

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Cacing Tanah (*Lumbricus Rubellus* Hoffmeister)

¹Inda Rahayu Deri, ²Kiki Mulkiya Yuliyawati, ³Esti Rachmawati Sadiyah
^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Unisba, Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116
e-mail: ¹indarahaderi@gmail.com, ²qqmulkiya@gmail.com, ³esti_sadiyah@ymail.com

Abstrak. Dalam penelitian ini, telah dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa alkaloid dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut air. Fraksinasi dilakukan dengan cara Ekstraksi Cair-Cair menghasilkan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air. Pemantauan fraksi dilakukan secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam silika GF₂₅₄ dengan fase gerak kloroform:metanol (3:7). Fraksi yang positif terhadap penampak bercak Dragendorff adalah fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian difraksinasi kembali menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum dengan fase diam silika gel H 60 dan fase gerak n-heksan, etil asetat dan metanol. Subfraksi dipantau kembali dengan metode KLT. Fraksi terpilih (fraksi 9) dimurnikan dengan KLT-preparatif menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (7:1) sehingga diperoleh isolat. Uji kemurnian isolat menggunakan KLT pengembangan tunggal dan 2 dimensi menunjukkan 1 bercak. Karakterisasi isolat menggunakan penampak bercak Dragendorff menunjukkan positif alkaloid. Karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Sinar Tampak menunjukkan isolat memiliki gugus kromofor dengan serapan pada λ_{maks} 309 nm.

Kata Kunci : Cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister), alkaloid, spektrofotometri UV-Sinar Tampak

A. Pendahuluan

Pengobatan tradisional semakin dikembangkan dan diteliti oleh para ilmuwan mulai dari tanaman hingga hewan, salah satunya adalah cacing tanah. Cacing tanah sangat dikenal di masyarakat terutama masyarakat pedesaan yang hampir setiap hari menemukannya di kebun, tegalan atau sawah. Secara tidak kita sadari, kehadiran cacing tanah di bumi telah memberi manfaat yang begitu besar (Hermawan, 2013:1).

Secara empiris cacing tanah sering digunakan sebagai obat tipes. Tipes merupakan salah satu penyakit yang diawali dengan demam. Demam merupakan gejala umum dari berbagai penyakit. Penyebab demam bisa berbagai macam tapi umumnya gejala peningkatan suhu tubuh harus segera diatasi karena dapat mengakibatkan efek lain yang lebih berbahaya. Obat untuk menanggulangi demam adalah antipiretik. Antipiretik sintetik yang umum digunakan adalah golongan salisilat, derivat paraaminofenol, dan derivat pirazolon. Selain menggunakan obat-obat sintetik, demam juga dapat diatasi dengan menggunakan obat tradisional, salah satunya adalah cacing tanah. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Santoso (2002:11), cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) mengandung golongan senyawa alkaloid yang dapat digunakan sebagai antipiretik.

Ekstraksi alkaloid dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti yang dilakukan oleh Santoso (2002) yang mengekstraksi alkaloid menggunakan metode infusa. Selain metode infusa, dapat juga dilakukan dengan metode ekstraksi cara dingin seperti maserasi.

Berdasarkan uraian diatas, dalam penelitian ini ingin diketahui bagaimana penarikan alkaloid jika diekstraksi dengan metode maserasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa alkaloid dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) yang dihasilkan oleh metode ekstraksi cara dingin yaitu maserasi.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat tentang kandungan alkaloid dalam cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) secara umum, serta memberikan dasar penelitian untuk dikembangkan selanjutnya dalam bidang farmasi secara khusus.

B. Landasan Teori

Cacing tanah *L. rubellus* tergolong ke dalam kelompok binatang avertebrata (tidak bertulang belakang) sehingga sering disebut binatang lunak. Seluruh tubuhnya tersusun atas segmen-segmen yang berbentuk cincin sehingga digolongkan dalam filum annelida. Di setiap segmen terdapat rambut yang keras dan berukuran pendek yang juga disebut seta. Oleh karena jumlah seta pada tubuh cacing *L. rubellus* sangat sedikit maka cacing ini dimasukkan ke dalam kelas Oligochaeta. Istilah cacing tanah (*earthworm*) sendiri hanya ditujukan pada binatang kelas Oligochaeta ini (Edwards dan Bohlen, 1996:4).

