

**LAPORAN AKHIR**  
**PENELITIAN PROFESOR**



Penggunaan Ekstrak Bahan Herbal Daun Bandotan Sebagai Antelmintik pada  
*Cacing Fasciola gigantica*

**Tim Peneliti :**

Prof. Dr. drh. Ummu Balqis, M.Si. (NIP. 197001131998032001)  
drh. Cut Dahlia Iskandar, M.Sc., Ph.D. (NIP. 197512082005012002)

Dibiayai oleh  
Universitas Syiah Kuala  
Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi,  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian Profesor, Tahun Anggaran 2021  
Nomor : 166/UN11/SPK/PNBP/2021 tanggal 19 Februari 2021

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS SYIAH KUALA**  
**OKTOBER 2021**

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR PENELITIAN PROFESOR

---

Judul Penelitian : Penggunaan Ekstrak Bahan Herbal Daun Bandotan  
Sebagai Antelmintik pada Cacing *Fasciola gigantica*

Bidang Kajian Unggulan : Ketahanan Pangan

Peneliti

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Prof. Dr. drh. Ummu Balqis, M.Si.  
b. NIP : 197001131998032001  
c. Jabatan Fungsional : Guru Besar  
d. Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
e. Nomor Hp : 085218968501  
f. Alamat Surel (e-mail) : ummu.balqis@unsyiah.ac.id

Anggota

a. Nama Lengkap : drh. Cut Dahlia Iskandar, M.Sc., Ph.D  
b. NIP : 197512082005012002  
c. Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Biaya Penelitian : Rp. 24.750.000

Banda Aceh, 28 Oktober 2021  
Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
Dekan FKH USK



(drh. Teuku Reza Ferasyi, M.Sc., Ph.D)  
NIP: 19730729002121001

(Prof. Dr. drh. Ummu Balqis, M.Si)  
NIP: 197001131998032001

Menyetujui,  
KETUA LPPM USK

Prof. Dr. Taufik Fuadi Abidin, S.Si., M.Tech)  
NIP: 197010081994031002

## RINGKASAN

Infeksi cacing *Fasciola gigantica* menyebabkan fasciolosis pada ternak ruminansia. Fasciolosis yang menyerang ternak ruminansia di Indonesia hanya disebabkan oleh *F. gigantica*. Target khusus yang dicapai dalam penelitian adalah mendapatkan obat cacing yang diekstraksi dari bahan herbal daun bandotan. Manfaat riset ini bagi pemangku kepentingan/stakeholders adalah untuk menghindari kerugian ekonomis yang ditimbulkan oleh penurunan berat badan dan kematian sapi melalui pemanfaatan ekstrak bahan alam sebagai antelmintik terhadap infeksi *F. gigantica*. Metode yang dipakai dalam mencapai tujuan riset ini terdiri dari dua tahapan. Pada tahap pertama riset ini dilakukan identifikasi bahan herbal dan analisis fitokimia dari ekstraksi bahan alam berupa daun bandotan. Perlakuan uji ekstrak daun bandotan yang dibagi dalam 4 kelompok konsentrasi dosis ekstrak yaitu kelompok I dosis 10 mg/ml, kelompok II dosis 20 mg/ml, kelompok III dosis 30 mg/ml dan kelompok IV dosis 40 mg/ml. Masing-masing kelompok dosis konsentrasi direndamkan 5 ekor cacing *F. gigantica* dan diamati tingkat *endurance* cacing. Pada tahap ke-2 dilanjutkan dengan pemeriksaan sampel cacing yang sudah mati dari dalam Ekstrak etanol bandotan di cuci dengan PBS dan difiksasi dengan larutan neutral buffered formaline (NBF) 10% selama 24 jam kemudian dibuat preparate histopatologi. Hasil penelitian menunjukkan identifikasi herbal alam daun bandotan yang digunakan berasal dari family *Asteraceae* dan genus *Ageratum* L serta spesies *Ageratum conyzoides* L. Kandungan fitokimia terdiri dari Alkaloid, Terpenoid, Flavonoid dan Tanin. Pemberian ekstrak Bahan herbal daun bandotan secara *in vitro* memiliki pengaruh terhadap mortalitas cacing *F. gigantica*, dan ekstrak ini juga dapat menyebabkan terjadinya perubahan histopatologi pada tegumen, organ reproduksi jantan dan betina. Hasil penelitian ini akan dipublikasi pada jurnal terindeks Scopus dan berinfak faktor reputasi internasional.

*Key words:* *Fasciola gigantica*, bahan herbal, antelmintik, patologi

## PRAKATA

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga kami telah dapat menyelesaikan kegiatan dan penulisan laporan Penelitian Profesor dengan judul “Penggunaan Ekstrak Bahan Herbal Daun Bandotan Sebagai Antelmintik pada Cacing *Fasciola gigantica*”. dengan tujuan untuk mengevaluasi aktivitas antelmintik ekstrak daun bandotan terhadap *F. gigantica* secara in vitro, yang berguna sebagai obat cacing (antelmintik) dari bahan alam yang berpotensi membunuh cacing *F. gigantica* penyebab fasciolosis pada ternak ruminansia.

Dengan selesainya kegiatan penelitian ini, kami menyampaikan ucapan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Rektor Universitas Syiah Kuala yang telah memberi kesempatan untuk memperoleh dana kegiatan penelitian ini.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada masyarakat (LPPM-USK) dan staf yang telah banyak membantu dalam kelancaran administrasi sehingga selesainya kegiatan ini
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala
4. Kepala dan Dosen pada Laboratorium Parasitologi, Farmakologi dan Patologi serta seluruh dosen FKH USK.
5. Terimakasih juga kepada rekan-rekan dosen dan mahasiswa FKH USK yang tidak mungkin kami sebutkan satu persatu yang turut membantu pelaksanaan kegiatan penelitian ini, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga penelitian ini sudah dapat diselesaikan tepat pada waktunya.

Penulis menyadari, laporan penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu kritik dan saran yang bersifat membangun selalu penulis harapkan. Amin Yarabbal’alamin, semoga Allah SWT selalu memberikan rahmat dan kemudahan-Nya kepada kita semua.

Darussalam, 27 Oktober 2021

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR LAMPIRAN .....	vii
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	3
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	6
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	6
4.1 Ekstraksi etanolik daun bandotan .....	6
4.2 Uji Fitokimia.....	8
4.3 Uji <i>in vitro</i> mortalitas <i>F. gigantica</i> .....	9
4.4 Pembuatan preparate histopatologi .....	9
4.5 Prosedur Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).....	10
4.6. Parameter penelitian.....	10
4.7. Analisis Data.....	10
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI .....	11
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....	18
DAFTAR PUSTAKA .....	19
LAMPIRAN .....	22
- Draf Artikel yang Dihasilkan .....	22
- Personalia Tenga Peneliti dan Kualifikasinya .....	34
- Foto dan Gambar Aktifitas.....	35

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan .....	2
Tabel 2. Hasil analisis fitokimia Ekstrak etanol daun bandotan ( <i>Ageratum conyzoides</i> L).....	11
Tabel 3. Tabel 1. Persentase mortalitas cacing <i>F. gigantica</i> dalam ekstrak etanol daun bandotan .....	12

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Cacing <i>Fasciola gigantica</i> pada hati sapi aceh .....	12
Gambar 2. Pemeriksaan tegumen cacing <i>F. gigantica</i> kelompok control	14
Gambar 3. Pemeriksaan tegumen cacing <i>F. gigantica</i> kelompok konsentrasi 10 %.....	14
Gambar 4. Pemeriksaan tegumen cacing <i>F. gigantica</i> kelompok konsentrasi 20 %.....	15
Gambar 5. Pemeriksaan tegumen cacing <i>F. gigantica</i> kelompok konsentrasi 30 %.....	15
Gambar 6. Pemeriksaan tegumen cacing <i>F. gigantica</i> kelompok konsentrasi 40 %.....	16
Gambar 7. Histologi ovary cacing <i>Fasciola gigantica</i> dengan pembesaran 400x .....	16
Gambar 8. Histologi testis cacing <i>Fasciola gigantica</i> dengan pembesaran 400x .....	17

**DAFTAR LAMPIRAN**

Draf Artikel Penelitian ..... 22

Personalia Tenaga Peneliti dan Kualifikasinya..... 34

Foto dan Gambar Aktifitas Penelitian..... 35



## BAB 1. PENDAHULUAN

Fasciolosis disebabkan oleh infeksi cacing trematoda (cacing pipih) *Fasciola gigantica* dan *F. hepatica* yang menyerang organ hati ternak ruminansia dan manusia. Fasciolosis yang menyerang ternak ruminansia di Indonesia hanya disebabkan oleh *F. gigantica*. Prevalensi fasciolosis di Indonesia tergolong tinggi, di Jawa Barat mencapai 90%, dan di Daerah Istimewa Yogyakarta berkisar antara 40 – 90% (Estuningsih *et al.*, 2004). Salah satu penyebab kerentanan ternak ruminansia ternak terinfeksi dengan dosis rendah metacercaria. Raadsma *et al.* (2007) membuktikan infeksi dosis rendah metacercaria *F. gigantica* dapat berisiko menimbulkan fasciolosis karena *worm burden* cacing *F. gigantica* di dalam kantung empedu dan pada hati domba tidak tergantung pada dosis infeksi.

Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh fasciolosis mencapai Rp 513,6 miliar setiap tahunnya. Cacing yang hidup dan berkembang di dalam hati (*liver fluke*) dan kantung empedu ternak ruminansia menyebabkan kambing dan ternak ruminansia lainnya kurang bernafsu mengkonsumsi pakan sehingga menjadi pengganggu pertumbuhan, penurunan produksi, menurunkan produksi susu dan reproduksi ternak, pengafkiran organ hati karena tidak layak dikonsumsi, dan bahkan pada penyakit yang kronis dapat menyebabkan kematian.

Selama ini, pengendalian fasciolosis menggunakan antelmintika seperti Oxytoclozanide. Harga antelmintika masih sangat mahal sehingga kurang ekonomis dalam pemberantasan fasciolosis di Indonesia. Selain itu, pemakaian antelmintika yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi. Oleh karena itu, perlu dicarikan alternatif pengendalian fasciolosis melalui pemanfaatan bahan alam ekstrak daun bandotan. Tujuan riset ini adalah untuk mendapatkan ekstrak daun bandotan yang berkhasiat sebagai anthelmintika terhadap *F. gigantica*. Manfaat khusus yang ingin dicapai adalah hilangnya kerugian ekonomis yang terjadi karena infeksi *F. gigantica* yang menimbulkan kerusakan hati sehingga hati harus diafkir, dan kematian ternak ruminansia oleh fasciolosis dapat dihindari. Urgensi (keutamaan) penelitian ini adalah bahwa sampai saat ini pengendalian helminthosis masih sangat tergantung pada pemanfaatan anthelmintika yang diracik dari senyawa-senyawa sintetis yang mungkin dapat menimbulkan resistensi, dan umumnya hanya bersifat melawan cacing yang memiliki tropisma di dalam lumen gastrointestinal sehingga sangat sulit untuk menjangkau tropisma *F. gigantica* yang berada pada jaringan hati dan kantung empedu. Pemanfaatan hasil

riset ini berasal dari bahan alam yang berpotensi menjangkau *F. gigantica* pada jaringan hati dan kantung empedu, dan bersifat memperbaiki kerusakan sel-sel hati ternak yang rentan terhadap fasciolosis.

Salah satu masalah strategis dalam meningkatkan produksi ternak ruminansia di Indonesia adalah tingginya prevalensi fasciolosis. Apabila anthelmintika yang berasal dari ekstrak daun bandotan memiliki efikasi yang mujarab terhadap fasciolosis maka masalah strategis berskala nasional ini dapat diatasi, yaitu menghindari penurunan produksi dan kematian ternak ruminansia yang disebabkan oleh fasciolosis. Potensi pemanfaatan hasil riset ini sangat mungkin diterapkan di Indonesia sebagai negara yang agraris yang sedang dan akan mengembangkan peternakan terutama ternak ruminansia yang sangat rentan terinfeksi *F. gigantica*.

Luaran yang akan dicapai setelah tahun kedua riset ini adalah menghasilkan produk penelitian yaitu ekstrak bahan herbal daun bandotan yang diformulasikan sebagai antelmintika. Artilel ilmiah berjudul: *In vivo* evaluation of anthelmintic of herbal against *Fasciola gigantica* akan dimuat pada jurnal yang bereputasi internasional atau nasional terakreditasi.

**Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan**

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			TS <sup>1)</sup>	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah <sup>2)</sup>	Internasional	Draft	Submitted	Published
		Nasional	Draft	Submitted	Published
2	Pemakalah dalam Seminar	Internasional	Terdaftar	Draft	Sudah dilaksana
		Nasional	Belum/Tidak ada	Draft	Sudah dilaksana
3	Keynote speaker dalam pertemuan <sup>4)</sup>	Internasional	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
		Nasional	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
4	Visiting Lecturer <sup>5)</sup>	Internasional	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
5	Hak atas Kekayaan Intelektual (HKI) <sup>6)</sup>	Paten	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Draft
		Paten sederhana	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Draft
		Hak cipta	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada

		Merek dagang	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
		Rahasia dagang	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
		Desain produk	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
		Indikasi geografis	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
6	Teknologi Tepat Guna <sup>7)</sup>		Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Produk
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial <sup>8)</sup>		Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada	Belum/Tidak ada
8	Buku Ajar (ISBN) <sup>9)</sup>		Belum/Tidak ada	Draft	Proses
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>10)</sup>		4	5	7

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Tingginya prevalensi fasciolosis di Indonesia erat kaitannya dengan keberadaan siput *Lymnaea rubiginosa* sebagai inang antara yang sangat mudah hidup dengan keadaan lingkungan di Indonesia sebagai negara tropis. Distribusi *L. rubiginosa* tersebar pada padang gembalaan yang basah dan berair mengalir (Hambal, 1998; Hambal dan Sayuti, 2001; Hambal, 2002) sehingga pengendalian fasciolosis melalui pemberantasan inang antara tidak menunjukkan hasil yang memuaskan karena *L. rubiginosa* dapat berkembang biak di sepanjang aliran air.

Cacing dewasa berpredileksi dan bertelur di dalam kantung empedu, telur dialirkan ke luar bersama tinja dan mencemari lingkungan. Telur yang berkembang melepaskan mirasidium yang harus membutuhkan hospes intermedier siput *L. rubiginosa* untuk berkembang menjadi sporokista, redia dan serkaria. Serkaria yang keluar dari tubuh siput mengkontaminasi dan menempel pada rumput menjadi metaserkaria infeksiif dan apabila rumput yang terkontaminasi dimakan oleh ternak ruminansia maka metaserkaria ikut tertelan oleh ternak tersebut (Hambal, 2002).

Ternak ruminansia yang sering menderita fasciolosis akibat terinfeksi oleh cacing hati *F. gigantica* adalah kerbau, sapi, kambing, dan domba (Law *et al.* 2003; Yadav *et al.* 2005;

dan Zhang *et al.* 2005). Infeksi dapat terjadi karena ternak ruminansia merumput pada area gembalaan yang terkontaminasi oleh metacercaria *F. gigantica* (Nambi *et al.*, 2005). Selanjutnya establish di dalam hati dan kantung empedu (Cancela *et al.*, 2004; Yokananth *et al.*, 2005; dan Paz-Silva *et al.*, 2004). Menurut Hansen dan Perry (1994) migrasi melalui dinding intestinal tidak menimbulkan kerusakan pada inang definitif, tetapi penetrasi dari kapsul hati oleh cacing muda dalam jumlah yang banyak menimbulkan respons inflamasi kapsul (peri-hepatitis). Migrasi cacing muda melalui parenkim hati menyebabkan kerusakan jaringan hati, khususnya selama 2-3 minggu sebelum menuju saluran empedu. Kerusakan jaringan hati dapat menghasilkan pendarahan pada rongga abdominal sehingga menyebabkan kematian domba (akut fasciolosis). Migrasi cacing muda dalam jumlah yang sedikit hanya menimbulkan kelainan patologi yang ringan dan tidak menampilkan gejala klinis. Selama fase perbaikan mengikuti migrasi cacing, jaringan hati menunjukkan bermacam tingkatan fibrosis.

Penelitian kami terdahulu membuktikan bahwa domba yang diinfeksi dengan dosis 250 metacercaria *F. gigantica* dapat merusak parenkim hati seiring dengan *establishment* cacing hingga 22 minggu pascainfeksi (Darmawi *et al.*, 2009). Upaya pengendalian fasciolosis melalui imunoprofilaksis telah kami buktikan bahwa aplikasi protein ekskretori/sekretori *F. gigantica* (Darmawi *et al.*, 2008<sup>a</sup>; Darmawi *et al.*, 2008<sup>b</sup>) tidak mampu mengeluarkan cacing *F. gigantica* secara menyeluruh di dalam hati dan kantung empedu pada domba (Darmawi *et al.*, 2009). Hambal (2002) menyatakan bahwa cacing muda memasuki tubuh inang intermedier melewati saluran pencernaan, tetapi cacing muda juga berkesempatan masuk ke saluran sirkulasi dan dapat terdistribusikan ke lokasi yang salah. *F. gigantica* dewasa mencapai saluran empedu setelah migrasi di parenkim hati, sembilan sampai 12 minggu setelah infeksi. Sewaktu *F. gigantica* hidup di dalam saluran empedu, kondisi saluran empedu sangat padat dan rapat sehingga mengganggu fungsi normal hati dan sering menyebabkan pengapuran pada dinding empedu. *F. gigantica* mulai bertelur sekitar empat bulan sampai beberapa tahun. Kaitannya dengan proposal yang sedang kami ajukan ini adalah pembuktian hipotesis apakah kerusakan hepatosit (sel hati) yang disebabkan oleh yang disebabkan oleh fasciolosis dapat disembuhkan oleh pemberian ekstrak biji palem putri. Apakah *establishment*, dan jumlah telur yang dihasilkan oleh *F. gigantica* selama menginfeksi kambing dapat ditiadakan oleh

pemberian ekstrak biji palem putri. Oleh karena itu, perlu dicarikan alternatif lain cara pengendalian fasciolosis pada ternak kambing sebagai model hewan ruminansia. Metode yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan bahan herbal sebagai anthelmintika alami yang terdistribusi sampai kecacingan dan membunuh cacing pada hati dan kantung empedu. Salah satu bahan herbal yang berpotensi sebagai anthelmintika adalah tumbuhan suku pinang-pinangan.

Potensi ekstrak senyawa alam sebagai anthelmintika sangat prospektif untuk dikembangkan. Ajaiyeoba *et al.* (2001) telah mengekstrak daun dan akar tumbuhan *Gynandropsis gynandra* dan *Buchholzia coriacea* yang memiliki aktivitas anthelmintika melawan cacing *F. gigantica*, *Taenia solium* dan *Pheritima posthuma*, dimana aktivitas senyawa alam yang diekstrak dari akar tumbuhan tersebut lebih mempercepat terjadinya paralisis dan kematian cacing secara *in vitro*. Saowakon *et al.* (2009) membuktikan bahwa aktivitas ekstrak kasar (*crude*) *Artocarpus lakoocha* mengandung 70% komposisi 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene –THS, dimana ekstrak kasar *A. lakoocha* dosis 250 microg/ml mampu menyamai aktivitas antelmintika triclabendazole (TCZ) dosis 80 microg/ml yaitu menurunkan kontraksi dan motilitas *F. gigantica*.

Ekstrak dari beberapa tanaman sudah dibuktikan dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap *establishment* cacing *F. gigantica*. Jeyathilakan *et al.* (2011) membuktikan bahwa konsentrasi 2,5% ekstrak *Allium sativum*, 5% ekstrak *Lawsonia inermis*, dan 5% ekstrak *Opuntia ficus indica* memiliki daya flukisidal terhadap *F. gigantica* secara *in vitro*. Ekstrak alkohol *Allium sativum* dan *Piper longum* menunjukkan efek inhibitor pada *F. gigantica* (Singh *et al.*, 2007). Ekstrak kasar *A. lakoocha* menghambat 75% migrasi larva. Dosis 750 microg/ml ekstrak kasar *A. lakoocha* menyebabkan *swelling*, diikuti *blebbing*, dan *rupture* pada tegumen, menimbulkan erosi dan deskuamasi pada *syncytium* tegumen *F. gigantica*, dan dapat pula membunuh *F. gigantica* dalam waktu 12 s.d 24 jam inkubasi secara *in vitro*.

Ada perbedaan efek ekstrak tanaman *Areca catechu*, *Erythrina indica* dan *Zingiber officinale* dengan anthelmintika oxyclozanide terhadap cacing dewasa *F. gigantica* secara *in vitro*. Ekstrak tanaman *A. catechu* memiliki efikasi yang lebih tinggi daripada oxyclozanide karena menunjukkan efek lethal 100% pada konsentrasi 1%, 2.5% dan 5%. *Z. officinale* hanya efektif pada konsentrasi 5%, sedangkan *E. indica* tidak efektif membunuh cacing *F. gigantica*.

dewasa (Jeyathilakan *et al.*, 2010a). Jeyathilakan *et al.* (2010b) membuktikan perubahan histopatologi organ pada *F. gigantica* dimana aktivitas anthelmintika minyak esensial *Cymbopogon nardus* menunjukkan potensi yang signifikan merusak tegumen, testes, dan vili usus cacing *F. gigantica*.

Tinjauan (*state of the art review*) palem putri (*Veitchia merillii*) tergolong tumbuhan dalam Famili Arecaceae (suku pinang-pinangan). Secara tradisional, biji pinang sudah dimanfaatkan untuk berbagai obat herbal di Indonesia, diantaranya adalah sebagai obat pencahar, *ingradient* sirih, dan stimulator stamina. Meiyanto *et al.* (2008) membuktikan bahwa ekstrak etanolik buah biji pinang memiliki aktifitas antiproliferasi dan memacu apoptosis. Menurut Anjali *et al.* (1995) pemanfaatan pinang juga populer sebagai obat herbal di Thailand dan Asia Selatan karena biji pinang kaya kandungan bahan alam yang mempunyai aktivitas anthelmintika (obat kecacingan), antibakterial, antifungal, antiinflamasi, antioksidan, insektisida, dan lavisidal. Tsai *et al.* (1997) menyatakan bahwa biji pinang digunakan sebagai obat tradisional bangsa China untuk mengobati penyakit liver. Nonaka *et al.* (1981) membuktikan pula bahwa biji pinang mengandung senyawa polifenolik kondensasi dimer, trimer, dan tetramer procyanidin tannin.

### **BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antelmintik ekstrak daun bandotan (*A. conyzoides*) terhadap cacing *F. gigantica* secara *in vitro* yang diambil dari hati sapi aceh. Manfaat penelitian ini memberikan informasi tentang penggunaan daun bandotan (*A. conyzoides*) sebagai salah satu tanaman obat yang dapat digunakan untuk membunuh cacing *F. gigantica* yang sering menyerang hati pada hewan ruminansia terutama sapi.

### **BAB 4. METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Ekstraksi Etanolik Daun Bandotan**

Daun bandotan (*A. conyzoides*) yang dipakai untuk penelitian ini dikarakterisasi di bagian Laboratorium Herbarium Departemen Biologi FMIPA dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala.

Prosedur ekstraksi etanolik mengikuti metode yang dijelaskan oleh Sarojini *et al.* (2011), dan Jiraungkoorskul *et al.* (2005) dengan modifikasi tertentu. Daun *A. conyzoides* ditimbang sebanyak  $\pm 5$  kg dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama beberapa hari, kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Serbuk kemudian dimaserasikan dengan larutan metanol dan diambil filtratnya dengan metode penyaringan. Hasil saringan kemudian diuapkan dalam *vacuum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa-senyawa aktif seperti tanin, alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin, dan steroid, ekstrak biji palem putri dianalisis secara fitokimia seperti dijelaskan oleh El-Sherbini dan Osman (2003) dan Balqis *et al.* (2016).

