

## Optimasi Preparasi Sampel untuk Penetapan Kadar Protein Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

Ahmad Fauzi<sup>1</sup>, Wahyu Utami<sup>1\*</sup>, Denny Vitasari<sup>2</sup>, Arifah Sri Wahyuni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia  
Email: wahyu.utami@ums.ac.id

### ABSTRAK

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit yang menjangkit masyarakat Indonesia dengan 500 kasus per 100.000 penduduk dengan angka kematian mencapai 5%. Pengobatan utama demam tifoid adalah menggunakan berbagai macam antibiotik. Namun masyarakat Indonesia cenderung lebih memilih pengobatan alternatif atau tradisional. Salah satu obat tradisional demam tifoid adalah ekstrak cacing (*Lumbricus rubellus*) yang mempunyai kandungan protein sampai 71%. Kandungan protein sangat tergantung pada proses produksinya. Untuk itu diperlukan metode preparasi dan analisis untuk menentukan kadar protein yang bisa digunakan untuk menjamin mutu produk ekstrak cacing. Metode preparasi yang optimum adalah dengan pemanasan pada temperatur 50°C selama 5 menit kemudian dianalisis kadar proteinnya dengan metode Lowry menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650,8 nm. Metode linier, akurat dan teliti dengan batas deteksi sebesar 0,18 mg/mL dan batas kuantifikasi sebesar 0,58 mg/mL.

**Kata Kunci:** Protein, Cacing Tanah, Spektrofotometri, Metode Lowry

### ABSTRACT

*Typhoid fever is a disease that affects Indonesian people with 500 cases per 100,000 population with a mortality rate of 5%. The main treatment for typhoid fever is the use of various antibiotics. However, Indonesian people prefer to use alternative or traditional medicine. One of the traditional medicines for typhoid fever is earthworm (*Lumbricus rubellus*) extract which has a protein content of up to 71%. Protein content is highly dependent on the production process. For this reason, preparation and analysis methods are needed to determine protein levels that can be used to guarantee the quality of the worm extract products. The optimum preparation method is by heating at 50°C for 5 minutes and then the protein is analyzed using the Lowry's method using a UV-Vis*

*spectrophotometer at wavelength of 650.8 nm. The method is linear, accurat and presice with detection limit of 0.18 mg/mL and quantification limit of 0.58 mg/mL.*

**Keywords:** *Protein, Earthworm, Spectrophotometry, Lowry Method*

## I. PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit yang menjangkit masyarakat Indonesia baik di perkotaan maupun di pedesaan. Menurut Kementerian Kesehatan RI (Kemenkes, 2006), angka kejadian demam tifoid yaitu 500 kasus per 100.000 penduduk, dengan angka kematian mencapai 5%. Menurut WHO tahun 2019, secara global demam tifoid menyebabkan 128.000 – 161.000 kematian setiap tahunnya (WHO, 2020).

Pengobatan utama dalam penanganan demam tifoid yaitu dengan penggunaan antibiotik. Penatalaksanaan terapi pada penderita demam tifoid dengan menggunakan ampicilin, kloramfenikol, siprofloksasin, seftriakson, sefotaksim, aztreonam dan azitromisin (Stark, 2003). Semakin banyaknya kasus resistensi dan perubahan paradigma masyarakat yang cenderung lebih memilih pengobatan tradisional menyebabkan meningkatnya kebutuhan masyarakat pada obat-obat tradisional. Salah satu pengobatan yang digunakan untuk membantu mengobati demam tifoid adalah cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) (Cooper et al., 2012; Prabha & Shathya, 2014). Penelitian sebelumnya secara *in vivo*, cacing tanah

terbukti dapat mengobati demam tifoid (Waluyo, Wahyuni, & Utami, 2019) menurunkan panas (antipiretik) (Waluyo, Wahyuni, & Nuri, 2019), antiinflamasi (Dewi & Mahendra, 2020), antibakteri terutama bakteri *Salmonella typhi* (Ayuwardani & Susliowati, 2019), dan sebagai antioksidan (Samatra et al., 2017). Cacing tanah mempunyai kandungan aktif protein yang cukup tinggi yaitu berkisar antara 58–71% pada cacing yang sudah dikeringkan (Sun & Jiang, 2017).