Klasifikasi cacing tanah *Lumbricus rubellus* adalah sebagai berikut (Desportes dan Schrével, 201: 417) :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Annelida
Kelas	: Citellata
Bangsa	: Haplotaxida
Suku	: Lumbricidae
Marga	: <i>Lumbricus</i>
Jenis	: <i>Lumbricus rubellus</i> Hoffmeister

Cacing tanah hidup di tempat atau tanah yang terlindung dari sinar matahari, lembap, gembur, dan mengandung banyak serasah. Habitat ini sangat spesifik bagi cacing tanah untuk tumbuh dan berkembang biak dengan baik. Marga *Lumbricus* ini sangat menyukai bahan organik yang berasal dari kotoran ternak dan sisa-sisa tumbuhan (Palungkun, 2010:10).

Kandungan gizi *Lumbricus rubellus* cukup tinggi, terutama kandungan proteinnya. Kandungan protein cacing ini ternyata lebih tinggi dari sumber protein lainnya, misalnya daging (65%) dan kacang kedelai (45%). Oleh karena itu, di Jepang, Hongaria, Thailand, Filipina, dan Amerika Serikat cacing ini juga dimanfaatkan sebagai bahan makanan manusia selain digunakan untuk ramuan obat dan bahan kosmetik (Sajuthi dkk., 2003). Di dalam ekstrak cacing tanah juga terdapat zat antipurin, antipiretik, antidota, vitamin dan beberapa enzim misalnya lumbrokinase, peroksidase, katalase dan selulose yang berkhasiat untuk pengobatan (Priosoeryanto, 2001:2).

Protein yang sangat tinggi pada tubuh *Lumbricus rubellus* ini terdiri dari setidaknya sembilan asam amino esensial dan empat macam asam amino non-esensial. Asam amino esensial ini antara lain arginin, histidin, leusin, isoleusin, valin, metionin, fenilalanin, lisin, dan treonin. Sedangkan asam amino non-esensial ialah sistin, glisin, serin, dan tirosin (Palungkun, 2010:20).

Cacing tanah (*L. rubellus*) mempunyai berbagai macam aktivitas farmakologi yaitu dapat digunakan sebagai antibakteri, antipiretik, penghancur gumpalan darah, menurunkan tekanan darah tinggi, mengobati stroke, tipis, wasir, eksim, sakit maag, rematik, paru-paru basah, migrain, diare, disentri, dan sebagai bahan kosmetik (Hermawan, 2013:40).

Alkaloid merupakan golongan suatu senyawa yang memiliki ciri khas sebagai senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam bentuk gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik (heterosiklik) (Harborne, 1987:234). Lebih dari 12.000 jenis alkaloid telah dideskripsikan sejauh ini, tetapi hanya 600 yang telah dianalisis sifat biokimia dan hanya sebagian kecil ekofisiologis. Penelitian menunjukkan alkaloid berpotensi untuk pengobatan antibakteri, antifungi, atau obat penyakit yang disebabkan virus, dan sel kanker (Rogers & Wink, 1998:268).

Ekstraksi alkaloid dilakukan berdasarkan sifat umum yang dimilikinya. Alkaloid bersifat basa dan dapat membentuk garam. Ekstraksi alkaloid dapat dilakukan dalam suasana asam, netral, atau basa. Dalam suasana netral dapat dipakai alkohol atau air, dalam suasana asam dengan alkohol atau air yang mengandung 1-2% asam mineral dan dalam suasana basa dengan alkohol atau kloroform yang dibasakan dengan amonia (Cordell, 1981:12).

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan senyawa kimia yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. (Depkes RI, 2000:1)

Dalam proses ekstraksi ini, bahan aktif akan terlarut oleh zat penyari yang sesuai sifat kepolarannya. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah, daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Ansel, 1989:607).

Ekstraksi cair-cair merupakan suatu proses pemurnian dengan prinsip melibatkan pengontakan suatu larutan dengan pelarut (*solvent*) lain yang tidak saling melarut (*immisible*) dengan pelarut asal yang mempunyai densitas yang berbeda sehingga akan terbentuk dua fasa beberapa saat setelah penambahan *solvent*. Ekstraksi cair-cair menggunakan suatu alat yaitu corong pisah. Dalam proses ekstraksi cair-cair terjadi perpindahan solut dari satu fasa ke fasa yang lain. Pada ekstraksi cair-cair, fasa yang digunakan adalah dua cairan yang tidak saling bercampur, biasanya digunakan air dan pelarut organik (Harborne, 1987: 8-9).

