

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengumpulan Bahan Percobaan dan Determinasi

Bahan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji dan buah kabocha. Pengumpulan biji dan buah kabocha didapatkan dari perkebunan di daerah Cibedug, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat. Kemudian dilakukan proses determinasi tanaman uji di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

4.2. Pengumpulan Hewan Percobaan dan Determinasi

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ascaris suum*. Pengumpulan *Ascaris suum* didapatkan dari tempat pemotongan hewan di daerah Ciroyom, Bandung. Kemudian dilakukan proses determinasi hewan uji di Museum Zoologi Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

4.3. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia biji, buah, dan kombinasi biji-buah kabocha dilakukan dengan cara mengambil buah kabocha yang cukup matang, terlihat dari warnanya yang jingga cerah. Selanjutnya dilakukan sortasi basah, biji dan buah kabocha dipisahkan satu sama lain agar tidak menempel, lalu dibersihkan dari semua pengotor dengan menggunakan air yang mengalir. Setelah itu dilakukan penggilingan, masing-masing buah dan biji yang sudah terpisah dari semua

pengotor dirajang hingga terbentuk ukuran yang lebih kecil. Kemudian dilakukan pengeringan, setelah kering dilakukan sortasi kering, simplisia dipisahkan lagi dari pengotor yang mungkin tidak hilang pada saat pembersihan.

4.4. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol biji, buah, dan kombinasi biji-buah kabocha dilakukan dengan cara melakukan ekstraksi pada simplisia-simplisia yang sudah didapatkan. Masing-masing buah dan biji yang sudah halus tersebut dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Dilakukan proses remaserasi yaitu pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000:11).

Setelah diperoleh ekstrak etanol biji kabocha dan ekstrak etanol buah kabocha, kemudian ekstrak tersebut dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* dan diuapkan di atas penangas air agar didapatkan ekstrak yang kental. Rendemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat. Masing-masing dari ekstrak kental tersebut dibuat larutan dengan beberapa konsentrasi, yaitu 2,5%, 5%, dan 10%. Untuk kombinasi ekstrak etanol biji-buah kabocha dibuat dari kombinasi ekstrak-ekstrak tersebut dengan konsentrasi yang serupa.

$$\text{Rendemen (\% b/b)} = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

A: Jumlah ekstrak yang didapat

B: Jumlah awal tanaman (gram)

4.5. Penetapan Karakteristik Awal Simplisia dan Ekstrak

Untuk mengetahui karakteristik awal dari simplisia dan ekstrak etanol biji, buah, dan kombinasi biji buah kabocha terdapat dua parameter, yaitu parameter non spesifik dan parameter spesifik.

4.5.1. Penapisan fitokimia

a. Penentuan alkaloid

Sebanyak 2-4 gram simplisia/ekstrak dimasukkan ke dalam mortar, tambahkan dengan kloroform lalu digerus. Kemudian ditambahkan amoniak, digerus dengan kuat, lalu disaring dan diambil filtratnya (larutan A). Sebagian larutan A diteteskan pada kertas saring, lalu ditambahkan pereaksi Dragendorff. Warna merah atau jingga yang timbul menunjukkan adanya alkaloid. Sisa larutan A diekstraksi dengan HCL 2N, lalu lapisan air atau fraksi asamnya (larutan B) dipisahkan. Larutan B dibagi menjadi 2 bagian, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pada tabung pertama diteteskan pereaksi Dragendorff, hasilnya positif apabila terbentuk endapan merah bata. Pada tabung kedua diteteskan pereaksi Mayer, hasilnya positif apabila terbentuk endapan putih (Farnsworth, 1966:245-253).

b. Penentuan flavonoid

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 15 menit kemudian disaring. Filtrat (larutan C) akan digunakan pula untuk penentuan senyawa polifenolat, saponin, tanin, dan kuinon. Sebanyak 5 ml larutan C ditambahkan serbuk magnesium, 1 mL HCL pekat, dan amil alkohol, kocok dengan kuat hingga terjadi pemisahan. Hasil positif ditunjukkan

dengan terbentuknya warna jingga-merah, merah-krimson, krimson-magenta, dan hijau atau biru dalam waktu 1-2 menit (Farnsworth, 1966:262-263).

c. Penentuan saponin

Sebanyak 5 mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok selama 10 detik secara vertikal. Terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang bertahan selama 10 menit dan busa tidak hilang setelah penambahan HCL 2N maka ekstrak menunjukkan positif saponin (Farnsworth, 1966:258-259) (Depkes RI, 1989:552).