Analisa fitokimia secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun bandotan. Senyawa yang diidentifikasi adalah alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, steroid dan terpenoid seperti dijelaskan oleh Sarojini *et al.* (2011), dan Jiraungkoorskul *et al.* (2005) dengan modifikasi tertentu. Alkaloid diuji dengan cara menambahkan 1 ml amoniak dan 10 ml kloroform pada 3 gram ekstrak biji palem putri kemudian divorteks sampai homogen. Filtrat yang terbentuk ditambahkan 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N lalu dikocok dan diamkan sampai larutan asam sulfat dan kloroform terpisah. Lapisan asam sulfat yang terbentuk dipisahkan menjadi tiga bagian ke dalam *test plate*. Untuk mengetahui adanya alkaloid maka bagian pertama ditambahkan dengan reagen Meyer, bila terjadi endapan putih maka positif alkaloid. Bagian kedua ditambahkan dengan reagen Wagner, bila terjadi endapan berwarna coklat maka positif terdapat alkaloid. Bagian ketiga ditambahkan dengan reagen Dragendroff, bila terjadi endapan berwarna kemerahan maka positif alkaloid.

Kandungan saponin dan flavonoid ekstrak diuji dengan 3 jenis pereaksi yang berbeda yaitu NaOH, asam sulfat pekat dan  $\text{MgHCl}$ . Perubahan warna pada masing-masing pereaksi disesuaikan dengan tabel reaksi flavonoid. Ekstrak daun bandotan sebanyak 3 gram dimasukkan dalam tabung reaksi yang sudah berisi air suling dengan perbandingan 1:1 kemudian dipanaskan sampai mendidih kemudian dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambahkan 0,5 Mg dan HCl 0.5 mg. Flavonoid positif jika terbentuk endapan orange sampai merah muda atau ungu, sedangkan tabung reaksi kedua dikocok kuat-kuat beberapa saat. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa permanen  $\pm 15$  menit dan hilang dengan penambahan satu tetes asam klorida.

Kandungan tanin diuji dengan cara mengencerkan sebanyak 3 gram ekstrak dengan air suling sampai tidak berwarna. Selanjutnya larutan tersebut diambil 2 ml dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Bila timbul warna biru atau kehitaman menunjukkan adanya tannin. Kandungan steroid dan terpenoid diuji dengan cara menambahkan 3 gram ekstrak ke dalam asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Burchard). Bila timbul warna hijau atau biru maka positif steroid dan bila timbul warna merah menandakan positif triterpenoid (Balqis *et al.*, 2016; Balqis *et al.*, 2017;).

#### 4.2. Uji Fitokimia

Adapun prosedur fitokimia yang dilakukan adalah sebagai berikut (Harborne, 1987)

##### 4.2.1. Uji Alkaloid

Sampel dibasahkan dengan ammonia dan ditambahkan pelarut kloroform. Campuran ekstrak pekat dan pelarut kloroform ditambahkan asam klorida, dikocok kuat-kuat, dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan (lapisan asam klorida dan kloroform). Lapisan asam klorida diambil dan dibagi menjadi 4 bagian. Masing-masing bagian tersebut ditambahkan reagen yang berbeda-beda yaitu reagen Meyer, reagen Dragendorff, reagen Wagner dan reagen Hager. Sampel positif mengandung senyawa alkaloid jika ditandai pada penambahan reagen Meyer terbentuk endapan putih, penambahan reagen Dragendorff terbentuk endapan kemerahan, penambahan pereaksi Wagner timbul endapan coklat dan reagen Hager terjadi perubahan warna.

##### 4.2.2. Uji Flavonoid

Sampel ekstrak pekat ditambahkan NaOH 0,1 M dilanjutkan penambahan HCl 0,1 M. Sampel positif mengandung senyawa flavonoid jika terbentuk warna orange.

##### 4.2.3. Uji Terpenoid, Steroid dan Saponin

Ekstrak ditambahkan pelarut n-heksana sehingga dihasilkan 2 lapisan terdiri dari fraksi larut dan fraksi tidak larut dalam pelarut n-heksana. Fraksi larut diambil dan diuji dengan reagen Liebermann-Burchard. Sampel positif mengandung senyawa terpenoid ditandai jika terbentuk warna merah bata/ungu. Fraksi tidak larut ditambahkan sedikit air panas dan dikocok kuat-kuat, sampel yang mengandung senyawa saponin ditandai jika terbentuk busa



stabil  $\pm$  1 cm dan jika ditambahkan dengan 1 tetes HCl 0,1 N gelembung tetap. Fraksi tidak larut dihidrolis engan 4 ml asam klorida 2 N, dan ditambah dengan reagen Liebermann-Burchard. Sampel positif mengandung senyawa saponin triterpenoid jika terbentuk warna merah bata/ungu, sedangkan sampel positif mengandung senyawa saponin steroid jika terbentuk warna hijau atau biru.

#### 4.2.4. Uji Fenol

Ekstrak pekat diuji dengan reagen FeCl<sub>3</sub>, positif adanya senyawa fenol ditandai dengan terbentuknya warna hijau/ biru kehitaman.

#### 4.3. Uji *in vitro* Mortalitas *Fasciola gigantica* Dewasa

Sampel penelitian yang digunakan adalah *F. gigantica* dewasa, cacing yang masih aktif bergerak, ukuran cacing 5-7 cm, tidak tampak cacat secara anatomi. *F. gigantica* dewasa dikumpulkan dari hati sapi dari tempat pemotongan sapi di Banda Aceh. Hati sapi dibuka dengan gunting secara hati-hati, cacing diambil dari dengan menggunakan lidi atau pinset dan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan NaCl fisiologis. Cacing yang diperoleh dicuci dan dibilas berulang-ulang hingga bersih dengan larutan NaCl fisiologis, kemudian cacing tersebut diletakkan dalam cawan petri yang sudah dipersiapkan sesuai perlakuan (Hamzah *et al.*, 2016; Balqis *et al.*, 2016).

#### 4.4. Pembuatan Preparat Histopatologi

Sampel cacing yang sudah mati dikeluarkan dari dalam Ekstrak etanol bandotan di cuci dengan PBS dan difiksasi dengan larutan neutral buffered formaline (NBF) 10% selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan proses stopping point dalam alkohol 70% selama 12 jam, kemudian dilakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol dengan kadar bertingkat yaitu 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut masing- masing selama 2 jam. Selanjutnya jaringan dijernihkan dengan cairan silol I, silol II, dan silol III masing-masing selama 45 menit. Proses selanjutnya adalah jaringan diinfiltrasi dalam parafin cair I selama 1 jam, parafin cair II, dan parafin cair III yang masing-masing prosesnya dilakukan selama 45 menit, kemudian dilakukan proses embedding dalam parafin blok. Jaringan di dalam parafin blok disayat dengan ketebalan 5 mikron dan irisan diletakkan pada tissue bath, kemudian diambil dengan

kaca benda untuk selanjutnya dinkubasikn ke dalam slide warmer guna membuang sisa paraffin (Kiernan, 1990).

#### 4.5. Prosedur Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Proses pewarnaan dimulai dengan deparafinisasi menggunakan silol I selama 5 menit dan silol II selama 2 menit. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi dengan alkohol kadar menurun yaitu dari alkohol absolut I dan II, alkohol 96% I dan II, alkohol 90% I dan II masing-masing selama 2 menit, Selanjutnya dicuci dengan air mengalir. Kemudian dimasukkan kedalam larutan hematoksilin selama 5 menit, lalu dimasukkan kedalam air mengalir dan dimasukkan ke dalam acid alcohol satu kali celup dan dimasukkan ke dalam air. Setelah itu dimasukkan ke dalam larutan eosin selama 5 menit dan dehidrasi kembali dengan alkohol 96% I dan II, alkohol absolut I dan II masing-masing dua kali celup. Selanjutnya dilakukan proses clearing dengan silol I, II, dan III masing-masing selama 3 menit. Kemudian dilakukan mounting dengan entelan dan diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus dan dilanjutkan dengan pembuatan foto mikrograf (Kiernan, 1990).

#### 4.6. Parameter Penelitian

Parameter yang diamati pada uji daya antelmintik adalah motilitas cacing dan waktu mortilitas yang ditentukan mulai saat cacing direndam dalam larutan sampai cacing mengalami kematian. Parameter histopatologi cacing diamati perubahan yang terjadi pada tegumen dan organ cacing yang lain.

#### 4.7. Analisis Data

Data-data pada perubahan histopatologi cacing dianalisis secara deskriptif.

**BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI**

Identifikasi bahan herbal berupa daun bandotan yang dijadikan sebagai kajian untuk anthelmintika dalam penelitian diperoleh klasifikasi taksonomi sebagai berikut:

Regnum/Kingdom	: Plantae
Sub Regnum/Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisio/Super Division	: Spermatophyta
Divisio/Division	: Magnoliophyta
Classic/Class	: Magnoliopsida
Sub Classic/Sub Class	: Asteridae
Ordo/Order	: Asterales
Familia/Family	: Asteraceae
Genus/Genus	: <i>Ageratum</i> L.
Species/Species	: <i>Ageratum conyzoides</i> L

Berdasarkan hasil identifikasi bahan herbal yang digunakan dalam penelitian ini diketahui bahwa daun bandotan termasuk dalam family Asteraceae dan spesies *Ageratum conyzoides* L. Herbal ini sedikit pahit, pedas dan sifatnya netral. *A. conyzoides* L berkhasiat stimulant, tonik, pereda demam (antipiretik), antioksik, menghilangkan pembengkakan, menghentikan perdarahan, daun ini juga dapat digunakan sebagai insektisida nabati (Dalimartha, 2000).

Mengevaluasi khasiat yang terkandung dalam daun bandotan, penelitian ini melakukan analisis fitokimia terhadap ekstrak etanol daun bandotan. Hasil uji fitokimia disajikan pada Tabel 2.

Table 2. Hasil analisis fitokimia Ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L)

Kandungan Metabolit	Reagen	Hasil Uji	Hasil Pengamatan
Alkaloid	Mayer	+	Terbentuk endapan putih
	Wagner	+	Terbentuk endapan coklat
	Dragendorff	+	Terbentuk endapan merah
Steroid	Uji Liebermenn Burchard	-	Tidak terbentuk warna hijau
Terpenoid	Uji Liebermenn Burchard	+	Terbentuk warna merah
Saponin	Pengocokan	-	Tidak berbusa
Flavonoid	Hcl dan Logam Mg	+	Terbentuk warna Merah
Fenolik/Tanin	FeCl <sub>3</sub>	+	Terbentuk warna Hijau

Berdasarkan hasil analisis fitokimia terhadap ekstrak daun bandotan menunjukkan bahwa adanya kandungan metabolit berupa alkaloid, terpenoid, flavonoid dan tannin. Beberapa peneliti menyebutkan bahwa kandungan kimia yang terdapat dalam tanaman herbal dilaporkan memiliki aktivitas anthelmintik pada berbagai stadium siklus hidup cacing. Dalam penelitian ini, efektifitas ekstrak daun bandotan diuji pada cacing *F. gigantica* yang dikoleksi dari hati sapi aceh. Hasil koleksi cacing hati disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Cacing *Fasciola gigantica* pada hati sapi aceh

Cacing *Fasciola gigantica* yang dikoleksi tersebut diuji tantang dengan ekstrak daun bandotan. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase mortalitas cacing *F. gigantica* dalam ekstrak etanol daun *A. conyzoides*

Konsentrasi	Waktu	<i>A. conyzoides</i>
KontrolNaCl Fisiologis	5 menit	0
	10 menit	0
	15 menit	0
10 mg/ml*	5 menit	2
	10 menit	5
	15 menit	5
20 mg/ml	5 menit	2
	10 menit	3
	15 menit	5
30 mg/ml	5 menit	1
	10 menit	3
	15 menit	3
40 mg/ml	5 menit	0
	10 menit	2
	15 menit	2

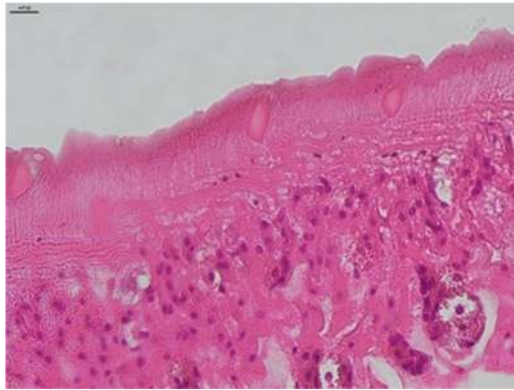
Semua kelompok cacing yang diamati pada Tabel 3 menunjukkan kematian pada menit ke 15 dimana hal ini ditandai dengan tidak adanya pergerakan maupun aktivitas pada cacing. Dapat disimpulkan bahwa pemberian larutan ekstrak etanol daun bandotan berpengaruh terhadap waktu kematian cacing *F. Gigantica*. Kondisi ini disebabkan karena pengaruh fitokimia hasil metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol bandotan.

