

# Aktivitas Ovisidal, Larvasidal dan Vermisidal Ekstrak Herbal terhadap Nematoda *Haemonchus contortus* secara *in-vitro*

(OVICIDAL, LARVICIDAL AND VERMICIDAL ACTIVITY OF HERBAL  
EXTRACTS AGAINST HAEMONCHUS CONTORTUS NEMATODES IN-VITRO)

Ekawasti Fitrine<sup>1</sup>, Dewi DA<sup>2</sup>, Suhardono<sup>1</sup>, Sawitri DH<sup>1</sup>,  
Martindah E<sup>1</sup>, Wardhana AH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner,  
Jl. R.E. Martadinata No. 30 Kota Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16124  
<sup>2</sup>Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta-Magelang  
Jl. Magelang-Kopeng, Purwosari, Tegalrejo,  
Magelang, Jawa Tengah, Indonesia 56192  
Email: [fitrineekawasti@gmail.com](mailto:fitrineekawasti@gmail.com)

## ABSTRACT

Hemonchosis is caused by the nematode of *Haemonchus contortus* which can cause high economic losses. The most common treatment for helminthiasis is by broad spectrum chemical anthelmintics, but if used continuously for a long time can cause resistance and residue to livestock products which pose a serious threat to livestock production. This study aims to detect herbal plants that can be used as effective and efficient antelmintik. Bitter melon seeds (*Momordica charantia L.*), white ginger (*Curcuma zedoaria Rosce*), noni fruit (*Morinda citrifolia*), avocado seeds (*Persea americana mill*), areca nut (*Areca catechu*), were extracted and tested for phytochemistry at the Spice and Drug Research Institute (Balitro). The results showed that sequentially of avocado seeds, momordica seeds have potential as antelmintik in ruminants were effective and efficient 2.5%, 5% dan 7.5% ( $p < 0,05$ ) by ovisidal, larvasidal, vermisidal.

Keywords: *Haemonchus contortus*, herbs, nematodes, antelmintik, digestive tract

## ABSTRAK

Hemonchosis disebabkan oleh cacing nematoda *Haemonchus contortus* dan dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi. Penanganan dan pengendalian kecacingan yang paling umum dilakukan adalah dengan pemberian antelmintika kimia berspektrum luas, tetapi jika digunakan secara terus menerus dalam waktu yang lama dapat mengakibatkan resistensi dan residu terhadap produk ternak yang menjadi ancaman serius bagi produksi ternak. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi apakah tanaman herbal biji pare (*Momordica charantia L.*), temu putih (*Curcuma zedoaria Rosce*), buah mengkudu (*Morinda citrifolia*), biji alpukat (*Persea americana mill*), buah pinang (*Areca catechu*) dapat digunakan sebagai obat cacing nematoda yang efektif dan efisien. Tanaman herbal diekstrak dan diuji secara fitokimia di Balai Penelitian Rempah dan Obat (Balitro). Ekstrak biji pare dan biji alpukat dalam DMSO 1% dengan konsentrasi 2.5%, 5% dan 7.5% memiliki aktivitas antelmintik ovisidal, larvasidal dan vermisidal.

Kata kunci : *Haemonchus contortus*, herbal, nematoda, obat cacing, saluran pencernaan.

## PENDAHULUAN

Infeksi parasit oleh *Haemonchus contortus* umumnya merupakan masalah kesehatan pada ternak dengan prevalensi tinggi di dunia yang menyebabkan penurunan produksi secara nyata

dan merupakan kasus yang sering terjadi di Indonesia (Beriajaya 2005). Penyakit ini disebabkan oleh cacing gilik/kelas Nematoda (Jabbar *et al.*, 2013). Walaupun nematodosis tidak langsung menyebabkan kematian, namun secara ekonomi dapat menimbulkan kerugian

yang sangat besar. Oleh karena itu penyakit ini sering disebut sebagai penyakit ekonomi. Kerugian akibat infeksi cacing sulit diperkirakan, biasanya berupa kematian pada derajat infeksi tinggi terutama pada ternak muda, rendahnya produksi susu, keterlambatan pertumbuhan, rendahnya penambahan bobot badan dan penurunan daya tahan tubuh akibat anemia yang ditimbulkan, serta penurunan kekuatan tenaga kerja ternak (Siregar 2013). Populasi ternak sapi di Indonesia cukup besar dan kerugian yang ditimbulkan akan terus meningkat bila masalah nematodosis tidak dikendalikan (Papadopoulos *et al.*, 2012).

Program pencegahan dan pengendalian nematodiasis pada ternak umumnya dilakukan melalui penggunaan obat cacing (*anthelmintik*) spektrum luas seperti kelompok benzimidazole (BZ), levamisole (LEV) atau ivermectin (IVM). Penggunaan antelmintik saat ini banyak dilaporkan meningkatkan kejadian resistansi cacing nematoda terhadap antelmintik di beberapa negara (Papadopoulos *et al.*, 2012; Nabukenya *et al.*, 2014) termasuk Indonesia (Haryuningtyas *et al.*, 2001). Meningkatnya kejadian resistansi obat cacing nematoda gastrointestinal dan timbulnya residu obat dalam tubuh hewan dapat menjadi ancaman yang serius bagi produksi ternak (Kumara *et al.*, 2010). Tingginya persentase larva *H. contortus* dibandingkan dengan larva cacing lain dapat membahayakan produktivitas ternak sehingga perlu strategi pengendalian yang tepat terhadap hemonchosis (Dewi *et al.*, 2017)

Salah satu alternatif penanggulangan terhadap hemonchosis ialah dengan pengembangan bahan obat dari alam. Saat ini sudah banyak ditemukan khasiat farmasetik dari berbagai tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk penanganan masalah kesehatan ternak khususnya kecacingan yang disebabkan oleh *H. contortus* (Ardana *et al.*, 2012). Berdasarkan beberapa laporan, bahan obat dari alam tersebut banyak terdapat di lingkungan masyarakat sehingga mudah diperoleh, serta dapat digunakan sebagai antelmintik, di antaranya biji pare (*Momordica charantia* L.), temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosce), buah mengkudu yang sudah matang (*Morinda citrifolia*), biji alpukat (*Persea americana* mill), dan buah pinang (*Areca catechu*). Lima tanaman obat alami tersebut dipilih berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ekawasti *et al.* (2019) mengenai

uji tapis/skrining terhadap efektivitas ekstrak tanaman herbal yang berpotensi sebagai antelmintik yang efektif dan efisien pada ruminansia.