Kromatografi merupakan cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan, dengan jalan penyarian berfraksi, atau penyerapan, atau penukaran ion pada zat padat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Zat yang diperoleh dapat digunakan untuk percobaan identifikasi atau penetapan kadar. Kromatografi yang sering digunakan ialah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis dan kromatografi gas. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya lebih berguna untuk percobaan identifikasi karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit. Kromatografi gas memerlukan alat yang lebih rumit, tetapi cara tersebut sangat berguna untuk percobaan identifikasi dan penetapan kadar (Depkes RI, 1989:523)

C. Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi pengumpulan dan determinasi bahan, pembuatan simplisia, pemeriksaan parameter standar simplisia, ekstraksi, penetapan kadar alkaloid, fraksinasi, pemantauan fraksi, isolasi senyawa alkaloid, uji kemurnian, dan karakterisasi senyawa isolat.

Penyiapan bahan terdiri dari pengumpulan bahan, determinasi, dan pembuatan simplisia. Pemeriksaan parameter standar simplisia terdiri dari parameter spesifik, yaitu

parameter identitas, organoleptik, dan senyawa terlarut dalam pelarut tertentu serta parameter non spesifik, yaitu kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, dan kadar air.

Ekstraksi cacing tanah kering dilakukan dengan metode maserasi dengan waktu 3x24 jam pada suhu kamar. Fraksinasi terhadap ekstrak yang diperoleh dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan pelarut dengan kepolaran meningkat yaitu n-heksana, etil asetat dan air. Dilakukan fraksinasi kembali terhadap fraksi terpilih dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan elusi secara landaian.

Setelah melakukan fraksinasi, dilakukan pemantauan terhadap setiap fraksi dan ekstrak yang dihasilkan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak Dragendorff. Terhadap fraksi terpilih dilakukan isolasi dengan metode KLT preparatif sehingga diperoleh isolat.

Kemudian dilakukan uji kemurnian dengan metode KLT pengembangan tunggal dengan 3 komposisi eluen yang berbeda dan KLT dua dimensi. Selanjutnya isolat dikarakterisasi dengan KLT, Penampak bercak Dragendorff, dan Spektrofotometer UV-Sinar Tampak.

D. Hasil Penelitian

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.

Parameter Standar Simplisia

Parameter standar simplisia yang dilakukan pada simplisia menunjukkan hasil seperti yang terdapat pada **Tabel D.1**.

Tabel D.1. Hasil parameter standar simplisia

Parameter	Hasil
Organoleptik	Berbau tajam, warna coklat, rasa pahit, dan bentuk bengkok/spiral
Kadar sari larut air	8,53%
Kadar sari larut etanol	7,50%
Kadar abu total	7,02%
Kadar abu tidak larut asam	3,74%
Kadar air	5,63%

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia yang dilakukan pada simplisia dan ekstrak menunjukkan hasil seperti yang terdapat pada **Tabel D.2**

Tabel D.2. Hasil penapisan fitokimia

Senyawa	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	+	+
Flavonoid	-	-
Tanin	-	-
Saponin	-	-
Kuinon	-	-
Monoterpen dan Seskuiterpen	-	-
Senyawa Fenolat	-	-
Triterpen dan Sesterterpen	-	-

Keterangan :
(+) = terdeteksi (-) = tidak terdeteksi

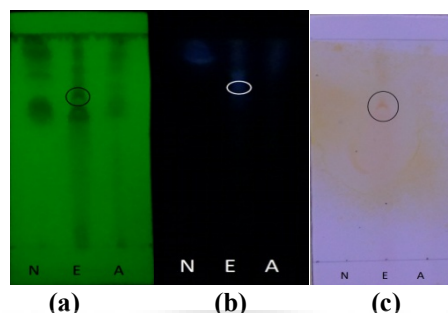
Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi cara dingin yaitu maserasi. Simplisia yang digunakan sebanyak 1 kg dengan jumlah pelarut seluruhnya 18 L. Perbandingan simplisia dengan pelarut adalah 1 : 6. Selanjutnya ekstrak cair dipisahkan dengan pengadukan dan pemanasan, selanjutnya ekstrak yang sudah mulai mengental dipanaskan di oven dengan suhu $\pm 90^{\circ}\text{C}$.

Fraksinasi

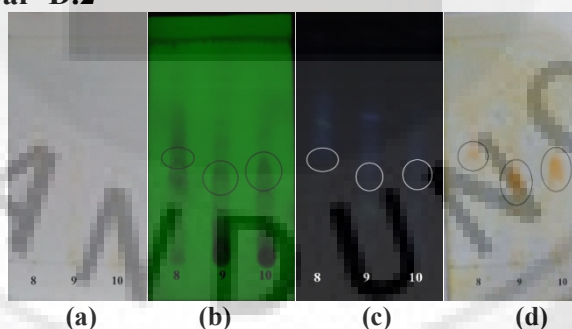
Tahap selanjutnya adalah fraksinasi yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama senyawa yang satu dengan golongan senyawa lainnya berdasarkan kepolarannya. Metode fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi cair-cair (ECC) dan kromatografi cair vakum. Sebanyak 90 gram ekstrak pekat dilarutkan dalam 900 mL aquadest. Secara bertahap dimasukkan n-Heksana dan etil asetat. Senyawa akan lebih terlarut pada pelarut yang memiliki kemiripan sifat dengan senyawa tersebut. Syarat pelarut yang digunakan 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 macam fasa gerak dan fasa diam silika GF₂₅₄. Pada proses 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 terbaik adalah kloroform : metanol (3:7). Hasil pemantauan KLT dapat dilihat pada **Gambar D.1**