Hasil pemeriksaan fitokimia menunjukkan saponin, bisdemetyoxykurkumin, monoterpene, sesquiterpene, flavonoid dan Alkaloid. Temu ireng juga mengandung monoterpene dan sesquiterpene, dimana zat-zat ini bersifat antagonis asetilkolin sehingga menyebabkan paralisis pada tubuh cacing dan menekan kontraksi otot polos cacing sehingga cacing menjadi lemas atau lumpuh, yang akhirnya dapat menyebabkan kematian cacing (Riayati, 1989). Bandotan mengandung tannin dan saponin. Tannin mempunyai efek vermifuga yaitu dengan cara merusak protein tubuh cacing (Harvey dan John, 2005), sedangkan saponin mempunyai efek antihelminik dengan menginduksi terjadinya radikal bebas sehingga mempercepat kerusakan subseluler dan mengganggu permeabilitas membran sel cacing (Babu et al., 2006). Ridwan dan Ayunita (2007) menyebutkan bahwa saponin dapat membantu menurunkan tegangan permukaan tubuh cacing, sehingga bahan aktif dapat mudah terserap sehingga aktivitas anthelmintika dapat bekerja secara optimal.

Kandungan alkaloid dan flavonoid, menurut Henry (1949), dapat menghambat kerja enzim asetilkolinesterase yang berperan memecah asetilkolin pada tubuh cacing sehingga menimbulkan kejang (Bhadoriya et al., 2011; Faradila, 2013), menyebabkan kelumpuhan (paralisis) otot cacing dan menyebabkan kematian (Henry, 1949; Sandika et al., 2012). Alkaloid juga memiliki efek yang dapat meningkatkan tonisitas gastrointestinal sehingga menguatkan gerakan peristaltik untuk mengeluarkan cacing dari saluran cerna (Lateef et al., 2003).

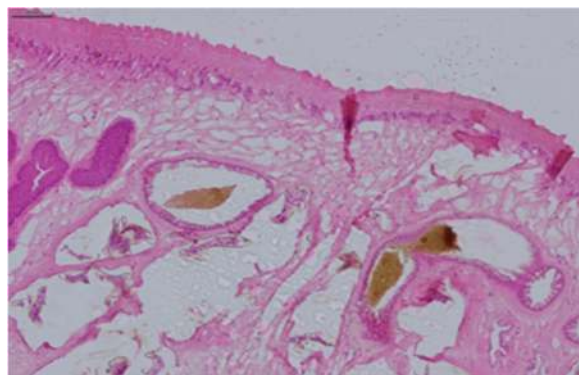
Kematian cacing juga disebabkan oleh flavonoid, karena dapat menyebabkan denaturasi protein dalam tubuh cacing (Bhadoriya et al., 2011; Faradila, 2013). Peningkatan dosis larutan ekstrak etanol bandotan perendaman secara *in vitro* menyebabkan kematian yang semakin cepat pada cacing. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin banyak kandungan bahan aktif yang bersifat anthelmintik yang bekerja dalam membunuh cacing *F. gigantea* dewasa.

Berdasarkan data mortalitas yang terlihat dari Tabel 3. Ekstrak etanol daun bandotan menunjukkan aktivitas anthelmentik yang berbeda berdasarkan tingkatan konsentrasi yang digunakan. Kekentalan konsentrasi menyebabkan cacing *F. gigantica* mengalami cepat kematian. Hal ini diduga karena kandungan kimia yang terdapat didalam ekstrak daun bandotan merusak tegumen dari cacing *F. gigantica* tersebut. Hasil pengamatan terhadap perubahan histopatologi tegumen cacing *F. gigantica* pada kelompok 1. NaCL Physiologis (kontrol) menunjukkan permukaan tegumen yang normal, utuh dengan ketebalan yang optimal, demikian juga dengan lapisan stroma tidak menunjukkan perubahan, disajikan pada Gambar 2.



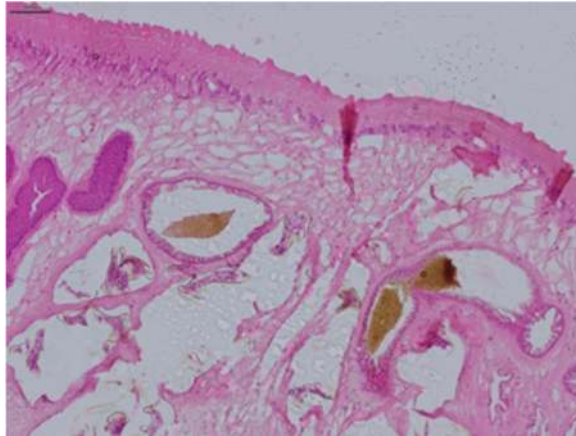
Gambar 2. Pemeriksaan tegumen cacing *F. gigantica* kelompok kontrol

Pada kelompok 2. Konsentrasi 10 % ekstrak etanol bandotan menunjukkan perubahan pada kutikula dengan terjadi penurunan ketebalan kutikula sedangkan bagian stroma terjadi pengurangan matrik, yang ditandai ketidakmampuan jaringan mengikat warna eosin sehingga warna jaringan terlihat lebih pucat, hasil penelitian disajikan pada Gambar 3.



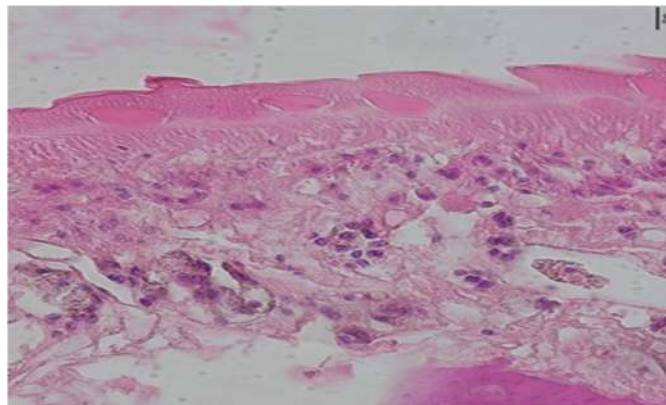
Gambar 3. Pemeriksaan tegumen cacing *F. gigantica* kelompok konsentrasi 10 %

Pada kelompok 3. Konsentrasi 20 % ekstrak etanol bandotan menunjukkan perubahan pada kutikula dengan terjadi penurunan ketebalan kutikula yang lebih rendah bila dibandingkan dengan konsentrasi 10% sedangkan bagian stroma terjadi pengurangan matrik, yang ditandai ketidakmanpuan jaringan mengikat warna eosin, kondisi yang sama juga terlihat pada lapisan kutikulanya, sehingga warna jaringan terlihat lebih pucat. Hasil penelitian disajikan pada Gambar 4.



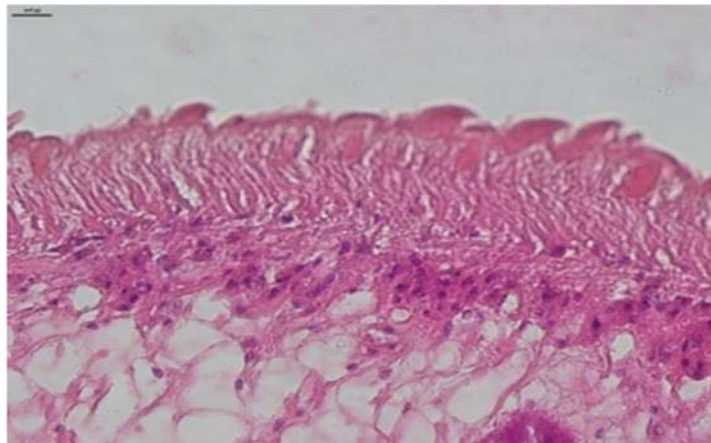
Gambar 4. Pemeriksaan tegumen cacing *F. gigantea* kelompok Konsentrasi 20 %

Pada kelompok 4. Konsentrasi 30 % ekstrak etanol bandotan menunjukkan perubahan pada kutikula dengan terjadi peningkatan ketebalan kutikula yang disebabkan terjadi pembengkakan (udem) pada sel-sel permukaannya, sehingga kutikula terlihat lebih tebal permukaannya. Gambaran histopatologi lapisan stroma perubahan berupa piknotis, karioreksis, dan kariolisis, serta sebagian jaringan nekrosis. Hasil penelitian disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Pemeriksaan tegumen cacing *F. gigantea* kelompok Konsentrasi 30 %

Pada kelompok 5. Konsentrasi 40 % ekstrak etanol bandotan menunjukkan perubahan pada lapisan kutikula dengan terjadi proliferasi sel-sel apitel silindris sehingga kutikula terlihat lebih tebal, jarak antar sel epitel silindrispun dengan limit yang rendah, hal ini disebabkan adanya erupsi/ desquamsi sel epitel. Gambaran histopatologi lapisan stroma terlihat jumlah sel pada stroma semakin berkurang, terlihat juga gambaran inti sel piknotis pada bagian bawah tegumen, tetapi makin kedalam terlihat jaringan nekrosis semakin meluas, Hasil penelitian disajikan pada Gambar 6.



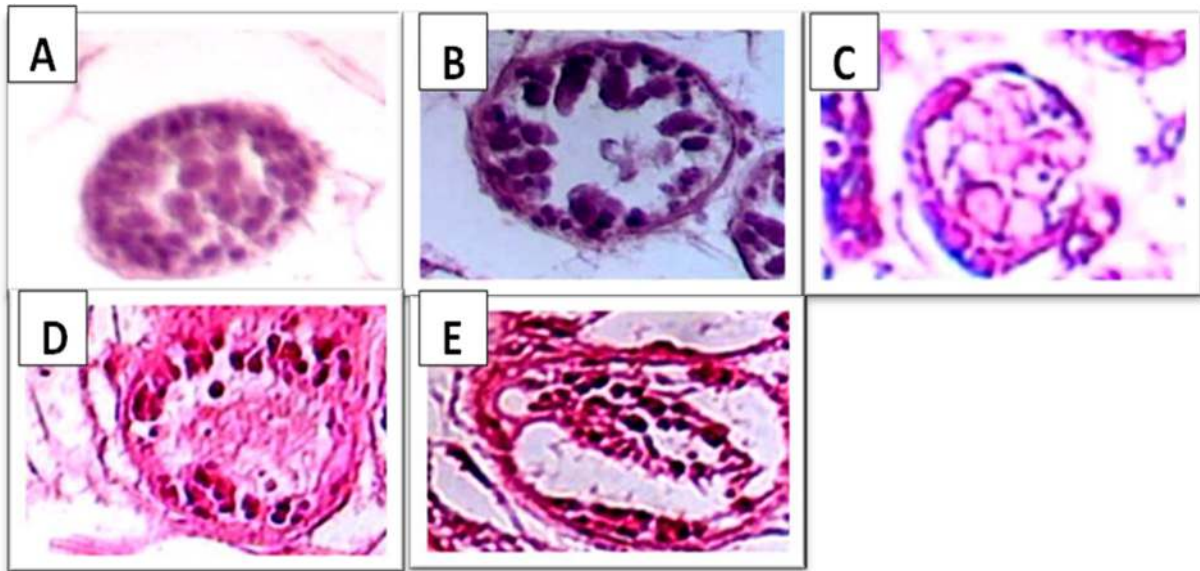
Gambar 6. Pemeriksaan tegumen cacing *F. gigantica* kelompok Konsentrasi 40 %

Tegumen pada trematoda memiliki peran penting untuk osmoregulasi, proteksi, seksresi, dan sintesis, oleh karenanya tegumen merupakan target utama bagi obat (Massoud et al., 2013). Pada kontrol positif dan perlakuan menunjukkan terjadinya deskuamasi pada vili usus cacing *F. gigantica*. Chafton, (2006), Iqbal *et al.* (2007), dan Bachaya *et al.* (2009) mengatakan bahwa tanin dapat menghambat kerja enzim dan mengganggu proses metabolisme pencernaan sehingga cacing akan kekurangan nutrisi yang pada akhirnya menyebabkan kematian cacing.