Pada perkembangannya, industri obat tradisional memanfaatkan cacing tanah yang disiapkan dalam sediaan kapsul ekstrak dan sudah diproduksi secara massal. Kandungan protein pada ekstrak cacing sangat dipengaruhi oleh proses produksinya, di mana kualitas protein dapat terpengaruh oleh temperatur dan pH (Hidayat & Utami, 2018), sehingga memungkinkan adanya perbedaan kandungan protein antar produk. Untuk itu diperlukan suatu metode penetapan kadar protein untuk menjamin mutu produk ekstrak cacing sehingga mempunyai efek yang sesuai dengan tujuan penggunaannya. Prosedur yang umum digunakan untuk penetapan kadar protein adalah metode Lowry (Lowry et al., 1951). Pada

penelitian ini, kami mengembangkan metode Lowry untuk penetapan kadar protein pada sampel ekstrak cacing. Pengembangan yang kami lakukan adalah dengan optimasi ekstraksi pada saat preparasi sampel ekstrak cacing. Metode ini diharapkan dapat digunakan untuk standardisasi kadar protein pada kapsul ekstrak cacing yang beredar di pasaran.

## II. METODE

### A. Optimasi Metode Ekstraksi Sampel

Ekstraksi protein kapsul cacing dilakukan dengan cara melarutkan dalam air dengan pemanasan dan tanpa pemanasan. Ditimbang 1 gram ekstrak cacing yang sudah dikeluarkan dari kapsul, dilarutkan dalam 10,0 mL aquades dan dimasukkan dalam sonifikator (Branson 1510) selama 10 menit. Dilakukan empat variasi suhu pemanasan yaitu tanpa pemanasan, suhu 40°C, 50°C, dan 60°C kemudian dimasukkan dalam inkubator air (Memert Incubator Waterbath) selama 5 menit pada masing masing suhu tersebut.

Masing-masing hasil ekstraksi kemudian disaring, diambil 1,0 mL supernatan ditambahkan 0,9 mL pereaksi Lowry A (Merck) dan 0,1 mL pereaksi Lowry B (Merck) selanjutnya diinkubasi 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 3,0 mL reagen Lowry C (Supelco) dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Sampel kemudian dibaca

serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1280) pada panjang gelombang 650,8 nm. Kadar protein ditetapkan menggunakan kurva baku dengan *Bovine Serum Albumin* (Sigma-Aldrich) sebagai standar.

### B. Validasi Metode

Validasi metode didasarkan pada petunjuk dari *International Conference of Harmonization* (ICH) (European Medicines Agency, 2006) dan Farmakope Indonesia Edisi VI (FI VI) (Kementrian Kesehatan RI, 2020). Parameter-parameter validitas yang digunakan antara lain: linieritas, batas Deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), akurasi, dan presisi.

### C. Analisis Data

Dilakukan uji statistik one-way ANOVA untuk membandingkan antara metode ekstraksi sampel tanpa pemanasan dan dengan pemanasan pada suhu 40°C, 50°C, dan 60°C.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi kapsul cacing dilakukan dengan empat metode yaitu tanpa pemanasan, pemanasan suhu 40°C, pemanasan suhu 50°C, dan pemanasan suhu 60°C. Pemilihan suhu ini didasarkan bahwa protein mudah terdegradasi pada suhu diatas 70°C (Huang et al., 2011; Jiang et al., 2018). Sampel yang digunakan

adalah kapsul merk X sebanyak 60 kapsul dengan nomor batch yang sama. Pemilihan sampel dengan nomor batch sama artinya sampel diproduksi dengan proses dan waktu yang sama, sehingga dapat mengurangi bias dalam penetapan kadar protein kapsul ekstrak cacing.

Hasil ekstraksi pada berbagai suhu (Tabel I) menunjukkan bahwa metode dengan pemanasan 50°C selama 5 menit memberikan hasil yang paling besar yaitu sebesar  $(14,58 \pm 0,33)$  %. Hal ini disebabkan karena pada metode tanpa pemanasan, protein belum terekstraksi sempurna karena banyak yang masih terhalang oleh matriks dari ekstrak. Pada metode pemanasan suhu 40°C jumlah protein terdeteksi semakin bertambah. Dengan adanya sumber panas, protein yang tertahan dalam matriks ekstrak cacing dapat terekstraksi dengan baik. Selanjutnya pada pemanasan 50°C, semakin banyak protein yang terdeteksi. Pada metode pemanasan 60°C, terjadi penurunan kadar protein terdeteksi yang kemungkinan karena pada suhu 60°C sebagian protein mulai terdegradasi karena panas yang berlebih.