Biji pare, temu putih, buah mengkudu, biji alpukat, dan buah pinang memiliki sifat antelmintik *in vitro* maupun *in vivo* pada kambing dan domba (Athanasiadou *et al.*, 2001). Biji pare yang mengandung senyawa *saponin*, *tanin*, *flavonoid* dan *triterpene glycoside* memiliki daya antihelmintik terhadap cacing nematoda yang mampu menyebabkan cacing paralisis kemudian mati (Mills dan Bone, 2000; Tjokropranoto *et al.*, 2011). Ekstrak rimpang temu putih mengandung tanin, saponin, curcumin flavonoid, sulfur, gum, resin, tepung, dan minyak atsiri (monoterpen dan siskuiterpene) berperan sebagai antelmintik terhadap cacing dewasa yang berpotensi menurunkan jumlah telur cacing dan dapat menyebabkan paralisis otot cacing (Setiawan, 2008). Mengkudu mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, dan antraknon yang mempunyai aktivitas antelmintik (Wulandari, 2011).

Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman herbal berpotensi sebagai antelmintik, dan tahan terhadap derajat keasaman (pH) di dalam lambung ruminansia (antara 6,0 sampai 6,8) sehingga aman dan dapat dimanfaatkan sebagai alternatif antelmintik pada ruminansia (Blakely dan Bade, 1991). Menurut Ahmad (2014) pemberian obat alami yang mengandung antelmintik dapat menurunkan derajat infeksi kecacingan dan lebih murah dari harga obat komersil di pasaran. Beberapa mekanisme kerja antelmintik dalam memberantas cacing adalah membunuh larva (*larvasidal*), cacing dewasa (*vermisidal*), serta dapat menghambat perkembangan telur cacing (*ovisidal*) (Ardana *et al.*, 2012; Ekawasti *et al.*, 2019). Oleh karenanya perlu dilakukan penelitian terhadap lima ~~terhadap lima~~ jenis tanaman herbal yang paling efektif dan efisien yang dapat digunakan sebagai antelmintik, baik sebagai *ovisidal*, *larvasidal* maupun *vermisidal* dengan memutus siklus hidup atau sebagai pengobatan terhadap infeksi cacing nematoda pada ternak ruminansia. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi apakah tanaman herbal biji pare, temu putih, buah mengkudu, biji alpukat, dan buah pinang dapat digunakan sebagai obat cacing nematoda yang efektif dan efisien

## METODE PENELITIAN

### Komite Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Komite Etik Balai Besar Penelitian Veteriner tahun 2017 (Balitbangtan/BB Litvet/Rm\_NRm/07.01/2017).

### Hewan Donor

Hewan donor yang digunakan adalah domba lokal jantan sebanyak 10 ekor, berumur sekitar delapan bulan dengan bobot badan sekitar 13-15 kg. Domba dipelihara secara intensif di dalam kandang yang kebersihannya dijaga. Pakan hewan yang diberikan berupa konsentrat, dan pemberian air minum dilakukan secara *ad libitum*.

Domba berada dalam kondisi klinis sehat dan dibebaskan dari infeksi cacing nematoda intestinal menggunakan obat cacing (anthelmintic) albendazol, kemudian domba diinfeksi dengan larva nematoda *H. contortus*.

### Infestasi Larva Cacing pada Hewan Donor

Larva cacing nematoda (*H. contortus*) diperoleh dari hasil kultur sampel feses lapang yang dikoleksi dari domba di Puslitbangnak, Bogor. Larva diinfeksi ke hewan donor agar dapat memproduksi jumlah telur nematoda dan cacing dewasa *H. contortus* sesuai kebutuhan.

Metode infeksi larva dilakukan dengan cara mencekok domba-domba donor dengan larva *H. contortus* secara berulang dengan interval 10 hari dengan dosis bertingkat sebanyak 5000, 10.000, dan 15.000 larva. Pemeriksaan dengan penghitungan *egg per gram* (EPG) tinja dilakukan pada minggu ke-3 hingga 4 pascainfeksi (PI). Infeksi ulang dihentikan apabila hasil penghitungan EPG sudah mencukupi kebutuhan untuk penelitian pada uji *in vitro*.

### Sampel Feses

Pengambilan feses domba donor dari anus diambil secara *pool* (digabung dari tiga ekor domba). Sampel feses yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam kantong plastik diikat kedap udara dan diberi label kemudian dimasukkan ke dalam termos es pada suhu 4 °C dan dibawa ke laboratorium.

### Purifikasi Telur dari Sampel Feses

Penghitungan jumlah telur cacing per gram feses dengan metode Whitlock (Whitlock 1948; Ekawasti *et al.*, 2019). Bila jumlah telur cacing cukup banyak (EPG di atas 100) maka

dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan saringan ukuran 250 dan 180 µm. Untuk memisahkan telur dari kotoran digunakan gradien gula dengan konsentrasi 10% (kuning), 25% (biru) dan 40% (merah muda) kemudian disentrifus pada 2500 G selama 10 menit. Setelah disentrifus, telur nematoda berada di antara lapisan kuning dan biru. Dengan menggunakan pipet pasteur telur dikoleksi dan ditempatkan pada saringan 25 µm. Telur dibersihkan dari larutan gula dan dikoleksi dalam tabung sentrifus 15 mL.

### Kultur Larva Cacing Nematoda

Sampel positif yang mengandung telur nematoda disiapkan untuk membuat pupukan telur cacing (kultur larva). Kultur larva dilakukan untuk mendapatkan larva tahap ke-3 atau L<sub>3</sub> dalam jumlah banyak. Media kultur larva terbuat dari campuran feses (5 g) dan media *vermiculite* (media tanam pengeraman telur) berupa mineral filosilikat hidro yang steril dan mampu menyerap air dalam jumlah banyak dengan cepat serta mudah dikeringkan secara cepat. Komposisi media kultur dicampur dengan perbandingan 1:1 diberi air secukupnya agar lembap tetapi tidak basah kemudian disimpan pada suhu kamar dan tidak kena sinar matahari langsung selama 7-9 hari.

Larva cacing hasil kultur diidentifikasi secara mikroskopik berdasarkan pedoman Manual MAFF (Lambertz *et al.*, 2018) dan dapat disimpan dalam lemari pendingin (4°C).