Selain dari pemeriksaan tegumen atau kutikula, dalam penelitian ini dilakukan juga pemeriksaan terhadap efektivitas kerusakan organ kelamin jantan dan betina pada cacing *F. gigantica* dengan menggunakan pemeriksaan histopatologi. Hasil pengamatan terhadap perubahan histopatologi alat kelamin betina pada cacing *F. gigantica* pada masing-masing kelompok dapat dijelaskan bahwa pada kelompok kontrol uterus terlihat utuh, kompak,



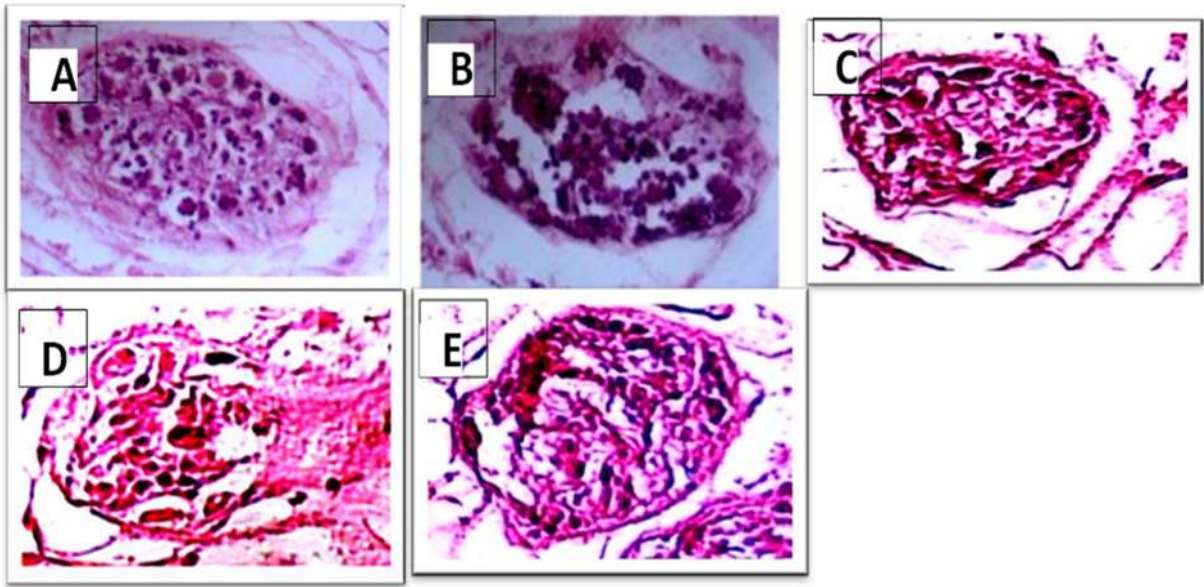
dimana di dalam uterus berisi telur. Pada kelompok konsentrasi 10%: terlihat uterus sebagian sudah tidak berisi telur dan terlihat ada penumpukan material golden yang mengindikasikan adanya kerusakan ovum. Konsentrasi 20 %, uterus terlihat kosong yang menunjukkan ekstrak etanol bandotan bersifat ovasidal. Konsentrasi 30%, terlihat kerusakan pada uterus dan jumlah ovum yang makin menyusut di ovarium. Sedangkan pada konsentrasi 40%, menunjukkan adanya pembengkakan dan kekosongan pada uterus, sel telur telah menghilang yang disebabkan pengecilan atropi dan kematian sel telur. Hasil penelitian terhadap pemeriksaan histopatologi pada alat kelamin betina cacing *F. gigantica* dewasa disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Histologi ovary cacing *Fasciola gigantica* dengan pembesaran 400x. (a) K1 (b) K2 (albendazole) (c) P1 (konsentrasi 10%) (d) P2 (konsentrasi 25%) (e) P3 (konsentrasi 50%)

Pemeriksaan terhadap efektivitas kerusakan organ kelamin jantan pada cacing *F. gigantica* dengan menggunakan pemeriksaan histopatologi pada masing-masing dapat kelompok dapat dijelaskan bahwa pada kelompok kontrol yang menggunakan NaCl fisiologis menunjukkan gambaran testes yang sehat. Konsentrasi 10%: terlihat gambaran histopatologi di mana sel-sel pada tubulus seminiferus membengkak. Konsentrasi 20%. terlihat gambaran histopatologi dimana sebagian tubulus semini ferus mengalamo atropi (mengecil). Kelompok konsentrasi 30%, terlihat sebagian besar tubulus seminiferus mulai menghilang. Sedangkan pada kelompok konsentrasi 40 % sebagian besar tubulus semini ferus

menghilang, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol bandotan bersifat spemasidal. Hasil penelitian terhadap pewarnaan histopatologi pada alat kelamin jantan masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Histologi testis cacing *Fasciola gigantica* dengan pembesaran 400x. (a) K1 (b) K2 (albendazole) (c) P1 (konsentrasi 10%) (d) P2 (konsentrasi 25%) (e) P3 (konsentrasi 50%)

## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa herbal alam yang digunakan adalah termasuk dalam family Asteraceae dan spesies *Ageratum conyzoides* L. Adapun kandungan fitokimia yang terdapat dalam daun bandotan adalah alkaloid, terpenoid, flavonoid dan tannin. Pemberian ekstrak Bahan herbal daun bandotan secara *in vitro* memiliki pengaruh terhadap mortalitas cacing *F. gigantica*, dan ekstrak ini juga dapat menyebabkan terjadinya perubahan histopatologi pada tegumen, organ reproduksi jantan dan betina.

### Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan untuk melihat efektivitas ekstrak bahan herbal daun bandotan dan waktu mortalitas serta perubahan histopatologi cacing *F. gigantica* secara *in vivo*

## DAFTAR PUSTAKA

- Ajaiyeoba E.A., P.A. Onocha and O.T. Olarenwaju. 2001. In vitro Anthelmintic Properties of *Buchholzia coriacea* and *Gynandropsis gynandra* Extracts. *Pharmaceutical Biology*. 39(3): 217-220.
- Anjali, S. and A.R. Rao. 1995. Modulatory influence of arecanut on antioxidant 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole-induced hepatic detoxification system and antioxidant defense mechanism in mice. *Cancer Lett.*: 91, 107–114.
- Balqis U. 2004. Pengaruh Pemberian Ekskretori-Sekretori (ES) Cacing *Ascaridia galli* Dewasa, L<sub>2</sub>, dan Kombinasinya Terhadap Perubahan Struktur Morfologi Saluran Cerna Ayam Petelur. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Balqis, U., Hambal, M., Darmawi, Harris, A., Rasmaidar, Athaillah, F., Muttaqien, Azhar, Ismail, dan Daud, R. 2016. Perbandingan Aktivitas Antelmintik Albendazole dan Levamisole Terhadap *Ascaridia galli* Secara *in vitro*. *J. ACTA Vet. Indonesiana*: 4(2): 97-102.
- Balqis, U., Muslina, Hambal, M., Athaillah, F., Muttaqien, Azhar, Ismail, Rastina, Eliawardani, Harris, A., Hamzah, A., Vanda, H., and Darmawi. 2017. Histopathological changes of egg cells in the uterine of *Ascaridia galli* after treatment with extract of *Veitchia merrillii* Nuts. *Majalah Obat Tradisional (Trad. Med. J.)*, 22(3): 139-145.
- Balqis, U., M. Hambal, Rinidar, F. Athaillah, Ismail, Azhar, H. Vanda, and Darmawi. 2017. Cuticular surface damage of *Ascaridia galli* adult worms treated with *Veitchia merrillii* betel nuts extract *in vitro*. *Veterinary World*, 10(12): 732-737.
- Balqis, U., Darmawi, C.D. Iskandar, and Salim, M.N. 2018. Angiogenesis activity of *Jatropha curcas* L. Latex in cream formulation on wound healing in mice. *Veterinary World*, 11(7): 709-713.
- Bhadoriya SS, Uplanchiwar V, Mishra V, Ganeshpurkar A, Raut S, Jain KS. 2011. In vitro anthelmintic and antimicrobial potential of *flavonoid* rich fraction from *Tamarindus indica* seed coat. *Pharmacologyonline* 3: 412- 420.
- Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goñi F, and Berasain P. 2004. Purification, Characterization, and Immunolocalization of Paramyosin from the Adult Stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde.
- Darmawi, Hambal M, Estuningsih SE, Jamin F, Balqis U. 2008<sup>a</sup>. Visualisasi Pita Protein Ekskretori/Sekretori dan Tegumen *Fasciola gigantica*. *Proceeding*, Seminar Nasional BRR NAD-Nias, Banda Aceh, 8 -11 Maret.
- Darmawi, Hambal M, Estuningsih SE, Jamin F, Balqis U. 2008<sup>b</sup>. Kuantitas Protein Ekskretori/Sekretori dan Tegumen *Fasciola gigantica*. *Proceeding*, Seminar Nasional BKS-PTN Wilayah Barat, Banda Aceh, 22 – 25 Juli.
- Darmawi, Hambal M., dan Balqis U. 2009. Produksi, Aplikasi, dan Evaluasi *Imunoglobulin Yolk* Anti-idiotipe *Fasciola gigantica* Sebagai Kandidat Vaksin Pada Domba. Laporan Penelitian Riset insentif, Kementrian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia.
- Darmawi, Balqis, U., Hambal, M., Tiuria, R., Frengki and Priosoeryanto, B.P. 2013. Mucosal mast cells response in the jejunum of *A. galli* infected laying hens. *Med. Pet.* 36(2): 113-119.
- Dreyfuss G, Vignoles P, and Rondelaud D. 2003. Natural Infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in Central France. *Parasitology Research*, Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde.

- Estuningsih SE, Adiwinata G, Widjajanti S, Piedrafita D. 2004. Pengembangan Teknik Diagnosa Fasciolosis pada Sapi dengan Antibodi Monoklonal dalam *capture* ELISA Untuk Deteksi Antigen. Seminar Nasional Parasitologi dan Toksikologi Veteriner. Balai Penelitian Veteriner Bogor, 20 – 21 April 2004.
- Faradila A. 2013. Uji daya anthelmintik ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica less*) terhadap cacing gelang (*Ascaris suum*) secara in vitro. *Skripsi*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Hambal M. 1998. Distribution of *Fasciola gigantica* and Other Helminthes in Cattle in Sukabumi. Comprehensive Summaries of Berlin Dissertations from the Faculty of Veterinary. Berlin Universitat, Germany.
- Hambal M dan Sayuti A. 2001. Distribusi *Lymnaea rubiginosa* Sebagai Induk Semang Antara dari *Fasciola gigantica* di Sukabumi. *Jurnal Medika Veterinaria* 1(1): 13 – 16.
- Hambal M. 2002. Interaksi *Echinostoma spp.* dengan Larva Trematoda Lainnya pada Siput *Lymnaea rubiginosa* yang Terinfeksi Alami. *Jurnal Medika Veterinaria* 2(2): 109 – 113.
- Hamzah, A., Hambal, M., U. Balqis, Darmawi, Maryam, Rasmaidar, Athaillah, F., Muttaqien, Azhar, Ismail, Rastina and Eliawardani. 2016. *In vitro* Anthelmintic Activity of *Veitchia merrillii* Nuts Against *Ascaridia galli*. *Majalah Obat Tradisional (Trad. Med. J.)*, 21(2): 55-62.
- Hansen J and Perry B. 1994. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants, Published by the International Laboratory for Research on Animal Diseases, P.O. Box 30709, Nairobi, Kenya
- Henry TA. 1949. The plants alkaloids. Chemical Research Laboratories and Superintendent of Laboratories, Imperial Institute, London. The Blakiston Company Fourth Edition
- Jeyathilakan N., K. Murali, A. Anandaraj, S.A. Basith. 2010a. *In vitro* evaluation of anthelmintic property of herbal plants against *Fasciola gigantica*. *Indian Journal of Animal Sciences*. 80(11): 1070-1074
- Jeyathilakan N., K. Murali, A. Anandaraj, B.R. Latha dan S. A. Basith. 2010b. Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences* 6 (5): 204-209
- Jeyathilakan N., K. Murali, A. Anandaraj and S. A. Basith. 2011. *In vitro* evaluation of anthelmintic property of ethno-veterinary plant extracts against the liver fluke *Fasciola gigantica*. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(1): 26 – 30.
- Law RHP, Smooker PMS, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, and Spithill TW. 2003. Cloning and Expression of the Major Secreted Cathepsin B-Like Protein from Juvenile *Fasciola hepatica* and Analysis of Immunogenicity Following Liver Fluke Infection. *Infection and Immunity*, 71(12): 6921-6932.
- Meiyanto E., R. A., Susidarti, S. Handayani, and F. Rahmi. 2008. Ethanolic extract of *Areca catechu* seeds inhibit proliferation and induce apoptosis on MCF-7 cells. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19(1), 12 – 19.
- Nambi PA, Yadav SC, Raina OK, Sriveny D and Saini M. 2005. Vaccination of Buffaloes with *Fasciola gigantica* Recombinant Fatty Acid Binding Protein. *Parasitology Research*, Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde.
- Nonaka, G.I., F.L. Hsu, and I. Nishioka. 1981. Structures of dimeric, trimeric, and tetrameric procyanidins from *Areca catechu* L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 32, 781–783.
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Rodríguez-Medina JR, Arias M, Morrondo P, and Díez-Baños P. 2004. Isolation, Identification and Expression of a *Fasciola hepatica*