Selanjutnya dilakukan uji statistik one-way ANOVA dengan nilai signifikansi ( $p < 0,05$ ) untuk membandingkan antara metode ekstraksi. Hasil uji statistik menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara metode

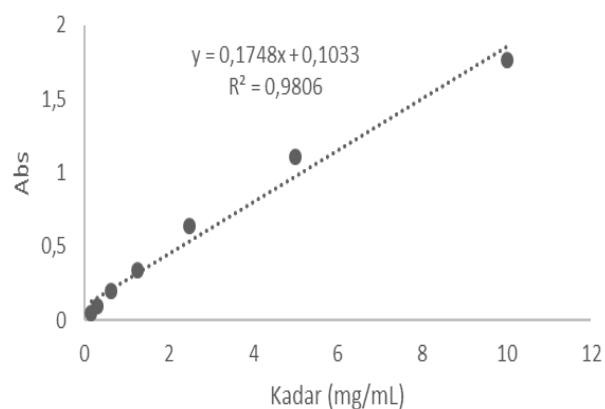
ekstraksi. Setelah dilakukan uji post-hoc, metode pemanasan 50°C mempunyai perbedaan yang bermakna dibanding metode lainnya. Sehingga disimpulkan metode ekstraksi dengan air pada suhu 50°C selama 5 menit merupakan metode yang optimal dalam preparasi penetapan kadar protein dalam ekstrak cacing.

**Tabel I.** Hasil ekstraksi protein kapsul cacing

Metode Ekstraksi	Kadar (%)
Tanpa Pemanasan	$3,39 \pm 0,05$
Pemanasan 40°C	$10,41 \pm 0,47$
Pemanasan 50°C	$14,58 \pm 0,33^*$
Pemanasan 60°C	$9,51 \pm 0,46$

Keterangan : \*menunjukkan hasil yang berbeda signifikan dengan metode yang lainnya ( $p < 0,05$ )

Validasi metode yang pertama adalah linieritas. Metode linieritas menggunakan sampel *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan 7 titik konsentrasi dari 0,15 – 10 mg/mL. Uji linieritas dihitung dengan plotting kadar (mg/mL) vs respon (Abs) didapatkan persamaan kurva baku  $y = 0,1748x + 0,1033$  dengan  $R^2 = 0,9806$  (Gambar 1).



**Gambar 1.** Grafik uji linieritas

Hasil uji linieritas menunjukkan adanya perubahan respon alat seiring bertambahnya kadar analit. Nilai koefisien  $R^2 \geq 0,98$ , dengan demikian dapat disimpulkan penetapan kadar protein pemanasan  $50^\circ\text{C}$  menghasilkan linieritas yang baik dengan rentang 0,15 – 10 mg/mL. Selanjutnya batas deteksi (LOD) diperoleh 0,18 mg/mL dan batas kuantifikasi (LOQ) diperoleh 0,58 mg/mL.

Uji akurasi menggambarkan hasil uji dengan nilai sebenarnya, parameter yang diukur adalah % perolehan kembali. Prosedur yang dilakukan adalah penambahan standar pada sampel dengan konsentrasi 12, 15 dan 18 mg/mL. Hasil didapatkan % perolehan kembali sebesar 84,54 – 107,93 % (Tabel II). Hasil ini memenuhi persyaratan % perolehan kembali yaitu 80 -120 %.

**Tabel II.** Hasil uji akurasi

Penambahan Zat Aktif (ZA)	%Recovery
Penambahan ZA 12 mg/mL	107,93 $\pm$ 1,25
Penambahan ZA 15 mg/mL	97,38 $\pm$ 2,33
Penambahan ZA 18 mg/mL	84,54 $\pm$ 2,12

Parameter uji selanjutnya adalah uji presisi/ripitabilitas. Pengujian ini bertujuan untuk melihat respon alat pada pengukuran yang berulang-ulang. Hasil uji ripitabilitas menunjukkan ketelitian pengukuran yang baik, %CV (*Coefficient*

*of Variation*) kurang dari 5% (Tabel III). Hal ini menunjukkan bahwa setiap pengulangan pengukuran pada sampel yang sama memberikan hasil yang sama.