d. Penentuan kuinon

Sebanyak 5 mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan larutan NaOH 1 N. Terbentuknya warna kuning hingga merah menunjukkan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

e. Penentuan tanin

Sebanyak 15 mL larutan C dibagi menjadi dua bagian, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pada tabung pertama ditetesi pereaksi FeCl_3 . Hasil menunjukkan positif tanin apabila terbentuk warna biru, biru-kehitaman, hijau atau biru-kehijauan. Pada tabung kedua ditambahkan dengan gelatin 1%, hasil menunjukkan positif tanin apabila terbentuk endapan (Farnsworth, 1966:264).

f. Penentuan polifenolat

Sebanyak 15 mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Filtrat ditetesi dengan pereaksi besi (III) klorida. Hasil menunjukkan positif fenolat apabila terbentuk warna biru, biru-kehitaman, hijau atau biru-kehijauan dan positif polifenolat apabila terbentuk endapan coklat (Farnsworth, 1966:264).

g. Penentuan monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat diuapkan sampai kering kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terbentuknya warna-warna menunjukkan positif monoterpen dan seskuiterpen (Depkes RI, 1977:132).

h. Penentuan steroid dan triterpenoid

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat diuapkan sampai kering kemudian ditetaskan pereaksi Liebermann Burchard. Terbentuknya warna biru, biru-hijau, menunjukkan positif steroid, sedangkan apabila terbentuknya warna merah, pink, atau ungu menunjukkan positif triterpenoid (Farnsworth, 1966:258-259).

4.5.2. Penentuan kadar senyawa larut air

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap simplisia awal (Depkes RI, 2000:31).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{100}{20} \times \frac{\text{berat sari larut air (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (3)$$

4.5.3. Penentuan kadar senyawa larut etanol

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (96%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, kemudian uapkan 20 mL filtrat hingga kering

dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (96%), dihitung terhadap simplisia awal (Depkes RI, 2000:31-32).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{100}{20} \times \frac{\text{berat sari larut etanol (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (4)$$

4.5.4. Penentuan kadar air

Penentuan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode Azeotrop. Tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air, kemudian dikeringkan didalam oven. Dimasukkan 200 mL toluen yang telah dijenuhkan dengan akuades, masukkan sejumlah simplisia yang diperkirakan mengandung air 2-3 mL ke dalam labu bundar. Lalu dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahkan serpihan batu didih). Setelah mendidih, suling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling, naikan kecepatan penyulingan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bilas bagian kondensor dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit, kemudian hentikan pemanasan. Dinginkan tabung penerima sampai suhu kamar, hilangkan tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima. Biarkan air dan toluen dalam tabung penerima memisah. Baca volume air dalam tabung penerima (Depkes RI, 2000: 31).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{skala air (ml)}}{\text{bobot awal simplisia (gr)}} \times 100\% \quad (2)$$

4.6. Penyiapan *Ascaris suum* Dewasa

Ascaris suum dewasa yang diperoleh dari tempat pemotongan hewan dibersihkan lalu dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan NaCl 0,9% b/v. Sampai di laboratorium, cacing-cacing yang masih menunjukkan gerakan aktif

dimasukkan ke dalam wadah berisi larutan Hank salin, kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C sampai saat akan digunakan. Cacing yang digunakan dalam penelitian adalah cacing yang disimpan tidak lebih dari 24 jam setelah pengambilan dari usus babi dan telah diinkubasikan di dalam larutan Hank salin (Moerfiah, *et.al.*, 2012:14).

4.7. Penyiapan Telur *Ascaris suum*

Beberapa ekor cacing jantan dan cacing betina dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan Hank salin, kemudian disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Selama periode inkubasi akan diperoleh endapan putih pada dasar gelas kimia yang menunjukkan adanya telur. Cacing-cacing tersebut dipisahkan dari suspensi telur dengan menggunakan pinset dan telur cacing diambil dengan menggunakan pipet.

4.8. Penyiapan Sediaan Kontrol

Sediaan yang digunakan sebagai kontrol pada penelitian ini adalah larutan Hank salin. Pembuatan larutan Hank salin dilakukan dengan cara membuat terlebih dahulu beberapa larutan stok, larutan premix, hingga akhirnya diperoleh larutan akhir (larutan Hank salin) dengan komposisi sebagaimana tercantum pada **Lampiran 9: Tabel 1**. Sedangkan bagan alir pembuatan larutan Hank salin dapat dilihat pada **Lampiran 9: Gambar 1**.

4.9. Penyiapan Sediaan Perbandingan

Sediaan yang digunakan sebagai perbandingan pada penelitian ini adalah piperazin sitrat, pirantel pamoat, dan albendazol. Pertama-tama dilakukan orientasi dosis perbandingan terlebih dahulu agar diketahui konsentrasi minimal obat yang menyebabkan paralisis pada cacing, sehingga cacing tidak mati sebelum efek paralisis terlihat. Orientasi dosis perbandingan dilakukan dengan cara mengencerkan perbandingan secara bertingkat, perbandingan disuspensikan dengan CMC Na. Kemudian cacing dewasa dimasukkan ke dalam masing-masing larutan perbandingan tersebut. Parameter yang diamati sampai cacing menunjukkan efek paralisis dan kematian pada 1 jam pertama.

4.10. Uji Aktivitas Antelmintik Ekstrak Etanol Biji, Buah, dan Kombinasi Biji-Buah Kabocha Terhadap *Ascaris suum* Dewasa

Cacing-cacing aktif yang telah diinkubasi dalam larutan Hank salin pada suhu 37°C dimasukkan ke dalam gelas kimia 500ml yang terdiri dari 3 kelompok pengujian, yaitu kelompok uji yang berisi ekstrak etanol biji kabocha, ekstrak etanol buah kabocha, dan ekstrak etanol kombinasi biji-buah kabocha dengan masing-masing memiliki konsentrasi 2,5%; 5%; dan 10% b/v, lalu kelompok kontrol yang berisi larutan Hank salin, serta kelompok perbandingan yang berisi piperazin sitrat dan pirantel pamoat. Pada masing-masing kelompok terdiri dari 2 ekor cacing, 1 cacing jantan dan 1 cacing betina. Kemudian gelas kimia tersebut dimasukkan ke dalam *shake incubator* untuk diinkubasi pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan interval waktu 15 menit selama 3 jam. Pengamatan yang dilakukan adalah melihat efek yang terjadi pada cacing setelah diinkubasi,

apakah masih normal, paralisis, atau mati. Untuk melihat apakah cacing mati, paralisis atau masih normal setelah diinkubasi, cacing-cacing tersebut diusik dengan batang pengaduk. Jika cacing bergerak, berarti cacing masih normal. Namun jika cacing diam, dipindahkan ke dalam air hangat suhu 50°C. Apabila dengan cara ini cacing masih diam, berarti cacing sudah mati, tetapi jika bergerak maka cacing hanya mengalami paralisis (Suryawati, 1993:8). Paralisis terdiri dari dua tipe yang dibedakan berdasarkan tipe lengkung tubuh, yaitu paralisis spastik dan paralisis flasid. Jika tubuh cacing kaku atau membentuk huruf C maka cacing tersebut mengalami paralisis spastik, sedangkan jika tubuh cacing lemah atau membentuk huruf S maka cacing tersebut mengalami paralisis flasid. Kemudian hasil pengamatan dicatat dalam bentuk tabel dengan menyatakan Normal (N), Paralisis spastik (Ps), Paralisis flasid (Pf), dan Mati (M).

4.11. Uji Aktivitas Antelmintik Ekstrak Etanol Biji, Buah, dan Kombinasi Biji-Buah Kabocha Terhadap Telur *Ascaris suum*

Ekstrak etanol biji, buah, dan kombinasi biji-buah kabocha yang merupakan kelompok uji dilarutkan dengan CMC Na dan dibuat tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 2,5%; 5%; dan 10% b/v. Dari ketiga konsentrasi tersebut diambil 1 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL suspensi telur cacing pada tabung tersebut, lalu dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 hari. Pada kelompok kontrol digunakan larutan Hank salin dan pada kelompok pembanding digunakan suspensi albendazol. Pengamatan dilakukan dengan cara mengambil telur cacing yang telah diinkubasi dengan menggunakan pipet kemudian diamati dibawah

mikroskop. Pengamatan yang dilakukan adalah melihat apakah telur cacing tersebut infertil atau fertil. Telur yang fertil atau telah dibuahi akan terdapat sel embrio (sel telur) di dalamnya, sedangkan telur yang infertil akan tampak kosong di dalamnya. Perhitungan jumlah telur dapat dilihat di bawah mikroskop dengan cara pengenceran sebanyak 20 kali kemudian diteteskan pada hemositometer. Telur cacing yang dihitung adalah yang terdapat pada 4 kotak besar pada sudut hemositometer dikalikan dengan faktor perhitungan yang digunakan yaitu 50 (Mitruka, *et.al.*, 1977:51).

$$\text{Jumlah telur} = \text{jumlah telur cacing dalam 4 bidang besar} \times 50 \quad (5)$$

Pada akhir inkubasi telur yang berkembang menjadi telur berembrio dihitung dan dibandingkan terhadap kontrol. Persen inhibisi perkembangan telur menjadi telur berembrio akibat pemberian ekstrak uji dihitung dengan persamaan persen inhibisi (Fatasyya, 2012:29).

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\Sigma \text{ telur berembrio kontrol} - \Sigma \text{ telur berembrio uji}}{\Sigma \text{ telur berembrio kontrol}} \times 100\% \quad (6)$$