Gambar D.1 Kromatogram pemantauan fraksi hasil ECC, FD: silika gel GF₂₅₄, FG: CHCl₃: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.

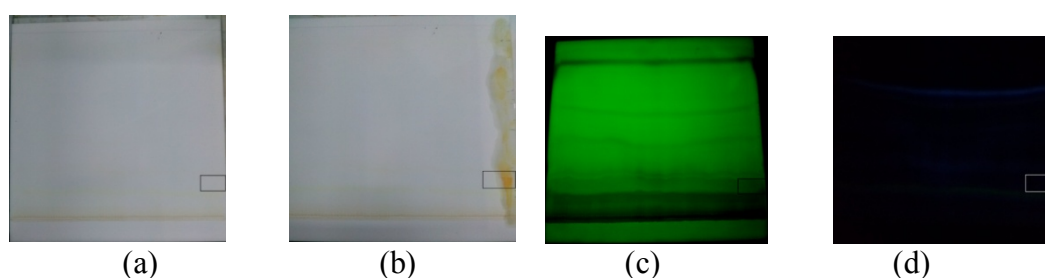
Berdasarkan Gambar V.1, setelah dideteksi oleh penampak bercak Dragendorff didapati warna jingga pada fraksi etil asetat. Oleh karena itu fraksi etil asetat tersebut digunakan untuk tahap selanjutnya. Tahap selanjutnya adalah dilakukan fraksinasi dengan kromatografi cair vakum (KCV) yang didasarkan pada 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. Berdasarkan 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 D.2**



Gambar D.2 Kromatogram pemantauan fraksi hasil KCV fraksi etil asetat:metanol [8= 3:2, 9= 2:3, dan 10= 1:4, FD: silika gel GF₂₅₄, 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]

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 D.3**.

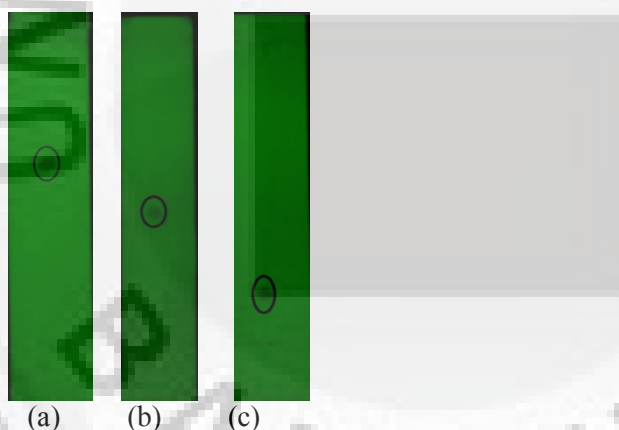


Gambar D.3 Kromatogram hasil kromatografi lapis tipis preparatif [FD:silika gel GF₂₅₄, FG:kloroform:metanol (7:1), (a) secara visual, (b) Penampak bercak dragendorff, (c) penampak bercak sinar tampak 254 nm, (d) penampak bercak sinar tampak 366 nm]

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

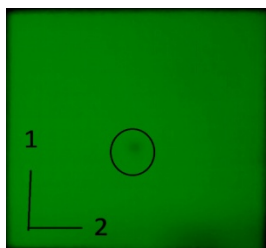
Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT pengembangan tunggal dan KLT dua dimensi. KLT pengembangan tunggal menggunakan tiga jenis campuran eluen dengan 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 D.4**.



Gambar D.4 Kromatogram hasil uji kemurnian penampak bercak sinar tampak 254 nm FD:silika gel GF₂₅₄, (a) FG: etil asetat:metanol (3:7), (b) FG: kloroform:metanol (3:2), (c) FG: kloroform:etil asetat (1:1).

Kemudian 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° dari arah pertama. Hasil uji kemurnian dengan KLT 2 dimensi menunjukkan adanya satu bercak yang dapat dilihat pada **Gambar D.5**.