**Tabel III.** Hasil uji repitabilitas

Pengujian Ke-	Kadar (mg/mL)	Rata-rata	%CV
1	14,80		
2	14,27		
3	15,60		
4	14,14	15,1 $\pm$ 0,6	4,4
5	15,26		
6	15,58		
7	15,78		

#### IV. KESIMPULAN

Metode yang optimal untuk penetapan kadar protein dalam kapsul ekstrak cacing adalah dengan metode pemanasan  $50^\circ\text{C}$  selama 5 menit yang menghasilkan deteksi protein yang lebih banyak dibandingkan pemanasan suhu  $40^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , dan tanpa pemanasan. Metode yang optimal sudah tervalidasi dengan linieritas  $R^2 \geq 0,98$  pada rentang kadar 0,15 – 10 mg/mL, LOD 0,18 mg/mL, LOQ 0,58 mg/mL, % Perolehan kembali berkisar antara 84,54 – 107,93 %, dan uji ripitabilitas menghasilkan CV kurang dari 5%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada LPMPP UMS yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah Pengabdian Masyarakat UMS batch tahun

2021/2022 yang tertuang dalam Surat Penetapan Ketua LPMPP UMS Nomor: 376/A.3-III/LPMPP/XI/2021.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ayuwardani, N., & Susliowati, A. A. (2019). Antibacterial Activity of Salmonella Typhi in Combination of Earth-Worms Extract (*Lumbricus rubellus*) and Turmeric Rhizoma Extract (*Curcuma Longa* L.) In Vitro Novi. *Aloha International Journal of Health Advancement (AIJHA)*, 2(4), 76–79.
- Cooper, E. L., Balamurugan, M., Huang, C. Y., Tsao, C. R., Heredia, J., Tommaseo-Ponzetta, M., & Paoletti, M. G. (2012). Earthworms dilong: Ancient, inexpensive, noncontroversial models may help clarify approaches to integrated medicine emphasizing neuroimmune systems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Dewi, N. W. S., & Mahendra, A. N. (2020). The in-vivo anti-inflammatory effect of red earthworm (*Lumbricus rubellus*) ethanolic extract from organic farmland in Bali, Indonesia. *Bali Medical Journal*, 9(3), 545–548.
- European Medicines Agency. (2006). International Conference on Harmonisation. *ICH Q2 R1*, 2(June 1995), 1070–1072.
- Hidayat, N., & Utami, R. N. (2018). The effects of earthworm concentration and extraction time on solubility of protein. *Advances in Food Science, Sustainable Agriculture and Agroindustrial Engineering*, 1(1), 15–18.
- Huang, F., Huang, M., Xu, X., & Zhou, G. (2011). Influence of heat on protein degradation, ultrastructure and eating quality indicators of pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 443–448.
- Jiang, Q., Han, J., Gao, P., Yu, L., Xu, Y., & Xia, W. (2018). Effect of heating temperature and duration on the texture and protein composition of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) muscle. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2110–2120.
- Kementerian Kesehatan RI (2006). Pedoman Pengendalian Demam Tifoid. Pada *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 364* (p. 41).
- Kementerian Kesehatan RI. (2020). *Farmakope Indonesia Edisi VI*. Kementrian Kesehatan RI.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Prabha, M. L., & Shathya, S. (2014). Earthworm-An alternative approach to biomedicine. *Int J Curr Sci*, 13, 6–8.
- Samatra, D. P. G. P., Mahadewa Tjokorda, G. B., Sukrama, D. M., Dewi, N. W. S., Praja, R. K., Nurmansyah, D., & Widyadharma, I. P. E. (2017). Extract of earthworms (*Lumbricus rubellus*) reduced malondialdehyde and 8-hydroxy-deoxyguanosine level in male wistar rats infected by salmonella typhi. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(4), 1765–1771.
- Stark, A. C. (2003). Treatment of typhoid fever. *British Medical Journal*, 2(2347), 1677.
- Sun, Z., & Jiang, H. (2017). Nutritive Evaluation of Earthworms as Human Food. *Future Foods*.
- Waluyo, J., Wahyuni, D., & Nuri, N. (2019). Antipyretic effects of dried earthworm (*Pheretima Javanica* K.) In male white rat (*Rattus Norvegicus*) with typhoid fever.

- International Journal of Scientific and Technology Research*, 8(8), 243–246.
- Waluyo, J., Wahyuni, D., & Utami, W. S. (2019). Healing effects of fresh earthworms (*Pheretima Javanica* K.) for typhoid fever induced in male white rat (*Rattus norvegicus* L.). *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 8(2), 2012–2014.
- WHO. (2020). *Typhoid and other invasive salmonellosis (Vaccine-Preventable Diseases)*. 1–13.