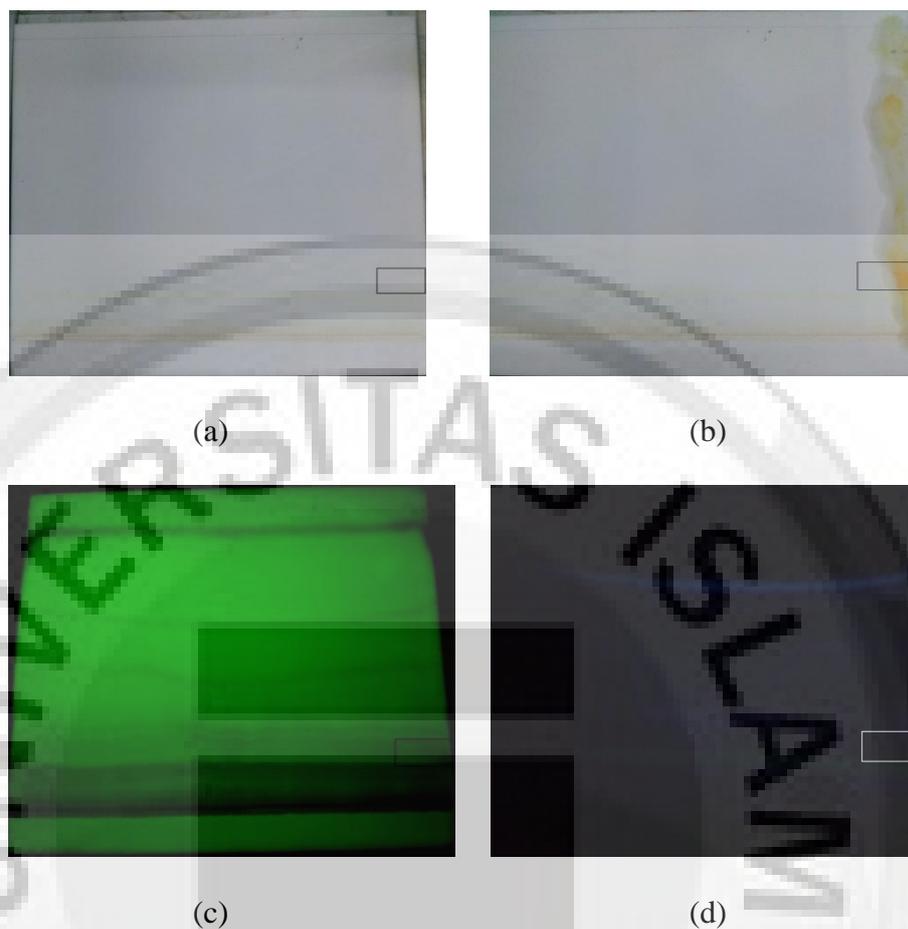
etil asetat tersebut digunakan untuk tahap selanjutnya. Tahap selanjutnya adalah dilakukan fraksinasi dengan kromatografi cair vakum (KCV) yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen di antara fase gerak dan fase diam berdasarkan tingkat kepolaran dengan bantuan vakum. Komponen akan bergerak lebih cepat meninggalkan kolom bila molekul-molekul komponen tersebut berinteraksi secara lemah dengan fase diam (Bintang, 2010:146). Sebanyak 1,12 gram fraksi etil asetat pekat dicampurkan dengan silika gel H 60 dengan perbandingan 1:1. Campuran ini kemudian dituangkan ke dalam kolom yang sudah berisi silika gel H 60 sebagai fasa diam. Elusi dilakukan secara landaian menggunakan campuran pelarut dengan kepolaran meningkat yang terdiri dari n-Heksan, etil asetat, dan metanol. Hasil fraksinasi dengan metode KCV diperoleh 11 fraksi. Tahapan selanjutnya dilakukan pemantauan KLT terhadap fraksi hasil pemisahan KCV. Dari beberapa fraksi, hanya ada 3 fraksi yang menunjukkan positif alkaloid ketika disemprot menggunakan penampak bercak Dragendorff yaitu fraksi 8, 9, dan 10. Hasil pemantauan KLT dari ketiga fraksi tersebut dapat dilihat pada **Gambar V.2**.