- cDNA Encoding a 2.9-kDa Recombinant Protein for the Diagnosis of Ovine Fasciolosis. *Parasitology Research*, Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde.
- Pithayanukul, P., Nithitanakool, S., and R. Bavovada. 2009. Hepatoprotective Potential of Extracts from Seeds of *Areca catechu* and Nutgalls of *Quercus infectoria*. *Journal Molecules*. 14: 4987-5000.
- Raadsma HW, N.M. Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW and Piedrafita D. 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep: I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Veterinary Parasitology*: 143 (3-4),
- Salim, M.N., D. Masyitha, Harris, A., U. Balqis, C.D. Iskandar, M. Hambal, and Darmawi. 2018. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* Linn. Latex in cream formulation on CD68 expression in mice skin wound. *Veterinary World*, 11(2): 99-103.
- Saowakon N, T. Tansatit, C. Wanichanon, W. Chanakul, V. Reutrakul, and P. Sobhon. 2009. *Fasciola gigantica*: anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. *Exp Parasitol*. 122(4):289-98.
- Singh, T.U., D. Kumar and P.K. Gupta. 2007. Inhibitory effect of alcoholic extract of *Allium sativum* and *Piper longum* on gross visual motility and glucose uptake of *Fasciola gigantica* and *Gigantocotyle explanatum*. *Journal of Veterinary Parasitology*, 21: 121 – 124
- Tsai, C.C., C.T. Kao, C.T Hsu, C.C. Lin, and J.G Lin. 1997. Evaluation of four prescriptions of traditional Chinese medicine: Syh-mo-yiin, guizhi-fuling-wan, shieh-qing-wan and syh-nih-sann on experimental acute liver damage in rats. *J. Ethnopharmacol.*: 55, 213–222.
- Vervelde L, Bakker N, Kooyman FNJ, Cornelissen AWCA, Bank CMC, Nyame AK, Cummings RD, and Die IV. 2003. Vaccination-induced Protection of Lambs Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus* Correlates With High IgG Antibody Responses to the LDNF Glycan Antigen. *Glycobiol*. 13 (11): 795 – 804.
- Winarsih W. 2005. Pengaruh Probiotik Dalam Pengendalian Salmonellosis Sub Klinis Pada Ayam: Gambaran Patologis dan Performan. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Yadav SC, Saini M, Raina OK, Nambi PA, Jadav K and Sriveny D. 2005. *Fasciola gigantica* Cathepsin-L Cysteine Proteinase in the Detection of Early Experimental Fasciolosis in Ruminants. *Parasitology Research*, Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde.
- Zhang W, Moreau E, Peigné F, Huang W, and Chauvin A. 2005. Comparison of Modulation of Sheep, Mouse and Buffalo Lymphocyte Responses by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Excretory-Secretory Products. *Parasitology Research*, Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde.
- Sandika B, Raharjo, Ducha N. 2012. Pengaruh Pemberian Air Rebusan Akar Delima (*Punica granatum* L.) terhadap Mortalitas *Ascaris suum* Goesze. Secara In Vitro. *Lentera Bio* 1(2): 81-86.

## LAMPIRAN

### DARAF ARTIKEL HASIL PENELITIAN

#### Tegument surface layer changes of *Fasciola gigantica* adult worms treated with *Ageratum conyzoides* L. leaves extract *in vitro*

##### Abstract

**Aim:** The objective of this research was to *in vitro* evaluate the tegument surface layer changes of *Fasciola gigantica* adult worms treated with ethanolic extract of leaves *Ageratum conyzoides* L..

**Materials and Methods:** Phytochemical screening were done using FeCl<sub>3</sub>, Wagner and Dragendorff reagents, NaOH, MgHCl, and Liebermann Burchard reaction test. Amount of 16 worms were segregated into four groups with three replicates. Four worms of each group submerged into phosphate buffered saline, 25 mg/ml, and 75 mg/ml crude ethanolic extract of *A. conyzoides* L., and 15 mg/ml albendazole. The effect of these extract were observed 40 h after incubation as soon as worms death. The worms were sectioned transversally and were explored for any tegument surface layer histopathological changes in their body surface under microscope.

**Results:** We found that the ethanolic extract of *A. conyzoides* L. betel nuts contains tannins, alkaloids, flavonoids, triterpenoids, and saponins. The ethanolic extract of leaves *A. conyzoides* L. induce surface alterations caused tegument surface changes of *F. gigantica* adult worms.

**Conclusion:** We concluded that ethanolic extract of leaves *A. conyzoides* L. posses anthelmintic activity caused tegument surface layer of *F. gigantica* adult worms.

**Keywords:** *Ageratum conyzoides* L., *Fasciola gigantica*, tegument, anthelmintics

##### Introduction

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* has a worldwide distribution affecting cattle, sheep, goats, pigs, horses, rabbits and humans as well. It causes major economical losses to the cattle industry (estimated in billons of dollars) by decreasing milk and/or



meat production, low re-productive efficiency, liver seizures in slaughterhouses, high costs to control parasitism and deaths [1,2].

The control of this disease has been based on the application of anthelmintics, but due to the development of resistance it seems that the efficacy of some chemical drugs has decreased [3,4]. The use of plants with anthelmintic activity may be an alternative to fluke control, given the great diversity of ecosystems. The opportunity of finding bioactive compounds with anti-fluke properties significantly increases because, secondary metabolites (SM) are the most important compounds as new alternatives for parasite control. Some SM such as alkaloids, saponins, skimmianins A and C, tannins, flavonoids, terpenes (mono, di and sesquiterpenes) have been shown to be active against a wide range of parasites [5]. A number of anthelmintic compounds have been used in controlling the parasite infected in animals.

Treatments using commercial anthelmintic drugs are not only expensive but also disadvantages like the risk of environmental pollution, affect host health, and leads to wide spread development of resistance to most of the current anthelmintics [12] for example the existence of multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Colombia [13]. Anthelmintic resistance is almost cosmopolitan in distribution in almost all species of domestic animals and even in some parasites of human beings [14]. In Punjab (Pakistan), several gastrointestinal parasite namely *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia curticei*, *Teladorsagia circumcincta* and *Oesophagostomum* spp. had resistance on oxfendazole in beetal goats [15]. The control of gastrointestinal nematodes using anthelmintic in cattle leads to development of *Cooperia punctata*, *Cooperia pectinata*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris* spp. population resistant to moxidectin [16]. The previously finding indicated that the commercial anthelmintics use has led to ivermectin resistance in *Cooperia* spp. and *Haemonchus* spp. The presence of resistance to albendazole and levamisole was also observed on some farms in the northwestern region of São Paulo State, Brazil [17]. Regarding the prevalence of anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes, [18] suggested that testing of anthelmintic efficacy should be performed more intensively due to possible insufficient efficacy of ivermectin and benzimidazole on cattle farms in Germany, Belgium and Sweden.

Because of the problems arising from the use of conventional anthelmintics highlighted above, some investigators have mentioned the importance to find alternative ethnomedicinal extracted from plant materials. Many plants species used throughout the world in traditional medicine as better alternative is gaining significance. In the study of

[19] evaluated aqueous extracts of immature fruits of the mango *Mangifera indica* L. for inhibition of larval development indicate that this fruit could assist *Strongyloides stercoralis* control. For anthelmintic properties *in vitro* and *in vivo* employed by [20] showed that both *Trianthema portulacastrum* and *Musa paradisiaca* possess strong anthelmintic activity against *Oesophagostomum columbianum*, *Trichuris ovis*, *Trichostrongylus* spp., and *H. contortus*. In another study using plant *Lippia sidoides*, [21] noticed that the efficacy of the *L. sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes, *H. contortus*. The traditional system of treating parasitic diseases hold a great promise as source of easily available effective anthelmintic agents to the people particularly in tropical developing countries, including Indonesia.

Because of easy availability, *F. gigantica* adult worms are used as suitable models for screening of anthelmintic drug. Various researchers observed *in vitro* anthelmintic effects of bishkatali *Azadirachta indica* (neem) leaves extract against *F. gigantica* [2, 3, 22, 23]. Regarding anthelmintic activity against *F. gigantica*, [24] reported that the parasitocidal effect of albendazole was less in comparison with saponins extracted from *Teucrium stocksianum*. [25] reported that citrus peels extracts have potential anthelmintic properties against *F. gigantica*. [8] used the *Curcuma longa* L. roots alcoholic extract against worm *F. gigantica*. [6] and [7] demonstrated that the effect of *Mentha longifolia* leaf extract might contribute to the development of effective against *F. gigantica*. Previously, [22] suggested that dust of bishkatali (*Polygonum hydropiper*) leaves can be used with litter for inhibition of development of *F. gigantica* eggs and fresh juice and extract of *A. indica* and papaya (*Carica papaya*) may be impregnated in litter and used after sun dry.

*Ageratum conyzoides* L. betel nuts from the Palmaceae family is a tropical fruit, which is also called "Christmas Palm" because its fruits become bright scarlet and tend to be that color in winter and is widely distributed in different parts of the world. The fatty acid composition, determined by gas chromatography, rendered that palmitic, oleic and linoleic acids were the major compounds in extracts from the *A. conyzoides* L. species [26]. Our previously study indicated that *A. conyzoides* L. betel nuts extract reduced motility, paralysis, and death time *F. gigantica* adult worms *in vitro*, is possible to be potential for developing herbal-based anthelmintic to control *F. gigantica* [27, 28]. But unfortunately, the research did not show any histological alterations in their tegument architecture after exposure to *A. conyzoides* L. extract. It is hoped that this study may improve knowledge of the anthelmintic activity of *A. conyzoides* L. nuts extract caused any histological alterations in the tissue of *F. gigantica* adult worms using light microscopy.



## Materials and Methods

### Ethics Statement

This research was approved by the Animal Ethics Committee of Faculty of Veterinary Medicine, Syiah Kuala University (Approval No. 10/KEPH-C/III/2016). The chickens from which *F. gigantea* adult worms were collected, was handled in accordance with good animal practices required by the Animal Ethics Committee and the guidelines of local rules and regulations.

### Extraction of *Ageratum conyzoides* L. betel nuts

*A. conyzoides* L. betel nuts were procured from around yard areas of Banda Aceh. The plant were identified in the Herbarium, Departement of Biological Sciences, Syiah Kuala University, and voucher specimen number of 63. The betel nuts were pulverized into powder by pounding in a mortar using a pestle. The powder of betel nuts (250 g) were extracted by using ethanol as explained by [20, 29]. Dry powdered betel nuts material (1.5 kg) was soaked in 6 L of 70% aqueous (aq.) ethanol by cold maceration at room temperature for three days. The filtrate collected through muslin cloth by repeated soaking of dry powder of betel nuts materials. The extract was then concentrated by evaporation under a temperature 40°C to dryness as explained by [20, 30] with certain modification. The extract was then resuspended in distilled water and diluted to the desired concentration.