### Preparasi Cacing *H. contortus*

Cacing dewasa *H. contortus* diperoleh dengan cara mengorbankan nyawa domba-domba dengan cara menyembelih domba donor pada minggu kedelapan setelah diperoleh EPG yang mencukupi sesuai kebutuhan untuk mendapatkan cacing *H. contortus*. Bagian abomasum disayat pada sisi *curvatura mayor*, kemudian dicuci menggunakan air dan disaring dengan saringan 350 mikro dan 250 mikro selanjutnya hasil saringan (*filtrate*) ditampung dalam nampan. Cacing dikoleksi dengan menggunakan pinset/sonde untuk mempermudah dalam mengambil cacing yang terlihat. Cacing *H. contortus* yang diperoleh dikumpulkan dalam cawan yang berisi larutan NaCl fisiologis dan segera digunakan untuk uji.

### Ekstrak Tanaman Herbal

Bahan obat diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut ethanol 96%

bertujuan untuk menghindari rusaknya komponen senyawa akibat panas. Ekstrak biji pare (*M. charantia L.*), temu putih (*C. zedoaria Rosce*), buah mengkudu (*M. citrifolia*) yang sudah matang, biji alpukat (*P. americana Mill.*), dan buah pinang kuning (*A. catechu*) diperoleh dan diekstraksi di Balai Penelitian Rempah dan Obat (Balittro) Bogor. Tanaman herbal dikeringkan pada oven dengan suhu 40°C selama tiga hari. Selanjutnya dibuat serbuk hingga halus kemudian diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil ekstraksi disaring dengan kertas Whatman 42 untuk memisahkan antara filtrat dan residunya. Filtrat selanjutnya dievaporasi untuk memperoleh ekstrak etanol.

#### Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan tujuan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder. Golongan metabolit sekunder yang diuji secara kualitatif yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, dan tannin, sedangkan golongan metabolit sekunder yang diuji secara kuantitatif hanya dilakukan terhadap senyawa, flavonoid dan saponin menggunakan spektrofotometri, serta tanin menggunakan TLC Scanner. Uji fitokimia dilakukan terhadap adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, antrakuinon, steroid/triterpenoid, saponin dan tanin dilakukan terhadap setiap sampel ekstrak tanaman herbal menggunakan metode yang sudah baku (Ridwan dan Ayunita, 2007; Lailatul *et al.*, 2010; Ekawasti *et al.*, 2020).

#### Uji Aktivitas Antelmintik

**Uji aktivitas ovisidal terhadap telur cacing secara *in vitro*.** Telur cacing nematoda hasil purifikasi dimasukkan ke dalam setiap cawan petri berdiameter/d 5 cm diisi sekitar 200 larva yang telah berisi ekstrak etanol 96% kelima tanaman herbal masing-masing dengan konsentrasi 2,5%, 5,0%, dan 7,5% yang dilarutkan dalam dimetil sulfoksida/DMSO 1%. Kontrol negatif adalah DMSO 1% yang digunakan sebagai media pelarut yang baik terhadap telur nematoda (Ekawasti *et al.*, 2017) dan kontrol positif menggunakan antelmintik yang sering dipakai di lapangan yakni albendazole 0,025 mg/ml. Setiap cawan petri diisi sekitar 200 telur cacing nematoda dalam larutan ekstrak herbal dan DMSO 1%, kemudian setelah 2, 4, dan 6 jam dilakukan pencucian telur cacing terhadap ekstrak

tanaman herbal dan kemudian telur cacing diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dan penghitungan dilakukan terhadap daya tetas telur dan telur menetas tapi larva mati. Pengujian ini dilakukan dengan tiga kali ulangan.

**Uji Aktivitas Larvasidal Terhadap Larva Cacing Secara *In Vitro*.** Setiap cawan petri diisi sekitar 200 larva cacing nematoda dalam larutan ekstrak herbal. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan selama 24 jam dan 48 jam dengan tiga kali ulangan pada tiga tingkat konsentrasi ekstrak, yaitu 2,5%, 5,0%, dan 7,5%. Pengamatan dilakukan pada jam ke-24 dan 48. Pengamatan terhadap jumlah larva cacing yang mati/lemah dengan lama waktu pengamatan dilakukan pada jam ke-40 (Ekawasti *et al.*, 2019).

**Uji Aktivitas Vermisidal terhadap Cacing Dewasa *H. contortus*.** Setiap cawan petri mengandung 50 ekor cacing dewasa dalam 200 µL larutan ekstrak herbal dengan tiga kali pengulangan terhadap tiga tingkat konsentrasi ekstrak yaitu 2,5%, 5,0%, dan 7,5%. Pengamatan di bawah mikroskop stereo dilakukan setiap jam hingga jam ke-6. Parameter yang diukur untuk uji *in vitro* terhadap cacing dewasa adalah persentase kematian cacing dewasa akibat pemberian ekstrak obat cacing. Untuk mengetahui apakah cacing tersebut mati, paralisis, ataupun masih sehat, maka cacing disentuh dengan batang pengaduk. Jika diam saja maka dilakukan pengecekan dengan cara memasukkan cacing tersebut ke dalam air hangat atau dengan pemberian garam. Apabila cacing tidak bereaksi maka cacing tersebut dinyatakan mati, dan jika masih bergerak cacing tersebut hanya mengalami paralisis maka cacing yang mengalami paralisis dimasukkan lagi ke dalam perlakuan ekstrak dan cacing dikatakan mati apabila motilitasnya hilang dan warnanya memudar, tidak bergerak saat digoyang dengan kuat atau saat dicelupkan pada air hangat 40 °C (Jiju *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini pengamatan dilakukan tiap jam hingga jam ke-6, dengan asumsi bahwa bahan aktif herbal merupakan bahan aktif yang cepat larut dan jangka waktu sampainya bahan kimia mulai dari tertelan hingga mencapai organ pencernaan khususnya abomasum memerlukan waktu kurang lebih empat jam.

#### Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan laboratorium ditabulasikan menggunakan

program *Microsoft Excel* dan dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Fitokimia Tanaman Herbal

Penapisan senyawa fitokimia dapat menentukan kandungan metabolit sekunder untuk menentukan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antihelmintik. Sebelum uji fitokimia, juga dilakukan uji penentuan *rendemen* yang berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut namun tidak dapat menentukan jenis senyawa apa yang terbawa oleh pelarut (Tabel 1.) (Ahmad *et al.*, 2016).

Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak tanaman obat alami menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid dan tanin pada sampel ekstrak tanaman herbal yang merupakan senyawa anthelmintik. Senyawa metabolit sekunder dari tanaman tersebut memiliki aktivitas anthelmintik (Hreckova dan Velebny, 2013; Sarojini *et al.*, 2012; Kamaraj *et al.*, 2011; Zahir *et al.*, 2009). Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut tidak disukai oleh parasit yang dapat menghambat daya tetas telur, membunuh larva dan cacing dewasa nematoda (Surya 2014; Astarani 2012). Uji fitokimia kualitatif dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada ekstrak obat alami yang dapat digunakan sebagai anthelmintik, kemudian dilanjutkan pada uji kuantitatif pada tiga senyawa utama yang dapat berperan sebagai anthelmintik (Tabel 1.).

Hasil pengujian fitokimia beberapa ekstrak etanol 96% pada tanaman herbal tersebut memiliki hasil yang sama dengan beberapa laporan penelitian sebelumnya. Ekstrak buah

pinang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin dan sejalan dengan yang laporan hasil penelitian Amudhan *et al.* (2012); Cahyanto (2018); Jaiswal *et al.* (2011) dan Petrina *et al.* (2017). Ekstrak buah mengkudu mengandung saponin, flavonoid dan alkaloid (Wulandari, 2011); rimpang temu putih mengandung tanin, saponin, dan flavonoid (Setiawan, 2008); biji alpukat mengandung tanin, flavonoid, dan polifenolat (Nururrifki *et al.*, 2017); serta biji pare mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid (Mills dan Bone, 2000).

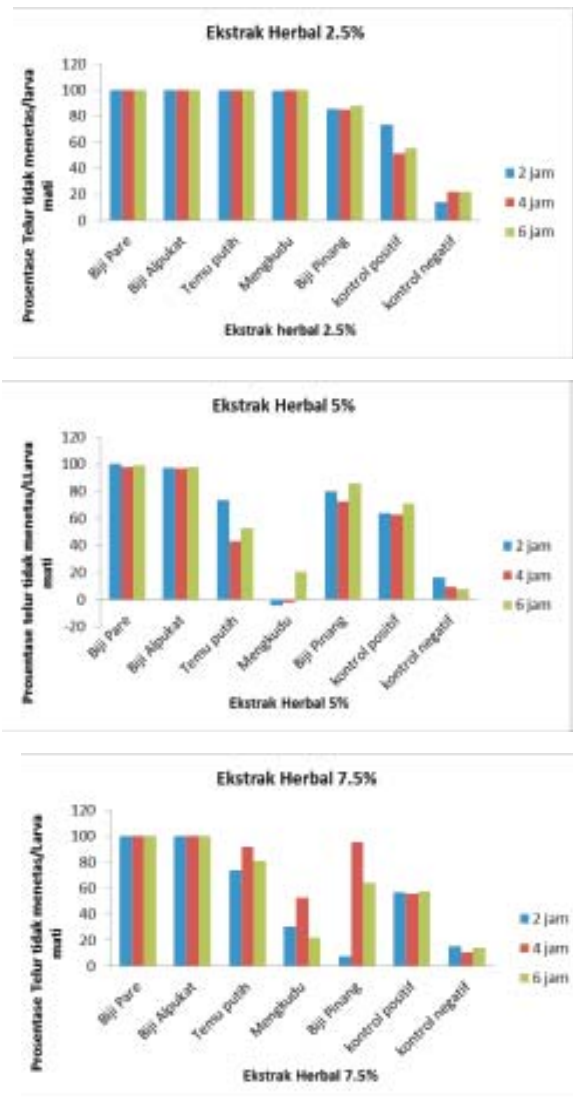
Namun demikian, beberapa uji menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder pada masing-masing tanaman yang berbeda dengan laporan penelitian sebelumnya. Hal ini kemungkinan karena tidak dilakukan uji terhadap keberadaan senyawa tertentu tersebut atau karena adanya perbedaan sampel yang digunakan, perbedaan lokasi tumbuh tanaman herbal yang dapat memengaruhi kondisi tanah dan faktor lingkungan seperti iklim, cahaya matahari, suhu udara, lingkungan atmosfer (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, dan kelembapan), lingkungan perakaran (sifat kimia dan fisika tanah), dan ketersediaan air di dalam tanah yang dapat memengaruhi hasil metabolisme sekunder tanaman (Nitisapto dan Siradz, 2005).

Tanaman yang memiliki kandungan metabolit sekunder seperti flavanoid, alkaloid, steroid dan tanin bersifat anthelmintik sehingga dapat melemahkan, membunuh dan memutus daur hidup cacing. Walaupun tidak membasmi parasit secara tuntas tetapi persentase hasil menunjukkan adanya aktivitas anthelmintik pada tanaman herbal yang diuji. Saponin berpotensi sebagai anthelmintik karena bekerja dengan cara menghambat enzim asetilkolinesterase, sehingga cacing mengalami paralisis otot dan berujung pada kematian (Kuntari, 2008; Ameen *et al.*, 2012). Fenol dalam

Tabel 1. Hasil uji fitokimia kualitatif dan kuantitatif ekstrak tanaman herbal etanol 96%

| No. | Sampel       | (%<br>rendemen) | (kualitatif) |           |         |         |              |       | (mg/kg) kuantitatif |         |       |
|-----|--------------|-----------------|--------------|-----------|---------|---------|--------------|-------|---------------------|---------|-------|
|     |              |                 | Alkaloid     | Flavonoid | Saponin | Steroid | Triterpenoid | Tanin | Flavonoid           | Saponin | Tanin |
| 1   | Buah pinang  | 27,8            | +            | +         | +       | -       | +            | +     | 2,3                 | 0,6     | 8,5   |
| 2   | Mengkudu     | 24,6            | +            | +         | +       | +       | +            | -     | 2,7                 | 0,3     | 0     |
| 3   | Temu putih   | 14,2            | +            | +         | +       | -       | -            | +     | 4,8                 | 2,8     | 0,1   |
| 4   | Biji alpukat | 11              | +            | -         | +       | -       | +            | +     | 0                   | 1,15    | 16,9  |
| 5   | Biji pare    | 12,2            | +            | +         | +       | -       | +            | +     | 5,9                 | 0,33    | 10,22 |

Keterangan: (+) : terdapat senyawa (-) tidak terdapat senyawa



Gambar 1. Aktivitas ovisidal ekstrak tanaman herbal 2,5%, 5,0% dan 7,5%. Senyawa alkaloid, saponin, tanin dapat mengakibatkan telur cacing nematoda gagal menetas atau rusak (Surya 2014; Arukwe *et al.*, 2012; Marlinda *et al.*, 2012) dan berperan sebagai anthelmintik terhadap cacing dewasa yang berpotensi menurunkan jumlah telur dalam feses (Setiawan, 2008) serta dapat menghambat perkembangan larva cacing nematoda, menurunkan populasi cacing dewasa, dan menurunkan fekunditas cacing betina dewasa (Nora *et al.*, 2017).

konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kelumpuhan pada tubuh cacing dan kemudian diikuti dengan kematian pada cacing (Bairagi *et al.* 2011). Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel meskipun pada konsentrasi yang sangat

rendah dan pada akhirnya cacing mati karena menurunnya persediaan glikogen dan berkurangnya pembentukan ATP dalam tubuh cacing (Naidu 2000; Elni *et al.*, 2020). Tanin memiliki efek antihelmintik *in vitro* maupun *in vivo* di dalam tubuh kambing dan domba (Athanasiadou *et al.*, 2001). Tanin juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap migrasi larva cacing pada kambing (Alonso-Diaz *et al.*, 2008).

Alkaloid merupakan polyphenol tanaman yang dapat larut dalam air dan dapat menggumpalkan protein. Alkaloid tanin memiliki efek vermifuga dengan cara merusak protein tubuh cacing. Hal ini dimungkinkan karena tanin mempunyai ikatan karbonil yang menyebabkan molekul tanin mudah terprotonisasi (menjadi ion bermuatan positif). Ion-ion positif ini kemudian menarik ion-ion negatif struktur protein pada organisme lain pada saluran pencernaan. Senyawa tanin memiliki kemampuan denaturasi protein menyebabkan protein pada permukaan tubuh cacing terdenaturasi sehingga permukaan tubuh cacing menjadi tidak permeabel lagi terhadap zat-zat di luar tubuh cacing (Kuntari, 2008). Senyawa flavonoid memiliki efek farmakologi pada pembuluh darah melalui terjadinya vasokonstriksi kapiler dan menurunkan permeabilitas pembuluh darah. Hal ini menyebabkan adanya gangguan pembuluh darah sehingga zat-zat makanan dan oksigen yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup cacing terganggu dan dapat mempercepat kematian cacing.

#### Aktivitas Ekstrak Tanaman Herbal pada Telur Cacing Nematoda *in vitro*

Uji *in vitro* yang diperlihatkan pada Gambar 1 bertujuan untuk melihat aktivitas anthelmintik ekstrak tanaman herbal pada telur cacing dilakukan dengan menggunakan ekstrak tanaman herbal konsentrasi bertingkat dengan perendaman selama 2, 4, dan 6 jam. Hal ini diperkirakan bahwa pakan dapat bertahan di dalam abomasum (organ pencernaan) kurang lebih empat jam. Pengamatan dilakukan pada jam ke-24. Waktu inkubasi telur cacing untuk menghitung telur cacing yang menetas dapat dilakukan pada jam ke-24 atau kurang dari 48 jam karena telur cacing dapat bertahan hingga 48 jam pada suhu ruang dalam keadaan baik (Beriajaya 2005). Hasil uji aktivitas ovisidal dapat dilihat pada Gambar 1 pada beberapa tingkat konsentrasi yang berbeda, menunjukkan bahwa dari lima jenis tanaman

herbal tersebut, biji pare dan biji alpukat yang menunjukkan hasil yang konsisten (relatif sama) pada tiap konsentrasi, sedangkan untuk tanaman temu putih, mengkudu dan biji pinang menunjukkan penurunan potensi sebagai ovisidal pada tiap peningkatan persentasi kandungan herbal yang menyebabkan berkurangnya daya larut dari tanaman herbal tersebut pada konsentrasi yang tinggi atau adanya titik jenuh telur cacing tersebut terhadap tingkat konsentrasi paparan ekstrak herbal sehingga efektivitas ovisidalnya menurun pada setiap peningkatan konsentrasi ekstrak herbal. Hal ini juga dapat dipengaruhi oleh lamanya waktu perendaman telur cacing pada ekstrak herbal selama 2, 4, dan 6 jam menunjukkan bahwa hanya biji pare dan biji alpukat yang dapat bekerja stabil dan optimal dalam menghambat daya tetas telur nematoda, sedangkan untuk ekstrak temu putih, mengkudu dan biji pinang memiliki hasil yang tidak stabil pada pemeriksaan jam ke-24 berdasarkan tingkat konsentrasi dan lama waktu perendaman.

Menurut Setiawan (2008), perpaduan kadar senyawa alkaloid, saponin dan tanin yang berpotensi terhadap daya tetas telur, yaitu telur gagal menetas atau rusak dan terhadap cacing dewasa dengan menghambat proses reproduksi melalui tahap pelemahan/paralisis bahkan mematikan sehingga dapat menurunkan jumlah telur dalam feses atau menghasilkan telur dengan kualitas embrio buruk sehingga daya tetas telurpun menurun.

#### **Aktivitas Larvasidal Ekstrak Tanaman Herbal pada Larva *Haemonhus contortus* secara *in vitro***

Uji *in vitro* untuk melihat aktivitas anthelmintik ekstrak tanaman herbal pada larva *H. contortus* dilakukan dengan menggunakan ekstrak tanaman herbal konsentrasi bertingkat pada lima kali pengulangan dengan pengamatan pada jam ke-24 dan jam ke-48. Larva *H. contortus* dapat bertahan hingga 48 jam di suhu ruang dalam keadaan baik (Beriajaya 2005). Hasil uji aktivitas larvasidal dapat dilihat pada Gambar 2 pada beberapa tingkat konsentrasi yang berbeda. Adanya potensi larvasidal ekstrak herbal yang stabil dan sejalan dengan tingkat konsentrasi dan lama waktu pengamatan. Makin tinggi tingkat konsentrasi ekstrak herbal dan makin lama waktu pengamatan maka makin tinggi potensi ekstrak herbal sebagai larvasidal terhadap daya bunuh

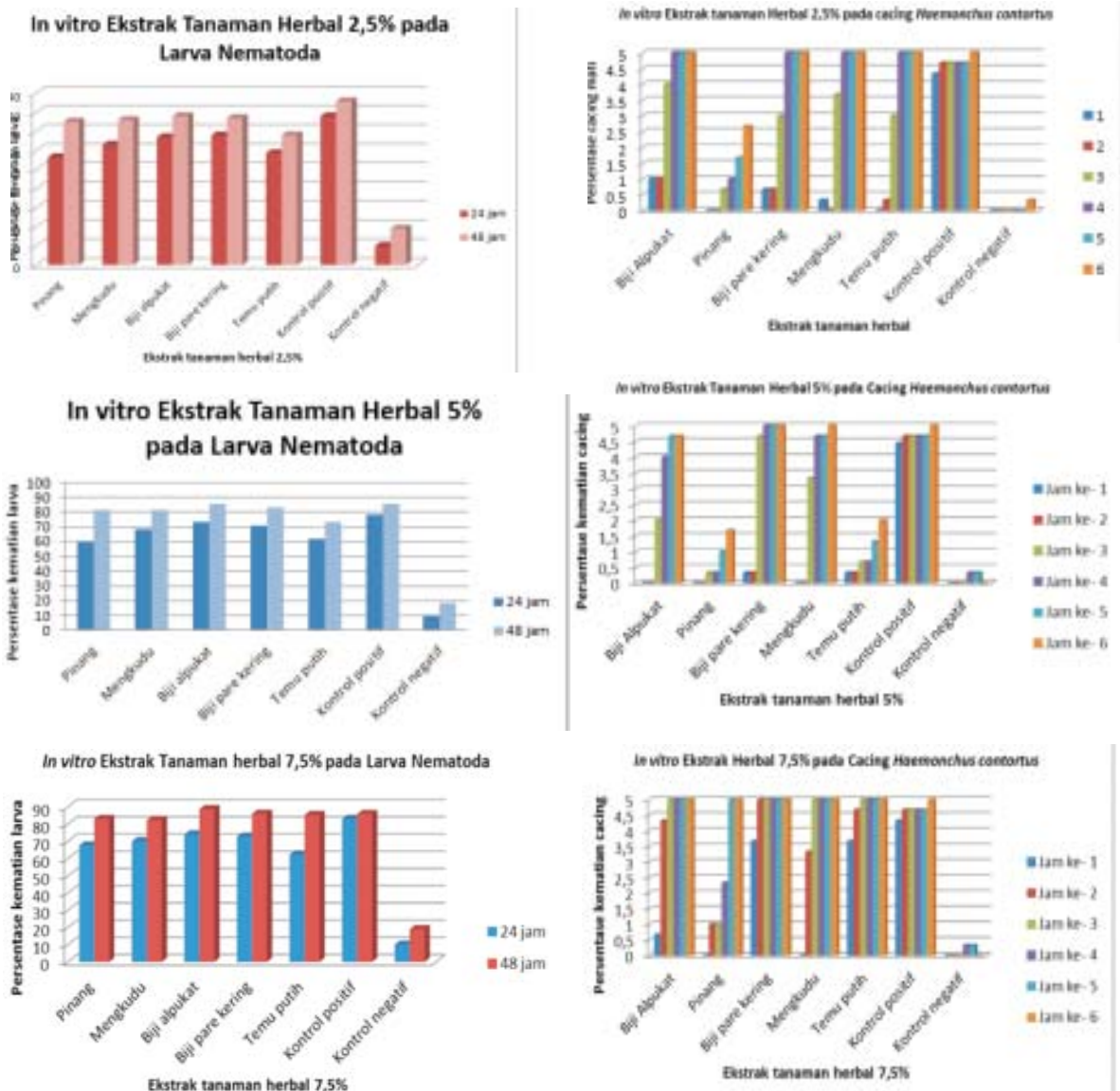
larva *H. contortus* secara *in vitro*.

Larva *H. contortus* memiliki tahap perkembangan larva (L1, L2, dan L3) di lingkungan (luar tubuh hewan hewan), sehingga potensi larvasidal ini dapat digunakan sebagai pengendalian *H. contortus* dengan meminimalisir kontaminasi atau perkembangan larva di lingkungan. Dari lima ekstrak herbal yang diuji, ekstrak biji alpukat 7.5% menunjukkan potensi efektivitas larvasidal yang paling tinggi. Biji alpukat mengandung alkaloid, saponin, triterpenoid dan tanin yang dapat membunuh larva *H. contortus*. Senyawa tanin berkonondensasi yang secara farmakologik mempunyai daya anthelmintik yang kemungkinan bersifat ovisidal, larvasidal, dan vermisisidal sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan haemonchosis. Tanaman yang mengandung senyawa metabolit yang bersifat sebagai anthelmintik dapat memicu kematian larva (Egualo *et al.*, 2011).

Alemu *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak jenis tanaman dengan konsentrasi tanin kondensasi tinggi dapat memengaruhi daya tetas telur, perkembangan larva, dan kematian cacing dewasa *H. contortus*. Konsentrasi tinggi kandungan tanin pada ekstrak tanaman herbal dapat menghambat pertumbuhan larva secara nyata. Aktivitas anthelmintik pada tanin yang terkondensasi mengikat protein pada membran plasma larva sehingga menurunkan jumlah protein yang terdapat pada larva yang dapat mengakibatkan larva kelaparan dan mati (Athanasiadou *et al.*, 2001).

#### **Aktivitas Antelmintik Ekstrak Tanaman Herbal pada Cacing Dewasa secara *in vitro***

Hasil uji *in vitro* aktivitas pada lima ekstrak herbal dengan konsentrasi 2,5%, 5,0% dan 7,5% pada pengamatan hingga jam ke-6 menunjukkan hasil yang fluktuatif. Ekstrak herbal konsentrasi 2,5% memiliki aktivitas anthelmintik vermisisidal yang dapat menyebabkan kematian cacing *H. contortus* secara optimal hingga pengamatan jam ke-6, yaitu ekstrak biji alpukat, mengkudu, biji pare dan rimpang temu putih, sedangkan pada ekstrak herbal konsentrasi 5,0% dan 7,5% yang memiliki aktivitas anthelmintik vermisisidal yaitu ekstrak biji pare, mengkudu dan biji alpukat; pada ekstrak herbal konsentrasi 7,5% biji pare, temu putih, biji alpukat, sehingga secara garis besar dapat ditentukan bahwa ekstrak herbal yang memiliki aktivitas anthelmintik vermisisidal yang stabil dan optimal



Gambar 2. Aktivitas larvasidal ekstrak tanaman herbal 2,5%, 5% dan 7,5%

Gambar 3. Aktivitas antelmintik ekstrak tanaman herbal 2,5%, 5% dan 7,5% pada cacing *H. contortus*

yaitu biji pare 5,0% dan 7,5% jika dibandingkan dengan aktivitas ekstrak herbal lainnya terhadap kontrol negatif dan positif.

Sifat anthelmintik dari zat aktif yang terkandung pada tanaman tersebut cenderung membasmi secara bertahap dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda, ada yang secara ovisidal, larvasidal dan atau vermisidal. Mekanisme kerja zat anthelmintik pada ekstrak herbal nerlangsung secara bertahap, yaitu pembasmian yang dilakukan tidak secara langsung menyeluruh melainkan diawali dengan tahap menghambat (daya tetas telur, melemahkan dan paralisis kemudian kematian larva/cacing dewasa). Hal ini ditunjukkan oleh

beberapa hasil pengamatan yang bersifat fluktuatif, namun pada akhirnya dapat mengurangi jumlah parasitnya. Dengan kata lain tanaman ini mempunyai kecenderungan mempertahankan jumlah parasit untuk tidak mengalami kenaikan yang nyata. Berdasarkan hasil aktivitas anthelmintik ekstrak etanol 96% tanaman herbal yang konsisten pada konsentrasi 2,5-7,5% yang dengan hasil penapisan fitokimia secara kuantitatif diperlihatkan oleh biji pare yang berperan sebagai *vermisidal* dan *ovisidal*, serta biji alpukat yang berperan sebagai *larvasidal* terhadap cacing nematoda *H. contortus*.

Biji pare memiliki kandungan senyawa



metabolit sekunder yang dominan pada flavonoid dan tanin, sedangkan alpukat memiliki kandungan kadar tanin yang paling tinggi. Dari data tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa tanin dapat berperan utama sebagai larvasidal terhadap larva *H. contortus*, dan senyawa flavonoid lebih cenderung berperan sebagai ovisidal terhadap telur cacing nematoda dan vermisisidal terhadap cacing *H. contortus*.

### SIMPULAN

Tingkat konsentrasi ekstrak herbal dan lama waktu pengamatan meningkatkan potensi ekstrak herbal sebagai larvasidal terhadap daya bunuh larva *H. contortus* secara *in vitro*. Aktivitas antelmintik tanaman herbal yang konsisten pada konsentrasi 2,5-7,5% diperlihatkan oleh biji pare (*vermisisidal* dan *ovisidal*) dan biji alpukat (*larvasidal*).

### SARAN

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk melihat uji efektivitas dan toksisitas biji pare dan biji alpukat sebagai obat cacing nematoda secara *in vivo*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana dengan anggaran penelitian dana DIPA BB Litvet tahun 2016. Ucapan terimakasih disampaikan kepada teknisi litkayasa laboratorium parasitologi, BBLitvet (Bpk. Zainal Kosasih, Bpk. Sudrajad, Bpk. Farlin, Bpk. Suharyanta, dan Bpk. Sukatma) yang telah membantu kegiatan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad J, Tanveer S, Zargar BA. 2013. *In vitro* Anthelmintic Activity of *Mentha longifolia* (L.) Leaves Against *Ascaridia galli*. *Glob Vet* 11(1): 112-117,
- Ahmad AR, Juwita J, Ratulangi SAD, Malik A., 2016. Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) Rm Sm) Menggunakan Spektrofotometri UvVis. *Pharmaceutical Sciences and Research* 2(1): 1-10
- Alemu Z Kechero Y, Kabede A, Muhammed A. 2014. Comparison of the *in vitro* inhibitory effect of doses of tanin rich plant extract and ivermectin on egg hatch ability, larvae development, and adult mortality of *Haemonchus contortus*. *Acta Parasitol* 59: 513-519.
- Alonso-Díaz JFJ, Torres-Acosta CA, Sandoval-Castro S, Hoste BH. 2008. The effects of four tropical taniniferous plants on the *in vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Trichostrongylus colubriformis* stages. *Vet Parasitol* 153: 187-192
- Ameen, Adedeji OS, Ojedapo LO, Salihu T, Fakorode OL. 2012. Anthelmintic Efficacy of Pawpaw (*Carica papaya*) Seeds in Commercial Layers. *African Journal Biotechnology* 11(1): 126-130
- Ardana IBK, Bakta IM, Damriyasa IM. 2012. Peran Ovisidal Herbal Serbuk Biji Pepaya Matang dan Albendazol terhadap Daya Berembrio Telur Cacing *Ascaris suum* secara *In Vivo*. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6(1): 51-55
- Arukwe U, Amadi BA, Duru MKC, Agomuo EN, Adindu EA, Odika P.C. 2012, Chemical Composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed, *IJJRAS* 11: 346-348.
- Astarani MC. 2012. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Alpukat (Persea americana Mill.) terhadap Mortalitas Cacing Ascaris suum Goeze in Vitro*. Surakarta. Universitas Sebelas Maret).
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tanins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet Parasitol* 99(3): 205-219. doi:10.1016/s0304-4017(01)00467-8
- Basir A, Tarman K, Desniar D. 2017. Aktifitas antioksidan dan antibakteri alga hijau *Halimeda gracilis* dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 20(2): 211-118.
- Berijaya, Priyanto D. 2004. Efektifitas Serbuk Daun Nanas Sebagai Antelmintika pada Sapi yang Terinfeksi Cacing Nematoda

- Saluran Pencernaan. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, hlm 162-169.
- Berijaya. 2005. Gastrointestinal Nematode Infections on Sheeo and Goats in West Java, Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 10(4): 293-304.
- Blakely J, David HB. 1991. *The Science of Animal Husbandry*. New Jersey. Printice-Hall Inc.
- Cahyanto HA. 2018. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L). *Jurnal Kementerian Perindustrian Republik Indonesia* 14(2): 70-73.
- Damayanti. 2007. Uji daya antelmintik ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L) terhadap cacing *Ascaridia galli* Schrank betina secara *in vitro* dan profil kromatografi lapis tipisnya. <http://digilib.ums.ac.id>. [29 Juni 2019].
- Deore SL, Khadabadi SS, Kamdi KS, Ingle VP, Kawalkar NG, Sawarkar PS, Patil UA, Vyas AJ. 2009. *In vitro* Anthelmintic activity of *Cassia tora*. *Int J Chem Tech Res* 1(2): 177-179
- Dewi DA, Martindah E, Sawitri DH, Wardhana AH, Ekawasti F. 2017. Deteksi Larva Cacing Nematoda Sebelum dan Sesudah Pengobatan pada Beberapa Bangsa Domba. DOI:10.14334/Pros. Semnas.TPV-2017-p.363-370
- Eguale T, Tilahun G, Debella A, Feleke A, Makonnen E. 2007. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 428-433.
- Ekawasti F, Suhardono, Sawitri DH, Dewi DA, Wardhana AH. 2017. Martindah E. 2017. Media Penyimpanan Telur, Larva dan Cacing Nematode sebagai Media Uji In Vitro. DOI - 10.14334/Pros.Semnas.TPV-2017-Hlm. 695-703.
- Ekawasti F, Suhardono, Dewi DA., Martindah, Wardhana AH, Sawitri DH. 2019. Skrining Efektivitas Ekstrak Tanaman Herbal sebagai Anthelmintik terhadap Telur dan Larva Nematoda serta Cacing *Haemonchus contortus* secara *In-Vitro*. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/Pros.Semnas.TPV-2019>. Hlm. 462-473.
- Elni, IIP, Lesik MMNN. 2020. Evaluasi Sifat Anti Parasit Terhadap Daun Mayana (*Solenostemon scutellarioides* (L)). *Musamus Journal of Livestock Science* 3(1): 31-36 <https://ejournal.unmus.ac.id/index.php/>
- Emery DL, Hunt PW, Jambre LFL. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here. *Int J Parasitol* 46: 755-769.
- Garduño RG, de Gives PM, Hernández GT. 2013. Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. *Pesq Vet Bras* 33: 469-475.
- Jabbar A, Campbell AJD, Charles JA, Gasser RB. 2013. First report of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* in alpacas in Australia. *Parasites & vectors* 6(1): 243. doi:10.1186/1756-3305-6-243
- Jaiswal P, Kumar P, Singh VK, Singh DK, 2011, *Areca catechu* L: A valuable herbal medicine againts different health problems. *Res J Med Plant* 5(2): 145-52.
- Jiju V, Gorantla M, Chamundeeswari D. 2013. Evaluation of anthelmintic activity of methanolic extract of *Asystasia gangeticum*. *Int J of Pharm & Life Sci* 4(6): 2727-2730.
- Kamaraj C, Rahuman AA, Elango G, Bagavan A, Zahir AA. 2011. Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* 109: 37-45
- Kuntari T. 2008. Daya Antelmintik Air Rebusan Daun Ketepeng (*Cassia alata*. L) Cacing Tambang Anjing *in vitro*. *Logika* 5(1): 23-26.
- Lailatul L; Konsentrasiohman A; Eko R. 2010, Efektivitas Biolarvasida Ekstrak Etanol Limbah Penyulingan Minyak Akar Wangi (*Vetiveria zizanoioides*) terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypty*, *Culex sp.*, dan *Anopheles sundaicus*, *JSTK* 1(1): 59-65.
- Lambertz C, Pouloupoulou I, Wuthijaree K, Gauly M. 2018. Endoparasitic infections and prevention measures in sheep and goats under mountain farming conditions in Northern Italy. *Small Ruminant Research* 164: 94-101

- Marlinda M, Sangi MS, Wuntu AD. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea Americana* Mill.). *Jurnal MIPA Unsrat Online* 1(1): 24-28, doi:10.35799/jm.1.1.2012.427.
- Martindah E. Sawitri DH, Dewi DA, Wardhana AH, Ekawasti F. 2016. Faktor Risiko dan Tingkat Resistensi Cacing Nematoda Terhadap Antelmintik pada Sapi. *Laporan Penelitian APBN 2016* [unpublish data]
- Mills S, Bone K. 2000. *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine*. Edinburg, Churchill Livingdstone. Hlm. 439-447.
- Nabukenya I, Rubaire-Akiiki C, Olila D, Muhangi D, Höglund J. 2014. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. *Vet Parasitol* 205: 666-675.
- Naidu AS. 2000. *Natural Food Antimicrobial System*. USA. CRC Press. Nitisapto N, Siradz SA. 2005. Evaluasi lahan untuk pengembangan jahe pada beberapa daerah di Jawa Timur. *Jurnal Lahan* 5(2): 15-19
- Nora D, Astuti T, Wahid D. 2017. Efektivitas Daun Nangka dalam Ransum Ruminansia Terhadap, Kecernaan Bahan Kering, Bahan Organik dan Kandungan Tanin. *Jurnal BiBieT2*: 20. Doi 10.22216/jbbt.v2i1.1917.
- Nururrifki RJ, Suwendar, Mulqie L. 2017. Uji Aktivitas Antelmintik Infusa Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Cacing Gelang Babi Dewasa dan Telur (*Ascaris suum*) Secara *In Vitro*. Seminar Penelitian Sivitas Akademika Universitas Islam Bandung. Bandung. Unisba. Vol 3, No 2, Prosiding Farmasi.
- Papadopoulos DK, Skouloudaki K, Adachi Y, Samakovlis C, Gehring WJ. 2012. Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of Sex combs reduced in *Drosophila*. *Dev Biol* 367(1): 78-89.
- Petrina R. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Kulit Biji Pinang Sirih (*Areca catechu* L). *Jurnal Kimia Khatulistiwa* 6(2): 70-77.
- Ratnawati D, Supriyati R, Ispamuji D. 2013. Aktivitas Antelmintik Ekstrak Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica* L) Terhadap Cacing Gelang Babi (*Ascaris suum*). Bengkulu. Fakultas MIPA Universitas Bengkulu.
- Razali, Azhari, Novita A, Ferasyi TR, Ridwan, Munandar A. 2014. Potency of Katuk Leaf Extracts and Its Suspension as Anthelmintic against Gastrointestinal Nematodes in Goat. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8(2): 120-123.
- Ridwan Y, Ayunita YQ. 2007. Fitokimia dan aktivitas anthelmintika terhadap cacing pita ayam dari beberapa varietas miana (*Coleus blumei* Benth) secara *in vitro*. *Jurnal Protein* 14: 17-20.
- Setiawan E. 2008. Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik Cacing *Lumbricus rubellus*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Institut Pertanian Bogor
- Tiwow D, Widdhi B, Novel SK. 2013. Uji efek antelmintik ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu*) terhadap cacing *Ascaris lumbricoides* dan *Ascaridia galli* secara *in vitro*. *Pharmakon* 2(2): 76- 80.
- Tjokropranoto R, Azaria C, Jutan M, Ghalib SM. 2018. The Anthelmintic Effectivity of Gandarusa Leaves (*Justicia gendarussa* Burm. F.) Infusion and Kapok Seed Infusion (*Ceiba pentandra* L.) Against Female *Ascaris suum* *In Vitro*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Anthelmintic-Effectivity-of-Gandarusa-Leaves-Tjokropranoto-Azaria/32bceba53babf99603bcca0773c7a16ef5679223>
- Wulandari SN. 2011. Uji Efek Antelmintik Buah dan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap *Ascaris suum* Secara *In Vitro*. *Thesis*. Bandung. Universitas Kristen Maranatha. <http://repository.maranatha.edu/id/eprint/2531>.
- Whitlock JH. 1948. *Diagnosis of veterinary parasitism*. Philadelphia (USA): Lea and Febiger.