**Gambar V.2** Kromatogram pemantauan fraksi hasil KCV fraksi etil asetat:metanol [8= 3:2, 9= 2:3, dan 10= 1:4, FD: silika gel GF<sub>254</sub>, FG:kloroform:metanol (7:1), (a) secara visual, (b) penampak bercak sinar tampak 254 nm, (c) penampak bercak sinar tampak 366 nm, (d) penampak bercak Dragendorff].

## 5.6. Isolasi

Isolasi dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif terhadap fraksi no 9 dengan eluen kloroform:metanol (7:1). Sebelumnya dilakukan aktivasi KLT preparatif dengan memasukkannya ke dalam oven pada suhu 105°C selama 15 menit. Hal tersebut dilakukan untuk menghilangkan molekul air. Fraksi ditotolkan pada plat dalam bentuk pita. Bejana yang telah berisi fase gerak dijenuhkan dengan kertas saring terlebih dahulu. Hasil pemurnian dengan KLT preparatif dapat dilihat pada **Gambar V.3**.



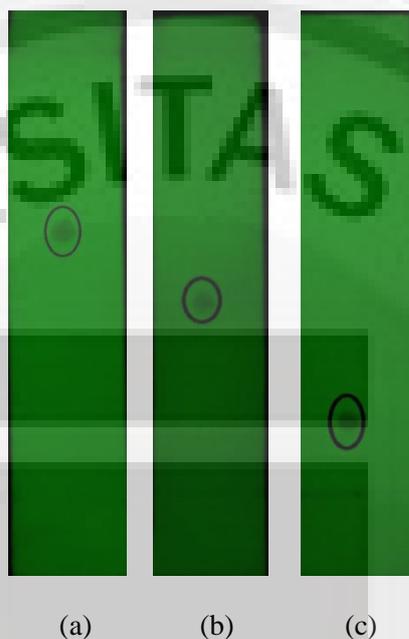
**Gambar V.3** Kromatogram hasil kromatografi lapis tipis preparatif [FD:silika gel GF<sub>254</sub>, FG:kloroform:metanol (7:1), (a) secara visual, (b) Penampak bercak Dragendorff, (c) penampak bercak sinar tampak 254 nm, (d) penampak bercak sinar tampak 366 nm]

Pita yang positif terhadap penampak bercak Dragendorff (positif alkaloid) kemudian dikerok dan dilarutkan dalam metanol lalu didekantasi untuk diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis.

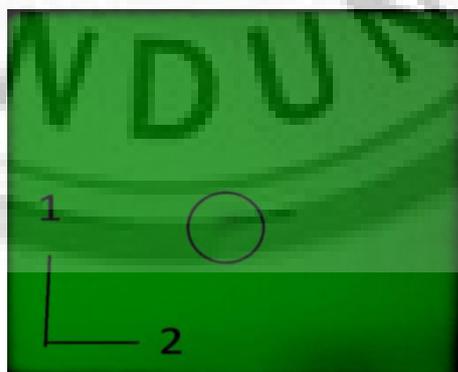
### 5.7. Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT pengembangan tunggal dan KLT dua dimensi. KLT pengembangan tunggal menggunakan tiga jenis campuran eluen yang menghasilkan kepolaran yang berbeda yaitu non polar (kloroform:etil

asetat = 1:1), semi polar (kloroform:metanol = 3:2), dan polar (etil asetat:metanol = 3:7). Pada ketiga pengembangan diperoleh satu bercak yang menunjukkan bahwa isolat tersebut sudah murni. Hasil uji kemurnian KLT pengembangan tunggal dapat dilihat pada **Gambar V.4**.



**Gambar V.4** Kromatogram hasil uji kemurnian penampak bercak sinar tampak 254 nm FD:silika gel GF<sub>254</sub>, (a) FG: etil asetat:metanol (3:7), (b) FG: kloroform:metanol (3:2), (c) FG: kloroform:etil asetat (1:1).