### Phytochemical screening

Phytochemical screening were done for verifying tannins, alkaloids, flavonoids, saponins, terpenoids, and steroids groups present in the extract. Tannins were tested using FeCl<sub>3</sub>. Alkaloids were verified using Wagner and Dragendorff reagents. Flavonoids and saponins were determined by the NaOH, concentrated sulphate acid, and MgHCl tests. Terpenoids and steroids were verified by the Liebermann Burchard reaction as described by previously authors [19, 27, 28, 29, 31].

### Collection of *Ascaridia galli* roundworms

The *F. gigantea* roundworms acquired from intestines of native-bred domestic fowl (*Gallus domesticus*) which were procured from the local chickens in Banda Aceh. The collected intestines immediately taken to the Research Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of Syiah Kuala University. All of the intestines were dissected longitudinally and submerged in normal saline solution. All worms visible to the naked eye

were collected using a pair of forceps. *F. gigantica* adult worms approximately of having an average size as 5-7 cm were collected in and thoroughly washed with 9% neutral phosphate-buffered saline (PBS). The most robust specimens of the lot were chosen for *in vitro* anthelmintic activity testing as described by previously authors [27, 28, 32].

#### **Anthelmintic activity**

The effect of the *A. conyzoides* L. betel nuts extract was assayed on the nematode. Amount of four *F. gigantica* adult worms placed in petri dishes. The worms were maintained in normal saline solution. The pre-labeled extracted from *A. conyzoides* L. betel nuts were tested at concentration of 25 mg/ml and 75 mg/ml. We used a positive control 25 ml albendazole (standard drug) at concentration of 15 mg/ml. Meanwhile, for negative control we used 25 ml distilled water. All plates were incubated in a room temperature for 48 h [24, 27, 28].

#### **Tissue preparation for histological alterations protocol**

Each roundworm procured from the petri dishes of each group were set for paraffin embedding and were dissected for histological sections through the middle portion of the body. This process was performed for each roundworm using sterile instruments for each dissection. The middle's segment were fixed in 10% buffered normal formalin. Fixed samples were dehydrated in the ascending concentrations of ethanol (50%, 60%, 70%, 80%, 96% (1), 96% (2) and 100%). The samples were cleared in xylol and were embedded in paraffin wax. The worms were sectioned transversally and were explored for any histopathological changes in their body surface under microscope as described by [9] with some modifications.

Three of each histological sections (3-5  $\mu$ m of thickness) were stained with haematoxylin and eosin (pH 0,1) (Sigma). After washing, sections were counterstained with eosin and mounted as described by [9, 10] with certain modifications. The histological alterations in the tissue of *F. gigantica* was investigated on each section under light microscopy (Olympus, Tokyo - Japan) using an eyepiece square graticule (eyepiece  $\times 10$ , objective  $\times 10$ ), and data expressed as abnormalities and photographed as described by previous authors [33, 34, 35, 36] with certain modification in determining any alterations in the tegument architecture of the *F. gigantica* adult worms.

#### **Results**

The fraction extract from dried of *A. conyzoides* L. betel nuts were brown greenish, semisolids with characteristic odor. The extract of *A. conyzoides* L. betel nuts contained

tannins, alkaloids, flavonoids, triterpenoids, saponins but no steroids. Our results showed that the *F. gigantica* adult worms maintained in normal saline solution had a normal body wall formed by an epitegument, tegument and muscle cells. We found that dramatic change in the form of disorganization and destruction of the epitegument and tegument of *F. gigantica* treated with albendazole. We described that morphological changes of tegument were observed in most of treated with *A. conyzoides* L. betel nuts extract groups. Comparatively the concentration of *A. conyzoides* L. betel nuts extract 25 ml/mg showed less effect on tegument than 75 mg/ml. On the concentration of *A. conyzoides* L. betel nuts extract 25 ml/mg we found the depletion epitegument along with tegument. Treatment of *F. gigantica* worms with *A. conyzoides* L. betel nuts extract 75 mg/ml resulted in dramatic changes in irregular shaped tegument with disruption as shown in Figure 1.

**Figure 1.** Photomicrograph of sections of *Ascaridia galli* adult worms. H&E 100X. A = Phosphate Buffered Saline (PBS): appearance of epitegument, tegument, and muscle layer, B = Albendazole 15 mg/ml: depletion epitegument along with tegument (thin arrow), damaged tegument and muscle layer arrowhead), C = Ethanolic extract of *A. conyzoides* L. betel nuts 25 mg/ml: depletion epitegument along with tegument (thin arrow), D = Ethanolic extract of betel nuts *A. conyzoides* L. 75 mg/ml: depletion epitegument along with tegument (thin arrow) and irregular shaped tegument with disruption (thick arrow). ec = epitegument, c = tegument, ml = muscle layer.

## Discussion

The results of the present study of the fraction extract from dried of *A. conyzoides* L. betel nuts reflect that there is no difference between our finding and previously study [26]. Tannins, saponins, alkaloids, and flavonoids of ethanolic extracts from *Anogeissus leiocarpus*, *Khaya senegalensis*, *Euphorbia hirta* and aqueous extracts from *Annona senegalensis* and *Parquetina nigrescens* according to [37] affected *in vitro* growth and survival of nematode parasite, *Caenorhabditis elegans* and filarial from cattle, *Onchocerca ochengi*. Indeed, tannin and flavonoid compounds extracted from unripe mango, *Mangifera indica* L., were able to inhibit the *in vitro* development of *Strongyloides stercoralis* larvae, the endemic intestinal nematode in human [19].

Our finding are a similar to those preliminary phytochemical screening observed by previously authours [27, 28]. However, the mechanisms of action of these extract was

not clearly understood. In the study of [1] analyzed the similarity component of *F. gigantica* body surface. According to some investigators who observed ultrastructurally the body wall of normal *F. gigantica* adult worm consists of longitudinal muscle layer, cyncytial hypodermis, tegument, and epitegument [32, 38]. In confirmation with our early study regarding somatic of *F. gigantica*, we found that the tegument contained material antigenic substances that recognized by immunoglobulin yolk antibody [9]. Previously, [39] shown that the cuticular surface consists of transversal striations along the body of parasite filariasis in human, *Wuchereria bancrofti*.

In the parasitology literature, it is well known that the nematodes tegument is play an important multi-functional role in perform protective and selective absorption function. Importantly, the tegument of nematode become a primary target site of anthelmintic drugs [40]. In this study, we agree with and support those of [41] who found that *F. gigantica* adult worms treated with albendazole experiencing destruction of tegument. A similar outcome was observed the effect anthelmintics showing transversal striations along the body in cuticular of *W. bancrofti* [39]. Previously, [42] explained that albendazole had effect on blockage of microtubules  $\beta$ -tubulin polymerization causes structural and functional damage in the parasite.

*In vitro* tests using free living stages of parasitic helminthes have been used to evaluate the anthelmintic activity of new plant compounds. [31] described that methanol extract of *Cassia occidentalis* and *Guiera senegalensis* were both positive for tannins, saponins, flavonoids, steroids and triterpenes. [29] explained that tannins, alkaloids, flavonoids, triterpenoids, saponins and steroids screened from *Saraca indica* extract displayed anthelmintic property in a dose-dependent manner against *Pheretima posthuma*. [24] found that the crude saponins prepared from *T. stocksianum* have cytotoxic and viability effect of the extract on different helminth species namely *F. gigantica* nematode, *Raillietina spiralis* cestode, and also *P. phostuma* earthworm annelida. The data presented here argue that the chemical compounds screened from *A. conyzoides* L. betel nuts extract are also possible involved in any alterations in the tegument architecture of the *F. gigantica*.

A characteristic surface morphology of worm alterations occur during exposure to medicinal ethnoveterinary plant extract. This hypothesis supported by many previously reports exist about anthelmintics activity of plant extract against helminthes. Alterations in the tegumental architecture of parasite *Raillietina echinobothrida*, the cestode of domestic fowl reported by [43] who investigated the effect of vermicial activity of the *Acacia oxyphylla* (Leguminosa) stem bark-derived. The typical apoptosis resulting in cellular destruction observed in parasite *R. echinobothrida* exposed to three plant extract: *Potentilla*

*fulgens*, *Alpinia nigra*, and *Millettia pachycarpa* [44]. [33] reported that the trematode liver fluke *Fasciola gigantica*, a common parasite of the hepatic and bile ducts of herbivore mammals, i.e., buffalo, cattle, sheep, and goats showed blebbing of morphological changes in the tegument layer and breakage of spines after *in vitro* treated with essential oils of *Cymbopogon nardus* (citronella) or *A. indica*.

In respect of our results, the finding are a similar to those observed by [38], so it seems the effect of the *A. oxyphylla* extract induced cuticular aberrations in the regular striations and damaged epitegument along with tegument in *F. gigantica* adult worms. The present findings are not different from those reported the effect of *Calendula micrantha* extract showing wrinkled surface with loss of striations along the body in cuticular of *F. gigantica* [1]. The effect of the active compound isolated from *A. oxyphylla* on the nematodes became disorganization of *F. gigantica* body surface [38]. In addition, the *in vitro* anthelmintic activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of *Mentha longifolia* against *F. gigantica* could be a potential alternative for treating cases of worms infections in chickens [6].

## Conclusion

It is concluded that the *in vitro* experiments clearly indicate that the *A. conyzoides* L. betel nuts extract contained tannins, alkaloids, flavonoids, triterpenoids, saponins caused cuticular surface damage of *F. gigantica* adult worms.

**Authors' Contributions:** It should be included in revised manuscript.

**Acknowledgements:** It should be included in revised manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Hassanain, M.A., Rahman, E.H.A. and Khalil, F.A.M. (2009) New scanning electron microscopy look of *Ascaridia galli* (Schrank 1788) adult Worm and its biological control. *Res. J. Parasitol.*, 1-11.
2. Begum, S., Mostofa, M., Alam, A.K.M.R., Tanjim, M., Ali, A.A.M., Islam, M.N. and Das, S. (2010) Prevalence of ascariasis and comparitave efficacy of pinapple

- 279 leaves extract with patent drug piperazine against ascariasis of poultry at five  
280 villages under mymensingh district. *Int. J. Bio. Res.*, 1(5): 41-44.
- 281 3. Saha, B.K., Abdullah-Al-Hasan, Md., Rahman, M.A., Hassan, Md.M., and Begum,  
282 N. (2015) Comparative efficacy of neem leaves extract and levamisole against  
283 ascariasis in chicken. *Int. J. Nat. Soc. Sci.*, 2: 43-48.
- 284 4. Kaufmann, F., Das, G., Sohnrey, B. and Gauly, M. (2011) Helminth infections in  
285 laying hens kept in organic free range systems in Germany. *Livest. Sci.*, 141, 182–  
286 187.
- 287 5. Abdelqader, A., Gauly, M., Wollny, C.B. and Abo-Shehdada, M.N. (2008)  
288 Prevalence and burden of gastro-intestinal helminths among local chickens in  
289 northern Jordan. *Prev. Vet. Med.*, 85: 17–22.
- 290 6. Ahmad, J., Tanveer, S. and Zargar, B.A. (2013) *In vitro* anthelmintic activity of  
291 *Mentha longifolia* (L.) leaves against *Ascaridia galli*. *Glob. Vet.* 11(1): 112-117.
- 292 7. Salam, S.T. 2015. Research article ascariasis in backyard chicken – prevalence,  
293 pathology and control. *Int. J. of Recent Sci. Res.*, 6(4):3361-3365.
- 294 8. Alrubaie, A.L. 2015. Effect of alcoholic extract of *Curcuma longa* on ascaridia  
295 infestation affecting chickens. *Indian J. Experiment. Biol.*, 53: 452-456.
- 296 9. Darmawi, Balqis, U., Hambal, M., Tiuria, R., Priosoeryanto, B.P. and  
297 Handharyani, E. (2012) The ability of immunoglobulin yolk recognized the antigen  
298 in the tissue of *Ascaridia galli*. *J. Med. Pet.*, 35(3): 190-195.
- 299 10. Darmawi, Balqis, U., Hambal, M., Tiuria, R., Frengki, and Priosoeryanto, B.P.  
300 (2013) Mucosal mast cell response in jejunum of *Ascaridia galli*-infected laying  
301 hens. *J. Med. Pet.*, 36(2): 113-119.
- 302 11. Das, G., Kaufmann, F., Abel, H., and Gauly, M. (2010) Effect of extra dietary  
303 lysine in *Ascaridia galli*-infected grower layers. *Vet. Parasitol.*, 170: 238–243.
- 304 12. Vercruysse, J., Albonico, M., Behnke, J.M., Kotze, A.C., Prichard, R.K.,  
305 McCarthy, J.S., Montresor, A. and Levecke, B. (2011) Is anthelmintic resistance a  
306 concern for the control of human soil-transmitted helminths?. *Int. J. Parasit.:  
307 Drugs and Drug Resist.*, 1: 14-27.
- 308 13. García, C.M.B., Sprenger, L.K., Ortiz, E.B. and Molento, M.B. (2016) First report  
309 of multiple anthelmintic resistance in nematodes of sheep in Colombia. *An Acad.  
310 Bras. Cienc.*, 1-5.
- 311 14. Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, F.M.N. and Afaq, M.  
312 (2006) Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci.*, 79: 2413–  
313 2431.

15. Saeed, M., Iqbal, Z. and Jabbar, A. (2007) Oxfendazole resistance in gastrointestinal nematodes of beetal goats at livestock farms of Punjab (Pakistan). *Acta Vet. Brno.*, 76: 79-85.
16. Condi, G.K., Soutello, R.G.V. and Amarante, A.F.T. (2009). Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.*, 161(3–4): 213-217.
17. Soutello, R.G.V., Seno, M.C.Z. and Amarante, A.F.T. (2007) Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 148(3–4): 360-364.
18. Demeler, J., Van Zeveren, A.M.J., Kleinschmidt, N., Vercruysse, J., Höglund, J., Koopmann, R., Cabaret, J., Claerebout, E., Areskog, M. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2009) Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Vet. Parasitol.*, 160(1–2): 109-115.
19. El-Sherbini, G.T., and Osman, S.M. (2013) Anthelmintic activity of unripe *Mangifera indica* L. (mango) against *Strongyloides stercoralis*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2(5): 401-409.
20. Hussain, A., Khan, M.N., Iqbal, Z., Sajid, M.S. and Khan, M.K. (2011) Anthelmintic Activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Vet. Parasitol.*, 179: 92–99.
21. Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Moraes, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S. and Navarro, A.M.C. (2008) Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, 154: 167–170.
22. Islam, K.R., Farjana, T., Begum, N. and Mondal, M.M.H. (2008) *In vitro* efficacy of some indigenous plants on the inhibition of development of eggs of *Ascaridia galli* (Digenia: Nematoda), *Bangladesh J. Vet. Med.*, 6(2): 159–167.
23. Khokon, J.U., Sharifuzzaman, Sarker, E.H., Rahman, M.A., Kisku, J.J. and Mustofa, M. (2014) Efficacy of neem leaf extract against ascariasis in indigenous chicken. *Int. J. Nat. Soc. Sci.*, 1: 25-30.
24. Ali, N., Shah, S.W.A., Shah, I., Ahmed, G., Ghias, M. and Khan, I. (2011) Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea Wilhelmsii* C. Koch and *Teucrium Stocksianum* boiss. *BMC Compl. Altern. Med.*, 11(106): 1-7.

25. Abdelqader, A., Qaralla, B., Al-Ramamneh, D. and Das, G. (2012) Anthelmintic effects of citrus peels ethanolic extracts against *Ascaridia galli*. *Vet. Parasitol.*, 188(2): 78-84.
26. Rodríguez-Leyes, E.A., Vicente-Murillo, R., González-Canavaciolo, V.L., Sierra-Pérez, R.C., Marrero-Delange, D. and Leiva-Sánchez, Á.T. (2013) Contenido de ácidos grasos en la fracción lipídica de frutos de tres Arecaceae cultivadas en Cuba. *Revista CENIC Ciencias Químicas.*, 44: 23-28.
27. Balqis, U., Darmawi, Maryam, Muslina, Hamzah, A., Daud, R., Hambal, M., Rinidar, Harris, A., Muttaqien, Azhar, and Eliawardani. (2016) Motility of *Ascaridia galli* adult worms *in vitro* in ethanolic extracts of nuts *Ageratum conyzoides* L.. *J. Agric.*, 16(1): 9-15.
28. Hamzah, A., Hambal, M., Balqis, U., Darmawi, Maryam, Rasmaidar, Athaillah, F., Muttaqien, Azhar, Ismail, Rastina, and Eliawardani. 2016. *In vitro* anthelmintic activity of *Ageratum conyzoides* L. nuts against *Ascaridia galli*. *Trad. Med. J.*, 21(2): 1-6.
29. Sarojini, N., Manjari, S.A. and Kanti, C.C. (2011) Phytochemical screening and anthelmintic activity study of *Saraca indica* leaves extracts. *Int. Res. J. Pharm.*, 2(5): 194-197.
30. Anthikat, R.R.N., Michael, A., Kinsalin, V.A. and Ignacimuthu, S. (2014) Antifungal activity of *Areca catechu* L. *Int. J. Pharmaceu. Clin. Sci.*, 4(1):1-3.
31. Suleiman, M.M., Mamman, M., Sidiama, A., Igboja, E.J., Tauheed, M. and Talba, A.M. (2014) Evaluation of anthelmintic activity of Nigerian ethnoveterinary plants; *Cassia occidentalis* and *Guiera senegalensis*. *Vet. World*, 7(7): 536-541.
32. Lalechhandama, K. (2010) On the Structure of *Ascaridia galli*, the roundworm of domestic fowl. *Sci. Vis.*, 10( 1): 20-30.
33. Jeyathilakan, N., Murali, K., Anandaraj, A., Latha, B.R. and Basith, S.A. (2010) Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. *Tamilnadu J. Vet. Anim. Sci.*, 6(5): 204-209.
34. Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Tansatit, T., Kanwanrangsang, N. and Pipatshukiat, S. 2005. *Eurytrema pancreaticum*: the *in vitro* effect of praziquantel and triclabendazole on the adult fluke. *Exp. Parasitol.*, 111: 172-177.
35. Li, E., Zhou, P., Petrin, Z. and Singer, S.M. (2004) Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *IAI*, 72(11): 6642–6649. doi: 10.1128/IAI.72.11.6642–6649.2004 [22-05-2013].



36. Königová, A., Hrkova, G., Velebný, S., Corba, J. and Várady, M. (2008). Experimental infection of *Haemonchus contortus* strains resistant and susceptible to benzimidazoles and the effect on mast cells distribution in the stomach of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Parasitol. Res.*, 102: 587–595. doi 10.1007/s00436-007-0792-4 [28-05-2013].
37. Ndjonka, D., Agyare, C., Lüersen, K., Djafsia, B., Achukwi, D., Nukenine, E.N., Hensel, A. and Liebau, E. (2011) *In vitro* activity of Cameroonian and Ghanaian medicinal plants on parasitic (*Onchocerca ochengi*) and free-living (*Caenorhabditis elegans*) nematodes. *J. Helminth.*, 85: 304–312
38. Roy, B., Dasgupta, S., Manivel, V., Parameswaran, P.S. and Giri, B.R. (2012) Surface topographical and ultrastructural alterations of *Raillietina echinobothrida* and *Ascaridia galli* induced by a compound isolated from *Acacia oxyphylla*. *Vet. Parasitol.*, 185: 322-326.
39. Oliveira-Menezes, A., Lins, R., Norões, J., Dreyer, G. and Lanfredi, R.M. (2007) Comparative analysis of a chemotherapy effect on the cuticular surface of *Wuchereria bancrofti* adult worms *in vivo*. *Parasitol. Res.*, 101: 1311–1317.
40. Alvarez, L.I, Mottier, M.L. and Lanusse, C.E. (2007) Drug transfer into target helminths parasites. *Trends Parasitol.*, 23: 97–104.
41. Lalchhandama, K., Roy, B. and Dutta, B.K. (2009) Anthelmintic activity of *Acacia oxyphylla* stem bark against *Ascaridia galli*. *Pharmaceut. Biol.*, 47(7): 578-583.
42. Robinson, M.W., Mc Ferran, N., Trudgent, A., Hoey, L. and Fairweather, I. (2004) A possible model of benzimidazole binding to  $\beta$ -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model.*, 23:275–284.
43. Dasgupta, S., B. Roy, and Tandon, V. (2010) Ultrastructural alterations of the tegument of *Raillietina echinobothrida* treated with the stem bark of *Acacia oxyphylla* (Leguminosae). *J. Ethnopharmacol.*, 127: 568–571.
44. Giri, B.R., Roy, B. and Babu, S.P.S. (2013) Evidence of apoptosis in *Raillietina echinobothrida* induced by methanolic extracts of three traditional medicinal plants of Northeast India. *Exp. Parasitol.*, 134: 466-473.

**PERSONALIA TENGA PENELITI DAN KUALIFIKASI DALAM  
PENELITIAN PROFESOR TAHUN 2021**

<b>Nama Personil/Laboratorium</b>	<b>Bidang Keahlian</b>	<b>Tugas dalam Kegiatan</b>
Prof. Dr. drh. Ummu Balqis, M.Si Laboratorium Patologi FKH USK	Patologi	Penanggung Jawab Penelitian  Mengkoordinir semua kegiatan penelitian fokus pengamatan patologi dan menyiapkan artikel pada jurnal internasional
drh. Cut Dahlia Iskandar, M.Sc., Ph.D Laboratorium Histologi	Histologi	Anggota penelitian yang bertugas membantu peneliti utama pada semua kegiatan penelitian ini, menyusun formula konsentrasi ekstrak daun herbal bandotan dan pewarnaan histologi.
drh. Lian Varis Riandi, M.Si Laboratorium Parasit	Parasitologi	Bertugas sebagai tenaga ahli dalam melakukan uji hambat cacing <i>F. gigantica</i> terhadap ekstrak daun bandotan di lapangan sesuai dengan konsentrasi yang sudah di susun
drh. Masda Admi, M.Si Laboratorium Mikrobiologi	Mikrobiologi	Bertugas sebagai tenaga ahli dalam melakukan uji hambat cacing <i>F. gigantica</i> terhadap ekstrak daun bandotan di lapangan berdasarkan konsentrasi ekstrak yang sudah disusun.
drh. Denny Irmawati Hasan, M.Si Laboratorium Patologi	Patologi	Bertugas sebagai tenaga laboratorium dalam melakukan pewarnaan dan pemeriksaan histopatologi terhadap cacing <i>F. gigantica</i> yang sudah diberikan perlakuan.

## FOTO DAN AKTIFITAS PENELITIAN



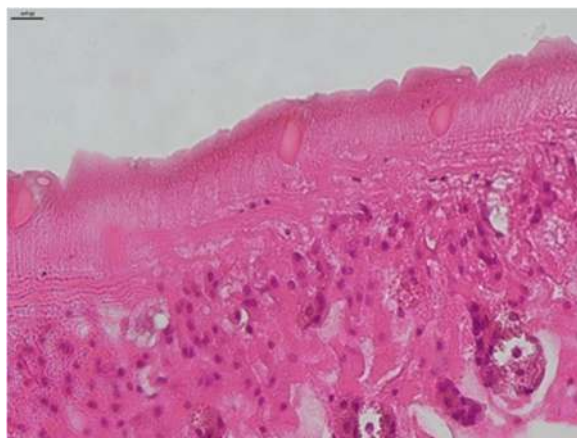
Ekstrak daun *A. conyzoides* dan pengiriman sampel untuk analisis fitokimia



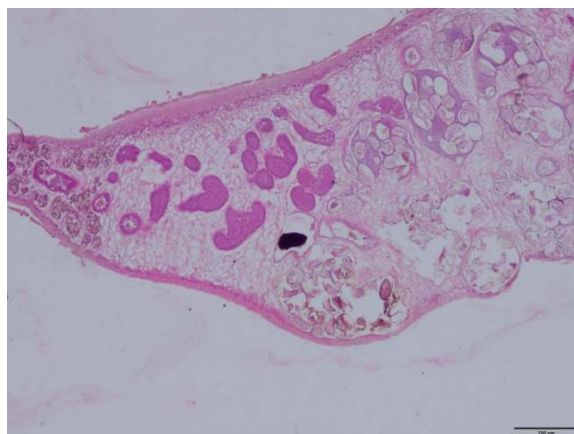
Proses penyusunan konsentrasi ekstrak daun *A. conyzoides*



Preparat untuk pewarnaan histopatologi



Pewarnaan tegumen cacing *Fasciola gigantica*



Pewarnaan alat kelamin cacing *Fasciola gigantica*