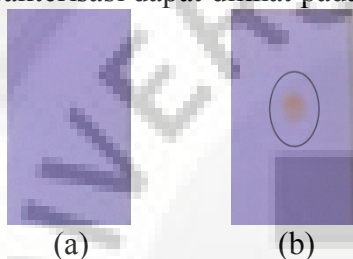


Gambar D.5 Kromatogram hasil uji kemurnian penampak bercak sinar tampak 254 nm, FD:silika gel GF₂₅₄ (1) FG: kloroform:metanol (3:2), (2) FG: kloroform:etil asetat (1:1).

Karakterisasi Isolat

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 D.6**.



Gambar D.6. Hasil karakterisasi isolat dengan penampak bercak dragendorff, (a) = sebelum disemprot penampak bercak Dragendorff, (b) = setelah disemprot penampak bercak Dragendorff.

Spektrofotometer UV-sinar tampak

Hasil karakterisasi isolat dengan menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak diperoleh data bahwa panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dari isolat adalah 309 nm dan absorbansi 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 diketahui bahwa isolat memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (kromofor).

E. Kesimpulan

Proses isolasi yang dilakukan berhasil mendapatkan isolat yang menunjukkan positif alkaloid berdasarkan analisis menggunakan penampak bercak Dragendorff. Hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh memiliki gugus kromofor dengan panjang gelombang maksimum 309 nm.

Daftar Pustaka

- Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids – Secret of Life : Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Application and Ecological Role*, Research and Teaching Laboratory of Applied Botany, Faculty of Biosciences University of Joensuu, Joensuu Finland.
- Ansel, H.C. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. UI Press, Jakarta.
- Bintang, M. (2010). *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga. Jakarta.

- Cordell, G.A. (1981). *Introduction To Alkaloid A Biogenic Approach*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1977). *Material Medika Indonesia*, Jilid I, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan pertama. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta
- Desportes, I., and Schrével, J. (2013). *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Gregarines*. MNHN, Paris.
- Edwards, CA, Bohlen, PJ. (1996). *Biology and Ecology of Earthworms*, 3rd ed. Chapman and Hall, New York, NY.
- Farnsworth, N.R. (1996). Biological and Phytochemical Screening Of Plants, *J. Pharm. Sci.*, 55 (3) :Vol 55, number 3.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M dan Schwarting, A.E (1991). *Pengantar Kromatografi*. Penerjemah: Panduwinata , K dan Niksolihin, S. Edisi kedua. Penerbit ITB. Bandung
- Harborne, J.B. (1987). *Metoda Fitokimia Penuntun Cara Modern menganalisis Tumbuhan*, Edisi II. Penerbit ITB. Bandung.
- Hermawan, R. (2011). *Usaha Budidaya Cacing Lumbricus*. Pustaka Baru Press, Yogyakarta.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., dan Marston, A. (1995). *Cara Kromatografi Preparatif*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung :Penerbit ITB.
- Jannati, S.M., (2013). *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Kimia dari Fraksi N-Heksana Daun Senduduk*. [Skripsi] Jurusan Farmasi Universitas Islam Bandung, Bandung
- Palungkun, R. (2010). *Usaha Ternak Cacing tanah*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Priosoeryanto, B. Pontjo, P. Masniari, P. Risa, T. Magdalena, P, U. Yelly, A, I. Hendro, P, U. (2001). *Aktifitas Antibakteri dan Efek Terapeutik Ekstrak Cacing Tanah Lumbricus rubellus Secara Invitro dan Invivo Pada Mencit Berdasarkan Gambaran Patologi Anatomi dan Histopatologi*. Jurnal Balai Penelitian Veteriner (BALITVET), Bogor.
- Rogers, M.F., Wink M. (1998). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications* . Plenum Press.
- Rukmana, R. (1999). *Budidaya Cacing Tanah*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Sajuthi, D., Suradikusumah, E., Santoso, M. A. (2003). *Efek Antipiretik Ekstrak Cacing Tanah*. <http://www.kompas.com/kompascetak/0305/29/ilpeng/336450.htm>
- Santoso, M.A. (2002). *Identifikasi Ekstrak Cacing Tanah Lumbricis rubellus dan Pheretima aspergillum yang Memiliki Efek Antipiretik pada Tikus Putih*. [Skripsi] Jurusan Kimia. IPB, Bogor.
- Sims, R.W. (1982) *Lumbricina in Synopsis and Classification of Living Organism*, ed. Parker , S.P. McGraw-Hill, New York.
- Siregar, P. H. (2005). Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Daun Tumbuhan Jambu Keling. *Jurnal Sains Kimia*,