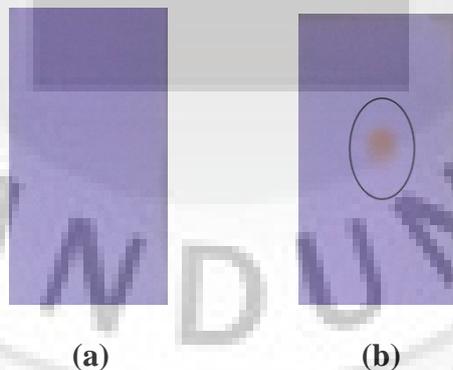
**Gambar V.5** Kromatogram hasil uji kemurnian penampak bercak sinar tampak 254 nm, FD:silika gel GF<sub>254</sub> (1) FG: kloroform:metanol (3:2), (2) FG: kloroform:etil asetat (1:1).

Berikutnya dilakukan uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis (KLT) 2 dimensi dengan komposisi kepolaran fase gerak yang berbeda dan arah berbeda. KLT 2 dimensi dilakukan dengan terlebih dahulu menggunakan fase gerak non polar dan selanjutnya menggunakan fase gerak yang lebih polar dengan arah  $90^\circ$  dari arah pertama. Hasil uji kemurnian dengan KLT 2 dimensi menunjukkan adanya satu bercak yang dapat dilihat pada **Gambar V.5**.

## 5.8. Karakterisasi Isolat

### 5.8.1. Penampak Bercak Dragendorff

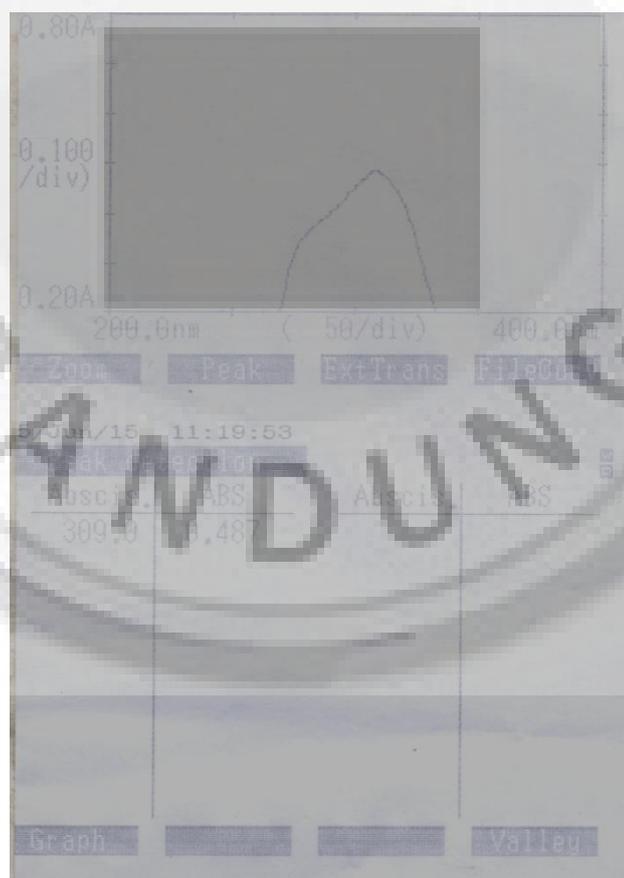
Hasil karakterisasi isolat dengan penampak bercak Dragendorff menunjukkan hasil bahwa isolat positif alkaloid dengan terbentuknya warna jingga pada plat KLT. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada **Gambar V.7**.



**Gambar V.7** Hasil karakterisasi isolat dengan penampak bercak dragendorff, (a) sebelum disemprot penampak bercak Dragendorff, (b) setelah disemprot penampak bercak Dragendorff.

### 5.8.2. Spektrofotometer UV-sinar tampak

Hasil karakterisasi isolat dengan menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak diperoleh data bahwa panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) dari isolat adalah 309 nm dengan absorbansi sebesar 0,487 adanya absorbansi maksimum pada panjang gelombang lebih dari 250 nm menunjukkan bahwa senyawa memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Isolat menunjukkan absorbansi maksimal pada panjang gelombang 309 nm sehingga dapat diduga bahwa isolat memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (kromofor). Spektrum UV-sinar tampak dari isolat dapat dilihat pada **Gambar V.6**.



**Gambar V.6** Hasil karakterisasi isolat menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak.