

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **I.1. Latar Belakang Penelitian**

Askariasis merupakan salah satu infeksi cacing yang disebabkan oleh cacing *Ascaris lumbricoides* yaitu nematoda patogen pada usus halus yang dapat mengakibatkan malnutrisi, gangguan pertumbuhan, gangguan kognitif, dan obstruksi saluran pencernaan, dengan angka kejadian yang tinggi di dunia maupun di Indonesia. Parasit ini banyak terdapat di daerah iklim di daerah beriklim tropis dengan kelembaban yang tinggi dan paling banyak ditemukan di tempat-tempat dengan sanitasi yang jelek.

Askariasis ditemukan pada semua umur, tetapi lebih sering ditemukan pada anak-anak usia 5 sampai 10 tahun. Prevalensi askariasis di Indonesia masih tinggi terutama pada anak, yaitu antara 60-90 %, prevalensi askariasis di propinsi DKI Jakarta adalah 4-91%, Jabar 20-90 %, Yogyakarta 12-85 %, Jatim 16-74 %, Bali 40-95 %, NTT 10-75 %, Sumut 46-75 %, Sumbar 2-71 %, Sumsel 51-78 %, dan Sulut 30-72 %. Di Indonesia, *Ascaris lumbricoides* dikenal sebagai cacing gelang. Predileksi cacing dewasanya terdapat di dalam lumen usus halus manusia, tetapi kadang-kadang dijumpai di bagian usus lainnya. Penularan dapat terjadi melalui beberapa cara, yaitu masuknya telur infeksius melalui makanan dan minuman yang tercemar dan melalui tangan yang kotor atau terhirup bersama debu udara yang tercemar telur infeksius.<sup>4</sup>

Untuk mencegah dan mengobati infeksi cacing *ascaris*, banyak digunakan obat antara lain mebendazol, albendazole, pirantel pamoat, levamisol hidroklorida, garam piperazin dan cyclobendazole. Obat cacing ini kerjanya menghambat asetilkolin esterase sehingga cacing mati dalam keadaan paralisis (lumpuh). Namun obat ini harganya cukup mahal, sulit untuk didapatkan dan masih ditemukan adanya efek samping, oleh karena itu perlu usaha untuk mencari dan menemukan obat cacing baru yang murah, aman, mudah didapatkan dan efektif terutama yang berasal dari tumbuhan. Indonesia yang dikenal sebagai negara dengan megabiodiversitas, memiliki keanekaragaman hayati flora dan fauna yang sangat melimpah. Dari 28.000 jenis tumbuhan yang ditemukan di Indonesia, kurang lebih 7.000 jenis diantaranya adalah tumbuhan obat. Telah dilaporkan bahwa tanaman temu lawak, temu ireng, bawang putih, kumis kucing, lempuyang wangi, putri malu, mengkudu, pare, biji pinang, dapat digunakan sebagai

obat cacing dan telah dibuktikan khasiatnya secara ilmiah sebagai anthelmentik. Namun masih banyak tanaman yang belum dieksplorasi khasiatnya untuk pencegahan maupun untuk pengobatan penyakit terutama untuk infeksi cacing ascaris. Tanaman pinus merupakan salah satu kandidat tanaman yang berpotensi sebagai obat cacing.

Telah dilaporkan bahwa tanaman pinus mempunyai khasiat sebagai antibakteri (Perica *et al.*, 2015), imunostimulan (Park *et al.*, 2011), antioksidan (Apetrei *et al.*, 2011), antiinflamasi (Shuaib *et al.*, 2013), antifungi (Claude *et al.*, 2014), antitumor (Qadir and Shah, 2014), larvasidal (Setiawan *et al.*, 2016) dan imunostimulant (Sudjarwo *et al.*, 2018). Berbagai kandungan senyawa kimia yang dapat diisolasi dari tanaman pinus antara lain adalah hexacosyl ferulate; 1,5-dihydroxy-3,6,7-triethoxy-8-allyloxyxanthone; 1-hidroksi-3,6-diethoxy-2- $\beta$ -D-glucopyranoxanthone; friedelin, alkohol ceryl,  $\beta$ -sitosterol; taxifolin, quercetin, catechin, kaempferol, rhamnetin, 3,4-Dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, pinosylvin, pinoresinol, Asam resin, sterol, galocatechin, caryophyllene, 3-Carene,  $\alpha$ -humulne,  $\alpha$ -terpeniol, pinene, longifolene, camphene, limonene,  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -terpineol, d-borneol, pycnogenol,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, bornyl acetate,  $\beta$ -caryophyllene, monoterpene, limonene dan proanthocyanidin (Claude *et al.*, 2014). Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa tanaman pinus dapat digunakan sebagai anthelmentik (obat cacing) yaitu untuk cacing *Haemonchus contortus* (Tariq and Tantry, 2012), *Fasciola hepatica* (Kaushik *et al.*, 2015) dan *Trichostrongylus colubriformis* (Chan *et al.*, 2011). Tanaman pinus telah dilaporkan juga dapat menghambat enzim asetilkolinesterase (Bonesi *et al.*, 2010; Owokotomo *et al.*, 2015), yang mana enzim ini sangat dibutuhkan untuk pergerakan cacing sehingga kalau enzim asetilkolinesterase ini dihambat maka cacing akan mati dalam keadaan paralisis (kelumpuhan).

Pada saat ini telah berkembang teknologi nano yang dapat digunakan untuk membuat formulasi nanopartikel tanaman obat. Aplikasi nanoteknologi membuat revolusi baru dalam dunia industri tanaman obat, nanoteknologi meliputi usaha dan konsep untuk menghasilkan material atau bahan berskala nanometer yang dapat meningkatkan stabilitas dan kelarutan herbal sehingga dapat meningkatkan potensi dan efektivitasnya (Gomes *et al.*, 2014; Franco-Romano and Gil, 2014)

Oleh karena ekstrak pinus mempunyai khasiat anthelmentik dan dapat menghambat enzim asetilkolinesterase maka perlu dilakukan uji aktivitas anthelmentik nanopartikel ekstrak Pinus merkusii terhadap cacing *Ascaridia galli* secara invitro. Hasil penelitian ini diharapkan

dapat menemukan obat alternatif anti ascariasis yang baru, aman, efektif, mudah didapatkan dan harganya murah sehingga bisa terjangkau oleh semua lapisan masyarakat dan dapat membantu pemerintah dalam upaya pengendalian dan pemberantasan penyakit cacingan.

## **1.2 Permasalahan Penelitian**

1. Apakah ekstrak Pinus merkusii dapat dibuat sediaan nanopartikel ?
2. Bagaimanakah karakter dan morfologi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii ?
3. Apakah nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat digunakan untuk membunuh cacing *Ascaridia galli* ?
4. Berapakah LC50 (Lethal Concentration 50) nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dalam membunuh cacing *Ascaridia galli* ?
5. Apakah nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat menghambat enzim asetilkolinesterase pada cacing *Ascaridia galli* ?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk membuktikan bahwa nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat digunakan sebagai anthelmentik untuk membunuh cacing *Ascaridia galli*

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Untuk membuat ekstrak Pinus merkusii menjadi sediaan nanopartikel
2. Untuk menentukan karakter dan morfologi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii
3. Untuk membuktikan nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat membunuh cacing *Ascaridia galli* ?
4. Untuk menentukan LC50 (Lethal Concentration 50) nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dalam membunuh cacing *Ascaridia galli*
5. Untuk membuktikan nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat menghambat enzim asetilkolinesterase pada cacing *Ascaridia galli*.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi bahwa nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat digunakan sebagai anthelmentik untuk membunuh cacing Ascaris
2. Membantu pemerintah dalam upaya pengendalian dan pemberantasan penyakit cacangan yang banyak terjadi di masyarakat
3. Membantu masyarakat untuk mendapatkan anthelmentik yang aman, efektif, mudah didapatkan dan harganya murah sehingga bisa terjangkau oleh semua lapisan masyarakat.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tinjauan Tentang *Pinus merkusii*

*Pinus merkusii* merupakan spesies pinus yang tumbuh secara alami di Indonesia yaitu di Aceh, Tapanuli dan Kerinci. Dalam perkembangannya tanaman *P. merkusii* banyak dibudidayakan di Pulau Jawa karena mempunyai keunggulan produk ganda yaitu sebagai penghasil kayu dan getah. Hasil kayunya dapat dimanfaatkan untuk konstruksi, korek api, *pulp* dan kertas, sedangkan getahnya dapat diolah menjadi gondorukem dan terpentin. Di Indonesia getah pinus pemanfaatannya masih terbatas untuk cat, kertas dan sabun. Tanaman pinus di negara maju telah dimanfaatkan pada industri makanan, kosmetik dan obat-obatan sehingga mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Kelemahan *pinus merkusii* adalah peka terhadap kebakaran, karena menghasilkan daun yang tidak mudah membusuk secara alami (Siregar, 2005).

#### 2.1.1 Taksonomi pohon *Pinus merkusii*

Menurut Baharuddin dan Taskirawati (2009) sistematika pohon Pinus adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermathopytha
Subdivisi	: Gymnospermae
Kelas	: Coniferae
Ordo	: Pinales
Famili	: Pinaceae
Genus	: Pinus
Spesies	: <i>Pinus merkusii</i>

Pohon ini dapat mencapai tinggi 60-70 m dengan diameter 10 cm. Kulit batang berwarna kelabu tua, berjalur agak dalam, memanjang bersepih dalam lempeng, batang bulat panjang lurus dan kadang-kadang juga bengkok. Tajuk pohon ini tidak begitu lebar, pada waktu muda berbentuk kerucut panjang dan agak rapat dan selalu hijau. Daunnya berbentuk jarum dengan panjang 15-20 cm dan buahnya berbentuk kerucut.

### **2.1.2 Kandungan bahan aktif tanaman Pinus**

Tanaman pinus dikenal sebagai sumber yang kaya terpenoid, flavonoid, tanin, xanthones yang terdapat pada semua bagian tanaman dan telah banyak digunakan untuk tujuan terapeutik. Berbagai kandungan senyawa kimia yang dapat diisolasi dari tanaman pinus antara lain adalah hexacosyl ferulate; 1,5-dihydroxy-3,6,7-triethoxy-8-allyloxyxanthone; 1-hidroksi-3,6-diethoxy-2- $\beta$ -D-glucopyranoxanthone; friedelin, alkohol ceryl, b-sitosterol; taxifolin, quercetin, catechin, kaempferol, rhamnetin, 3,4-Dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, pinosylvin, pinoresinol, Asam resin, sterol, galocatechin, caryophyllene, 3-Carene,  $\alpha$ -humulne,  $\alpha$ -terpeniol, pinene, longifolene, camphene, limonene,  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -terpineol, d-borneol, pycnogenol,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, bornyl acetate,  $\beta$ -caryophyllene, monoterpene, limonene dan proanthocyanidin (Claude *et al.*, 2014)

### **2.1.3 Manfaat Tanaman Pinus**

Tanaman pinus banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Telah dilaporkan bahwa tanaman pinus mempunyai khasiat sebagai antibakteri (Perica *et al.*, 2015), imunostimulan (Park *et al.*, 2011), antioksidan (Apetrei *et al.*, 2011), antiinflamasi (Shuaib *et al.*, 2013), antifungi (Claude *et al.*, 2014), dan antitumor (Qadir and Shah, 2014). Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa tanaman pinus dapat digunakan sebagai anthelmentik (obat cacing) yaitu untuk cacing *Haemonchus contortus* (Tariq and Tantry, 2012), *Fasciola hepatica* (Kaushik *et al.*, 2015) dan *Trichostrongylus colubriformis* (Chan *et al.*, 2011). Tanaman pinus telah dilaporkan juga dapat menghambat enzim asetilkolinesterase (Bonesi *et al.*, 2010; Owokotomo *et al.*, 2015), yang mana enzim ini sangat dibutuhkan untuk pergerakan cacing sehingga kalau enzim asetilkolinesterase ini dihambat maka cacing akan mati dalam keadaan paralisis (lumpuh).

Ekstrak pinus juga dapat bersifat bakterisid (membunuh) kuman *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Eschericia coli*, (Abi-ayad *et al.*, 2011; Raho, 2014); *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* (Karapandzova *et al.*, 2012; Leandro *et al.*, 2014); *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae* (Fekih *et al.*, 2014); *Bacillus subtilis* (Sonibare and Olakunle, 2008)

Ekstrak pinus juga mempunyai khasiat imunostimulan karena mengandung senyawa proanthocyanidin, yang dapat meningkatkan kerja komponen sistem imun dengan menstimulasi aktivitas lisosom makrofag sehingga dapat meningkatkan kadar IL-12 dan berperan dalam meningkatkan proliferasi sel B dan sel T yang diperlukan dalam pertahanan melawan patogen. Fungsi ini sangat diperlukan untuk meningkatkan kemampuan eliminasi makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, yang mana *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai kemampuan bertahan hidup dan berbiak di dalam makrofag (Park *et al.*, 2011).

## 2.2. Teknologi Nano Partikel

Untuk memodifikasi fisik pada herbal yang mencakup perubahan ukuran partikel menjadi lebih kecil sehingga pemanfaatan yang lebih luas. Perkembangan modifikasi fisik mengarah ke bentuk nano-partikel. Nano-partikel mempunyai keunggulan dibandingkan dengan material sejenis dalam ukuran besar (*bulk*) karena ukuran nano-partikel memiliki nilai perbandingan antara luas permukaan dan volume yang lebih besar jika dibandingkan dengan bahan sejenis dalam ukuran besar, sehingga nano-partikel bersifat lebih reaktif. Reaktivitas material ditentukan oleh atom-atom dipermukaan, karena atom-atom tersebut yang bersentuhan langsung dengan material lain (Mohanraj and Chen, 2006).

Diantara berbagai metode pembuatan nanopartikel herbal, gelasi ionik merupakan metode yang banyak menarik perhatian peneliti dikarenakan prosesnya yang sederhana, tidak menggunakan pelarut organik, dan dapat dikontrol dengan mudah. Prinsip pembentukan partikel pada metode ini adalah terjadinya interaksi ionik antara gugus amino pada kitosan yang bermuatan positif dengan polianion yang bermuatan negatif membentuk struktur *network* inter-dan/atau intramolekul tiga dimensi (Gomes, 2014). *Crosslinker* polianion yang paling banyak digunakan adalah sodium tripolifosfat, karena berifat tidak toksis dan memiliki multivalen. Proses *crosslinking* secara fisika ini tidak hanya menghindari penggunaan pelarut organik, namun juga mencegah kemungkinan rusaknya bahan aktif dalam nanopartikel herbal (Chaudhary, 2011). Metode yang dapat digunakan untuk memproduksi mikro dan nanopartikel herbal adalah metode ikatan silang emulsi (*emulsion cross-linking*), presipitasi (*precipitation*), pengeringan semprot (*spray drying*), metode penggabungan droplet emulsi (*emulsion-droplet coalescence method*), gelasi ionik (*ionic gelation*), *reverse micellar method*, dan kompleks polielektrolit (*polyelectrolyte complex*) (Gomes et al., 2014; Franco-Romano and Gil, 2014).

### 2.3. *Ascaridia galli*

*Ascaridia galli* merupakan nematoda yang digunakan untuk uji obat cacing *Ascaris* dan ditemukan di semua jenis unggas dan memiliki penyebaran sangat luas di dunia, cacing ini ditemukan di semua benua kecuali antartika (Tarbiat, 2012). *A. galli* berkembang di dalam usus dapat menyebabkan kerusakan sebagian atau total pada duodenum atau jejunum (Hansen, 1998). Gejala klinis dari infeksi helmintik jenis ini adalah penurunan berat badan, kecepatan tumbuh, efisiensi pakan, produksi telur, dan menyebabkan enteritis, diare serta anemia. *A. galli* juga berperan dalam transmisi *Salmonella* dan *Reovirus* (Katakam dkk., 2010).

Taksonomi *A. galli* menurut Integrated Taxonomic Information System oleh Anonim (2014) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Animalia

Filum : Nematoda

Kelas : Secernentea

Bangsa : Ascaridida

Suku : Ascaridiidae Travassos

Marga : *Ascaridia* Dujardin

Spesies : *Ascaridia galli*

*Ascaridia galli* dewasa berwarna putih kekuningan dan semitransparan. Kutikula (cuticle) berpola lurik transversal. Bukaan mulut (oral opening) diselubungi oleh tiga bibir cembung yang menonjol. Dua papila menonjol terdapat pada bibir (lip) dorsal dan pada setiap bibir subventral. Sepasang papilla berada pada sisi tubuh dekat ujung anterior (Ramadan dan Znada, 1992).

Telur *A. galli* berbentuk bulat dan diselubungi oleh tiga lapisan yaitu lapisan permeabel dalam (vitelline membrane), cangkang tebal resisten dan lapisan albumin tipis. Lapisan tersebut yang merupakan faktor kunci dalam resistensi terhadap desikasi dan ketahanan jangka panjang di lingkungan (Tarbiat, 2012).

Siklus hidup *A. galli* bersifat langsung (direct), meliputi dua populasi utama yaitu parasit dewasa secara seksual dalam saluran pencernaan dan tahap infeksi (L3) dalam bentuk telur yang telah terembrionasi yang resisten di lingkungan. *A. galli* akan menyebar melalui feses yang mengandung telur yang terlarut dalam air dan tertelan oleh unggas (Permin dan Hansen, 1998),



atau melalui cacing tanah atau belalang yang telah menelan telur (Olsen, 1974). Telur belum berkembang pada saat keluar bersama dengan feses dari ayam terinfeksi, tetapi berisi larva tahap pertama (L1) hasil embrionasi. Telur akan berkembang pada suhu lingkungan (20-27°C) menjadi larva tahap kedua (L2) setelah 8 – 14 hari, tergantung pada suhu dan kelembaban relatif (Olsen, 1974). Dalam keadaan optimal (32 – 34°C) (e.g inkubasi di dalam air) telur dapat mencapai L2 dalam waktu 5 hari. Telur yang tertelan cacing tanah dan belalang akan menetas dalam 15- 60 menit dan L2 akan bermigrasi ke jaringan tubuh, yang kemudian menjadi sumber infeksi jika unggas memakannya (Permin dan Hansen, 1998; Olsen, 1974). Telur akan mati dalam 22 jam pada suhu -8 – 12°C (Permin dan Hansen,1998). Telur tidak mengalami perkembangan pada suhu di atas 35°C, suhu di atas 43°C dan kekeringan bersifat letal bagi telur pada semua tahapan. Telur dapat bertahan selama 1 bulan pada suhu 0°C dan selama 161 minggu di dalam tanah, walaupun infektivitasnya menurun bersama peningkatan umur (Permin dan Hansen, 1998; Olsen, 1974). Di dalam unggas, telur akan menetas di dalam proventrikulus dan duodenum. Larva akan berada di dalam lumen atau ruang intervillar duodenum selama 6-9 jam sebelum sebagian kecil diantaranya menempel atau menginvasi lapisan mukosa, dimulai dari hari pertama hingga hari ke-26. Sebagian besar akan meninggalkan mukosa pada hari ke-9 lalu ke lumen dimana ganti kulit (molt) ke-2 terjadi. Larva tahap ketiga (L3) masuk ke mukosa dan berganti kulit pada hari ke-14 hingga 19 setelah infeksi. Selama waktu tersebut, larva di dalam mukosa dan lumen berkembang dengan kecepatan yang sama, tapi setelah itu pertumbuhan pada sisa yang berada di mukosa terhambat. Larva tahap empat (L4) yang terbentuk akan kembali ke lumen dan terus berkembang, hingga menjadi dewasa pada hari ke-18 hingga 22 setelah infeksi. Betina dewasa akan mulai bertelur pada hari ke-30 hingga 50 setelah infeksi (Permin dan Hansen, 1998).

*Ascaridia galli* akan menjadi dewasa lebih cepat yaitu sekitar 5-6 minggu pada ayam dengan umur di bawah 3 bulan, sedangkan pada umur yang lebih tua dapat membutuhkan waktu sekitar 8 minggu. Nematoda dewasa makan hanya dari isi usus halus, tidak dari dalam jaringan. Tahap L3 yang bersifat destruktif, karena berada dalam mukosa sehingga menyebabkan kerusakan jaringan (lesion) (Olsen, 1974).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

##### **3.1.1. Jenis Penelitian**

Pada penelitian ini terdiri dari dua jenis penelitian yaitu penelitian eksploratif dan penelitian laboratorik. Penelitian eksploratif untuk melakukan ekstraksi dan membuat nanopartikel ekstrak Pinus merkusii, sedangkan penelitian laboratorik untuk menguji nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat digunakan sebagai anthelmentik untuk membunuh cacing *Acaridia galli*.

##### **3.1.2. Rancangan penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan ekperimental laboratorik dengan desain True eksperimental Post Test Only Controlled Group Design dimana pengukuran variabel hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan.

#### **3.2. Sampel Penelitian**

Pada penelitian ini menggunakan cacing *Acaridia galli* yang diperoleh dari tempat pemotongan ayam untuk dipakai sebagai sampel penelitian

#### **3.3. Variabel penelitian**

- Variabel bebas : Konsentrasi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii
- Variabel tergantung : Daya anthelmentik terhadap cacing *Ascaridia galli*
- Variabel kendali : Jenis dan ukuran cacing, asal tanaman pinus

#### **3.4. Pembuatan Ekstrak Pinus merkusii**

Ekstrak kulit pohon pinus dibuat dengan cara maserasi. Sebanyak 1000 gram serbuk simplisia kulit pohon pinus direndam dengan larutan etanol 96% p.a sebanyak 4 liter, ditutup dengan aluminium foil selama 5 hari dan setiap hari diaduk. Setelah 5 hari, sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 1 dan ampas 1. Ampas yang ada kemudian ditambah dengan larutan etanol 96% p.a sebanyak 1 liter, ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 2 hari,

sampel tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan ampas 2. Filtrat 1 dan 2 dicampur menjadi satu, lalu dievaporasi menggunakan rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak kulit pohon pinus. Ekstrak kental yang dihasilkan dibiarkan pada suhu ruangan hingga seluruh pelarut etanol menguap. Ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian.

### **3.5. Penapisan Fitokimia Ekstrak Pinus merkusii**

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol Pinus merkusii. Kandungan yang diperiksa adalah golongan alkaloid, flavonoid, kuinon, polifenol, saponin, tanin, triterpenoid, steroid, monoterpenoid dan sesquiterpenoid.

#### **1) Alkaloid**

Serbuk simplisia dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, dan digerus dengan kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian ke dalamnya ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran dikocok dengan kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi atas tiga bagian. Bagian pertama ditambahkan pereaksi *Mayer*. Terjadinya endapan atau kekeruhan diamati, adanya endapan putih menandakan bahwa dalam simplisia terkandung alkaloid. Bagian kedua ditambahkan pereaksi *Dragendorff*. Terjadinya endapan atau kekeruhan diamati, adanya endapan jingga kuning menandakan dalam simplisia terkandung alkaloid (Fransworth, 1966).

#### **2) Flavonoid**

Sejumlah kecil serbuk simplisia dalam tabung reaksi dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N. Campuran dipanaskan di atas penangas air, lalu disaring. Filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok dengan kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Fransworth, 1966).

#### **3) Kuinon**

Sejumlah kecil serbuk simplisia dalam tabung reaksi dipanaskan di atas penangas air, kemudian disaring. Ke dalam filtrat ditambahkan larutan kalium hidroksida 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terbentuknya warna kuning (Fransworth, 1966).

#### **4) Polifenol dan Tanin**

Sejumlah kecil serbuk simplisia dalam tabung reaksi dipanaskan di atas penangas air, kemudian disaring. Kedalam filtrat direaksikan pereaksi besi (III) klorida.. Adanya senyawa fenolat ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru hingga hitam, berarti mengandung tanin dan polifenol. Untuk memastikan adanya tanin, ke dalam filtrat ditambahkan larutan gelatin 1%. Adanya senyawa tanin ditandai dengan terjadinya endapan bewarna putih (Fransworth, 1966).

#### **5) Saponin**

Simplisia dalam tabung reaksi ditambahkan air lalu dipanaskan selama beberapa saat, kemudian disaring. Setelah dingin filtrat dalam tabung reaksi dikocok dengan kuat selama lebih kurang 30 detik. Pembentukan busa sekurang-kurangnya 1 cm dan persisten selama beberapa menit serta tidak hilang pada penambahan 1 tetes asam klorida menunjukkan bahwa dalam simplisia terdapat saponin (Fransworth, 1966).

#### **6) Triterpenoid dan Steroid**

Serbuk simplisia digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Kedalam hasil pengeringan filtrat ditambahkan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan adanya warna hijau biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Fransworth, 1966)

#### **7) Monoterpenoid dan Seskuiterpen**

Serbuk simplisia digerus dengan eter kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Ke dalam hasil pengeringan filtrat ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid (Fransworth, 1966).

### **3.6. Pembuatan dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Pinus merkusii**

Pembuatan nanopartikel ekstrak Pinus merkusii menggunakan metode gelas ionik serta pengecilan ukuran (*sizing*) menggunakan *magnetic stirrer* dengan penambahan emulsifier (tween 80) dan tripolifosfat. Partikel yang terbentuk kemudian dikarakterisasi, meliputi ukuran partikel menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) (Zao *et al.* 2014) dan morfologi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (Fouda *et al.* 2013).

Nano herbal Pinus merkusii dibuat menggunakan metode gelasi ionik, yaitu kompleksasi polielektrolit antara ekstrak Pinus merkusii yang bermuatan positif dengan tripolifosfat yang bermuatan negatif. Larutan ekstrak Pinus merkusii konsentrasi 0,2% dibuat dengan cara melarutkan ekstrak Pinus merkusii kedalam larutan asam asetat 1%, kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 1 jam. Larutan Tripolyphosphate (TPP) konsentrasi 0,1% dibuat dengan cara melarutkan TPP kedalam akuades, kemudian disaring untuk menghilangkan sisa partikel tidak terlarut.

Nano herbal Pinus merkusii dibuat dengan cara: larutan ekstrak Pinus merkusii sebanyak 50 mL dituangkan ke dalam beaker, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan TPP pada pada rasio volume Pinus TPP 5:1 ditambahkan secara perlahan-lahan ke dalam larutan Pinus, sehingga terbentuk suspensi nano-partikel. Pengadukan terus dilanjutkan selama 1 jam agar proses ikatan silang berlangsung sempurna. Suspensi nano-partikel yang terbentuk kemudian dikarakterisasi.

PSA menggunakan sinar tampak yang ditembakkan dan memanfaatkan prinsip penghamburan cahaya tampak . SEM menggunakan elektron dan cahaya tampak sebagai sumber cahayanya. Elektron menghasilkan gelombang yang lebih pendek dibandingkan cahaya foton dengan ukuran 0,1 nm dan menghasilkan gambar dengan resolusi yang lebih baik. Hasil SEM terlihat jelas karena dilakukan pelapisan dengan emas yang bersifat konduktor (Ali and Rajendra, 2011).

### **3.7. Prosedure Penelitian:**

#### **3.7.1 Daya anthelmentik nanopartikel ekstrak Pinus merkusii terhadap cacing *Ascaridia galli***

Pada penelitian ini menggunakan cacing *Ascaridia galli* dewasa sebanyak 70 ekor dibagi menjadi 15 kelompok sebagai berikut :

- Kelompok kontrol : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker tanpa diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii
- Kelompok Perlakuan 1 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 0.0625 %
- Kelompok Perlakuan 2 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 0.125 %

- Kelompok Perlakuan 3 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 0.250 %
- Kelompok Perlakuan 4 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 0.500 %
- Kelompok Perlakuan 5 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 1 %
- Kelompok Perlakuan 5 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 2 %
- Kelompok Perlakuan 5 : *Ascaridia galli* dimasukkan dalam gelas beaker dan diberi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii 4 %

Pengamatan dilakukan pada semua kelompok terhadap kematian cacing 24 jam setelah pemberian berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii. Penelitian yang sama diulang sebanyak 6 kali.

### **3.7.2 Daya hambat Nanopartikel ekstrak Pinus merkusii terhadap enzim asetilkholin esterase pada cacing *Ascaridia galli***

Uji ELISA dilakukan terhadap asetilkholin esterase. Cacing *Ascaridia galli* dari masing-masing kelompok dihomogenisasi pada suhu dingin dengan sodium phosphate buffer 50 mM (pH 7.4) yang mengandung methylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 0.1 mM. Supernatan di[pisahkan dengan sentrifuge dengan 1000 g selama 20 menit pada 4 °C. Supernatan ini digunakan untuk uji ELISA. Sumur pada plat ELISA dilapisi dengan 100 ul supernatan. Plat diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Plat dicuci sebanyak 3 kali dengan 0,15 M NaCl, 0,02 M NaHPO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, pH 7,2 (PBS-T) yang khusus digunakan sebagai larutan pencuci dalam ELISA. Sebanyak 100 ul sampel antibodi yang diencerkan 200 kali yang telah dilarutkan dalam PBS-T ditambahkan ke setiap lubang dari plat yang dibuat duplikat. Plat diinkubasikan selama satu sampai dua jam pada suhu ruangan di atas *shaker*. Plat dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak 100 ul antibodi yang telah dilabel (*Anticholin esterase conjugate HRP*) dimasukkan ke dalam lubang plat dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu ruangan di atas *shaker*, dan ditambahkan substrat peroksidase, ABTS, dan sitrat buffer. Plat dibaca dengan *ELISA Reader* panjang gelombang 415 nm (Yadav *et al.* 2005).

### **3.8. Analisis Data**

Data kematian *Ascaridia galli* yang terkumpul dianalisa dengan uji statistik ANOVA dilanjutkan dengan uji LSD. Juga dilakukan Analisis Multivariat Probit untuk mengetahui *Lethal concentration 50* (LC50).

## BAB IV

### HASIL DAN LUARAN PENELITIAN

#### 4.1 Hasi Penelitian

##### 4.1.1 Hasil Ekstraksi Ekstrak Etanol Daun Pinus merkusii

Ekstraksi etanol daun Pinus merkusii dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, *filtrat* yang didapatkan, selanjutnya diuapkan dengan rotavapor menghasilkan ekstrak pekat berwarna hitam (Gambar 5.1). Daun Pinus merkusii kering dan digiling menjadi serbuk seberat 3 kg menghasilkan ekstrak kental hasil maserasi seberat 48 gram. Rendemen dapat dihitung dari serbuk dan ekstrak kental daun Pinus merkusii yaitu sebesar 1,6 %.



Gambar 4.1 Ekstraksi etanol daun Pinus merkusii

##### 4.1.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstraksi Etanol Daun Pinus merkusii

Pemeriksaan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak ethanol Pinus merkusii dilakukan dengan pengujian terhadap senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, tannin, dan triterpenoid. Hasil penapisan fitokimia rimpang temulawak dapat dilihat pada Tabel 4.1

**Tabel 4.1 Senyawa metabolit sekunder Ekstraksi Etanol Daun Pinus merkusii**

Golongan senyawa	Standar	Hasil analisis	Kesimpulan
Alkaloid	Endapan putih	Ada endapan	+
Steroid	Warna hijau	Warna hijau	+
Triterpenoid	Warna merah/ungu	Warna merah	+++
Phenol	Warna biru	Warna biru	+++
Flavanoid	Merah kekuningan	Kuning	++
Tanin	Biru kehitaman	Biru kehitaman	+++
Saponin	Busa stabil	Busa stabil	++



Hasil penapisan fitokimia menunjukkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang paling banyak terdapat dalam ekstrak etanol daun Pinus merkusii adalah triterpenoid, phenol dan tanin

#### 4.1.3 Hasil Nano Partikel Ekstraksi Etanol Daun Pinus merkusii

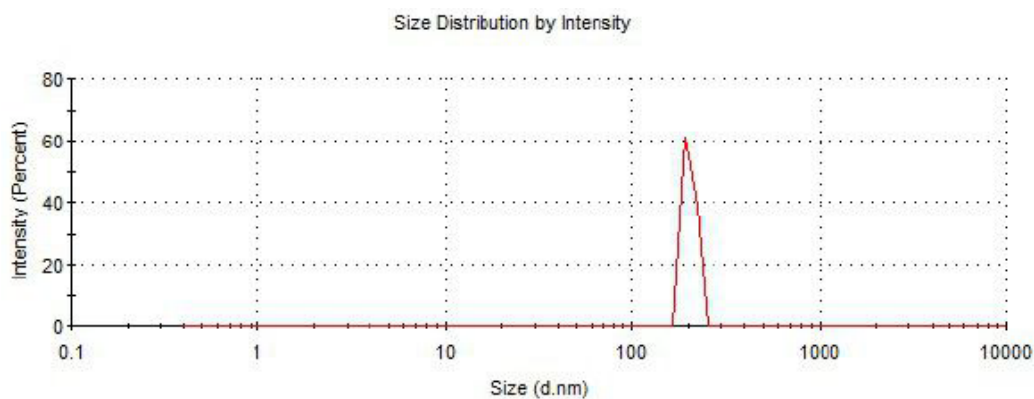
Berdasarkan prosedur kerja yang telah dilakukan, pembuatan nanopartikel ekstrak etanol daun Pinus merkusii menghasilkan warna koloid kuning, sedangkan endapan hasil sentrifuge koloid nanopartikel saat basah berwarna kuning dengan tekstur seperti bubur, dan setelah kering berbentuk gumpalan padat berwarna coklat kekuningan seperti terlihat pada gambar 5.2



Gambar 4.2 nanopartikel ekstrak etanol daun Pinus merkusii

#### 4.1.4 Hasil PSA dan Zeta Sizer Nano partikel Ekstraksi Etanol Daun Pinus merkusii

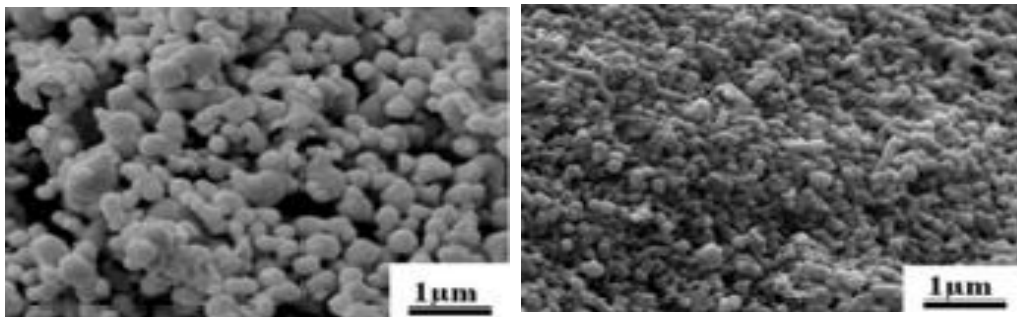
Hasil penelitian menunjukkan sampel dengan ukuran nanopartikel (< 1000 nm) yang paling banyak.. Ukuran nanopartikel sebesar  $201.8 \pm 14.6$  nm adalah sebanyak 92,7% dan ukuran mikropartikel sebanyak 7,3% adalah 1085 nm. Nilai zeta potensial rata-rata adalah 32,2 mV.



Gambar 4.3 Distribusi unuran nanopartikel ekstrak Pinus merkusii.

#### **4.1.5 Hasil SEM (*Scanning Electron Microscopy*) Nano partikel Ekstraksi Etanol Daun Pinus merkusii**

Karakterisasi menggunakan instrumen SEM memiliki tujuan untuk melihat struktur tiga dimensi (morfologi) permukaan nanopartikel dan ukuran partikel tersebut. *Scanning Electron Microscopy* (SEM) memiliki perbesaran 10 - 3.000.000x sehingga dapat secara detail mengetahui struktur nanopartikel yang dihasilkan. Analisis SEM yang telah dilakukan pada Nano partikel ekstrak daun Pinus merkusii dapat dilihat pada Gambar 5.3. Hasil foto SEM dengan pembesaran 2000 x menunjukkan bahwa nanopartikel memiliki bentuk bola dengan permukaan kasar.



Gambar 4.4 SEM (*Scanning Electron Microscopy*) Nano partikel Ekstrak Etanol Daun Pinus merkusii

#### **4.1.6 Daya anthelmentik nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii terhadap *Ascaridia galli***

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii dengan berbagai konsentrasi mampu membunuh cacing *Ascaridia galli*. Daya anthelmentik dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii terhadap cacing *Ascaridia galli* dapat dilihat pada lampiran 1, sedangkan hasil rerata dan simpangan baku dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii sebagai anthelmentik dapat diperlihatkan pada tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Daya anthelmentik dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii terhadap cacing *Ascaridia galli* dalam waktu 24 jam**

Kelompok	Konsentrasi (%)	Kematian <i>Ascaridia galli</i> (%) X ± SD
Kontrol	0	0 <sup>a</sup> ± 0
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K1)	0.0625	10.8 <sup>b</sup> ± 3.7
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K2)	0.125	15.8 <sup>c</sup> ± 3.7
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K3)	0.250	30 <sup>d</sup> ± 4.5
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K4)	0.500	36.7 <sup>e</sup> ± 4.1
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K5)	1	45 <sup>f</sup> ± 4.5
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K6)	2	68.3 <sup>g</sup> ± 5.2
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K7)	4	86.7 <sup>h</sup> ± 4.1

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna

Pada uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok dan pada uji LSD semua nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii berbeda nyata dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii mempunyai kemampuan untuk membunuh cacing *Ascaridia galli*. Daya anthelmintik dari nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii tergantung konsentrasi yang diberikan. Semakin besar konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii yang diberikan semakin besar pula jumlah kematian cacing *Ascaridia galli*.

Hasil analisis probit LC50 nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii adalah dengan konsentrasi 1.38 %. Hasil ini menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii pada konsentrasi 1.38 % mampu membunuh 50 % cacing *Ascaridia galli* pada penelitian.

#### **4.1.7 Daya hambat Nanopartikel ekstrak Pinus merkusii terhadap enzim asetilkholin esterase pada cacing *Ascaridia galli***

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii dengan berbagai konsentrasi juga mampu menghambat enzim asetilkholin esterase pada cacing *Ascaridia galli*. Daya hambat nanopartikel ekstrak Pinus merkusii terhadap enzim asetilkholin esterase pada cacing *Ascaridia galli* dapat dilihat pada lampiran 2, sedangkan hasil rerata dan simpangan baku dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii terhadap enzim asetilkholin esterase 4.3.

**Tabel 4.3. Daya anthelmintik dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii terhadap cacing *Acaridia galli***

Kelompok	Konsentrasi (%)	Kematian <i>Ascaridia galli</i> (%) X ± SD
Kontrol	0	2.80 <sup>a</sup> ± 0.21
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K1)	0.0625	2.67 <sup>a</sup> ± 0.15
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K2)	0.125	2.30 <sup>b</sup> ± 0.20
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K3)	0.250	1.92 <sup>c</sup> ± 0.25
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K4)	0.500	1.57 <sup>d</sup> ± 0.19
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K5)	1	1.05 <sup>e</sup> ± 0.16
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K6)	2	0.75 <sup>f</sup> ± 0.10
Nanopartikel ekstrak P. merkusii (K7)	4	0.42 <sup>g</sup> ± 0.08

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna

Pada uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok dalam menghambat enzim asetilkolin esterase cacing *A. galli*, dan pada uji LSD semua konsentrasi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dalam menghambat enzim asetilkolin esterase berbeda nyata dengan control, kecuali konsentrasi 0.0625 % tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii mempunyai kemampuan untuk menghambat enzim asetilkolin esterase cacing *A. galli*, kecuali konsentrasi 0.0625 %. Semakin besar konsentrasi nanopartikel ekstrak Pinus merkusii yang diberikan semakin kuat pula hambatannya terhadap enzim asetilkolin esterase cacing *A. galli*.

## BAB V

### PEMBAHASAN

Pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) telah lama ditanam di berbagai tempat di Indonesia sebagai tanaman re-boisasi. Beberapa peneliti melaporkan bahwa tanaman pinus juga digunakan sebagai anti bakteri (Apetrei, 2013), anti fungi (Amri et al., 2012), anti viral (Zhang, 2012), anti kanker (Lipovova, 2008), analgesic, anti inflamasi (Kaushik, 2012), larvasidal (Setiawan et al., 2016) dan immunostimulant (Sudjarwo et al., 2018).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii mampu membunuh cacing *Ascaridia galli*. Beberapa peneliti juga membuktikan bahwa tanaman pinus mempunyai efek anthelmentik (obat cacing) yaitu dapat membunuh cacing *Haemonchus contortus* (Tariq and Tantry, 2012), *Fasciola hepatica* (Kaushik et al., 2015) dan *Trichostrongylus colubriformis* (Chan et al., 2011). Hal ini karena tanaman pinus mengandung zat bioaktif antara lain zat pycnogenol,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, bornyl acetate,  $\beta$ -caryophyllene, monoterpene dan limonene (Claude et al., 2014). Telah dilaporkan bahwa senyawa monoterpene dalam *Cymbopogon nardus* (Zaridah et al., 2003), limonene dalam *Citrus sinensis* (Palacios, 2009),  $\beta$ -pinene dan  $\alpha$ -pinene dalam Black pepper (Khani, 2012) mempunyai khasiat sebagai anthelmentik. Semakin besar konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii yang diberikan semakin besar pula jumlah kematian cacing *Ascaridia galli*. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii maka semakin besar pula kandungan senyawa aktifnya sehingga semakin kuat daya anthelmentiknya.

Pada hasil penelitian ini, juga menunjukkan bahwa berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii mampu menghambat enzim asetilkolin esterase cacing *Ascaridia galli*. Hasil ini sesuai dengan laporan dari Bonesi et al., 2010 dan Owokotomo et al., 2015 yang membuktikan bahwa tanaman pinus dapat menghambat enzim asetilkolin esterase. Enzim asetilkolin esterase sangat dibutuhkan untuk pergerakan cacing sehingga hambatan pada enzim asetilkolinesterase dapat menyebabkan kematian cacing, karena cacing mengalami paralisis (kelumpuhan).

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

1. Ekstrak Pinus merkusii dapat dibuat menjadi sediaan nanopartikel dengan metode gelasi ionik
2. Nanopartikel ekstrak Pinus merkusii mempunyai ukuran  $201.8 \pm 14.6$  nm dengan bentuk seperti bola dan permukaannya kasar
3. Nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat membunuh cacing *Ascaridia galli*
4. LC50 (Lethal Concentration 50) nanopartikel ekstrak Pinus merkusii adalah 1.38 %
5. Nanopartikel ekstrak Pinus merkusii dapat menghambat enzim asetilkolin esterase pada cacing *Ascaridia galli*.

#### **6.2. Saran**

1. Perlu dibandingkan dengan piperazine yang merupakan obat cacing standard untuk untuk membunuh cacing *Ascaridia galli*
2. Perlu di uji khasiat anthelmentiknya terhadap species cacing yang lain

## DAFTAR PUSTAKA

1. Abi-Ayada M, Abi-Ayada FZ, Lazzounia HA, Rebiahi SA (2011) Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria(Tlemcen). *J Nat Prod Plant Resour* 1 (1): 33-36
2. Atun S, Handayani S (2017). Synthesis of Nanoparticles Produced by Ethanol Extract of *Boesenbergia rotunda* Rhizome Loaded with Chitosan and Alginic Acid and its Biological Activity test. *Pharmacogn J* 9(2): 142-147
3. Cragg GM, Newman DJ (2013) Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads *Biochim Biophys Acta* 1830(6):3670-95.
4. Bonesi M, Menichini F, Tundis R, Menichini F. (2010). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *J Enzyme Inhibition Med Chem*, 25(5): 622–628
5. Chan J, Waghorn G.C, Molan A.L. (2011). Effect of condensed tannins from *Pinus radiata* bark on *Trichostrongylus colubriformis* larvae and adult worms in sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 71: 304-308
6. Ince I, Yesil-Celiktas O, Karabay-Yavasoglu NU, Elgin G (2009) Effects of *Pinus brutia* bark extract and Pycnogenol in a rat model of carrageenan induced inflammation. *Phytomed* 16: 1101-1104.
7. Ku CS, Mun SP (2007) Characterization of proanthocyanidin in hot water extract isolated from *Pinus radiata* bark. *Wood Sci Technol* 41:235-247.
8. Kim NY, Jang MK, Lee DG, Yu KH, Jang HJ, Lee SH (2014) Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts. *Nutr Res Pract* 4(1):16-22
9. Li YY, Feng J, Zhang XL, Cui YY (2015) Pine Bark Extracts: Nutraceutical, Pharmacological, and Toxicological Evaluation. *J Pharmacol Exp Ther* 353: 9-16
10. Margono SS, Suroso T, Wandura T, Ito A. Challenges for Control of Taeniasis/Cysticercosis in Indonesia. *Parasitol Int*. 2005; 55 Suppl:S161-5.
11. Oktavianto RR. Uji Daya Anthelmintik Infusa Bawang Putih (*Allium Sativum* Linn.) Terhadap Cacing Gelang Babi (*Ascaris suum*) secara in vitro. Tugas Akhir. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah. 2009.
12. Owokotomo I.A, Ekundayo O, Chukwuka A.W. (2015) Invitro anticholinesterase activity of essential oil from tropical medicinal plant. *Toxicology repot*, 850-857

13. Park IJ, Cha SY, Kang M, So YS, Mun SP, Ryu KS, Jang HK (2011) Effect of proanthocyanidin-rich extract from *Pinus radiata* bark on immune response of specific-pathogen-free White Leghorn chickens. *Poultry Sci* 90: 977-982
14. Saini R, Saini S, Sharma S (2010) Nanotechnology: The Future Medicine. *J Cutan Aesthet Surg* 3: 32-33.
15. Setiawan, Koerniasari, Ngadino, Sudjarwo SA. Bioinsecticide Effect of *Pinus merkusii* Tree Bark Extract on *Aedes aegypti* larvae. *J Young Pharm*, 2017; 9(1): 1-1
16. Sudjarwo SA, Wardani G, Eraiko K, Koerniasari. The Potency of nanoparticle of *Pinus merkusii* as immunostimulatory on male wistar albino rat. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* 2018;8:10-15
17. Kumari A, Kumar V (2012) Nanotechnology: a tool to enhance therapeutic values of natural plant products. *Trends Med Res* 7(2): 34-42.
18. Nalue AS, Mbaria JM, and Kimenju JW. In Vitro Anthelmintic Potensial and Phytochemical Compositition of Ethanolic and Aquos Crude Exstracts of *Zantholium chalibeun* Engl. *African journal of pharmacy and pharmacology*. 2013; 7(23):605-1614.
19. Syaefudin, Juniarti A, Rosiyana L, Setyani A, Khodijah S (2016) Nanoparticles of *Selaginella doederleinii* leaf extract inhibit human lung cancer cells A549. *Earth Environmental Sci* 31: 1-5
20. Rahman TU, Uddin G, Khattak KF, Liaqat W, Choudhary MI (2016) Antibacterial, antifungal, insecticidal and phytotoxic activities of leaves of *Pinus wallichiana*. *J Chem Pharmaceutic Res* 8(1):420-424
21. Qadir M, Shah WA (2014) GC-MS Analysis, antibacterial, antioxidant and anticancer activity of essential oil of *Pinus roxburghii* from Kashmir India. *Inter J Res Pharm Chem* 4(1), 228-232



Lampran 1. Daya anthelmintik dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii terhadap cacing *Acaridia galli*

Kelompok	Konsentrasi (%)	Kematian Cacing <i>A. galli</i> (%)						X ± SD
		1	2	3	4	5	6	
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0
Nanopartikel ekstrak daun <i>P. merkusii</i>	0.0625	10	5	15	10	15	10	10.8 ± 3.7
	0.125	20	15	15	15	20	10	15.8 ± 3.7
	0.250	35	30	25	25	35	30	30 ± 4.5
	0.500	40	35	30	40	35	40	36.7 ± 4.1
	1	45	40	50	40	50	45	45 ± 4.5
	2	60	65	70	70	70	75	68.3 ± 5.2
	4	85	90	90	80	90	85	86.7 ± 4.1

Lampran 2. Hasil uji ANOVA dari daya anthelmintik dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii terhadap cacing *Acaridia galli*

**ANOVA**

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36375.000	7	5196.429	323.933	.000
Within Groups	641.667	40	16.042		
Total	37016.667	47			

**Multiple Comparisons**

Data

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	K0.0625	-10.83333*	2.31241	.000	-15.5069	-6.1598
	K0.125	-15.83333*	2.31241	.000	-20.5069	-11.1598
	K0.250	-30.00000*	2.31241	.000	-34.6735	-25.3265
	K0.500	-36.66667*	2.31241	.000	-41.3402	-31.9931
	K1	-45.00000*	2.31241	.000	-49.6735	-40.3265

	K2	-68.33333*	2.31241	.000	-73.0069	-63.6598
	K4	-86.66667*	2.31241	.000	-91.3402	-81.9931
K0.0625	Kontrol	10.83333*	2.31241	.000	6.1598	15.5069
	K0.125	-5.00000*	2.31241	.037	-9.6735	-.3265
	K0.250	-19.16667*	2.31241	.000	-23.8402	-14.4931
	K0.500	-25.83333*	2.31241	.000	-30.5069	-21.1598
	K1	-34.16667*	2.31241	.000	-38.8402	-29.4931
	K2	-57.50000*	2.31241	.000	-62.1735	-52.8265
	K4	-75.83333*	2.31241	.000	-80.5069	-71.1598
K0.125	Kontrol	15.83333*	2.31241	.000	11.1598	20.5069
	K0.0625	5.00000*	2.31241	.037	.3265	9.6735
	K0.250	-14.16667*	2.31241	.000	-18.8402	-9.4931
	K0.500	-20.83333*	2.31241	.000	-25.5069	-16.1598
	K1	-29.16667*	2.31241	.000	-33.8402	-24.4931
	K2	-52.50000*	2.31241	.000	-57.1735	-47.8265
	K4	-70.83333*	2.31241	.000	-75.5069	-66.1598
K0.250	Kontrol	30.00000*	2.31241	.000	25.3265	34.6735
	K0.0625	19.16667*	2.31241	.000	14.4931	23.8402
	K0.125	14.16667*	2.31241	.000	9.4931	18.8402
	K0.500	-6.66667*	2.31241	.006	-11.3402	-1.9931
	K1	-15.00000*	2.31241	.000	-19.6735	-10.3265
	K2	-38.33333*	2.31241	.000	-43.0069	-33.6598
	K4	-56.66667*	2.31241	.000	-61.3402	-51.9931
K0.500	Kontrol	36.66667*	2.31241	.000	31.9931	41.3402
	K0.0625	25.83333*	2.31241	.000	21.1598	30.5069
	K0.125	20.83333*	2.31241	.000	16.1598	25.5069
	K0.250	6.66667*	2.31241	.006	1.9931	11.3402
	K1	-8.33333*	2.31241	.001	-13.0069	-3.6598
	K2	-31.66667*	2.31241	.000	-36.3402	-26.9931
	K4	-50.00000*	2.31241	.000	-54.6735	-45.3265
K1	Kontrol	45.00000*	2.31241	.000	40.3265	49.6735
	K0.0625	34.16667*	2.31241	.000	29.4931	38.8402

	K0.125	29.16667*	2.31241	.000	24.4931	33.8402
	K0.250	15.00000*	2.31241	.000	10.3265	19.6735
	K0.500	8.33333*	2.31241	.001	3.6598	13.0069
	K2	-23.33333*	2.31241	.000	-28.0069	-18.6598
	K4	-41.66667*	2.31241	.000	-46.3402	-36.9931
K2	Kontrol	68.33333*	2.31241	.000	63.6598	73.0069
	K0.0625	57.50000*	2.31241	.000	52.8265	62.1735
	K0.125	52.50000*	2.31241	.000	47.8265	57.1735
	K0.250	38.33333*	2.31241	.000	33.6598	43.0069
	K0.500	31.66667*	2.31241	.000	26.9931	36.3402
	K1	23.33333*	2.31241	.000	18.6598	28.0069
	K4	-18.33333*	2.31241	.000	-23.0069	-13.6598
K4	Kontrol	86.66667*	2.31241	.000	81.9931	91.3402
	K0.0625	75.83333*	2.31241	.000	71.1598	80.5069
	K0.125	70.83333*	2.31241	.000	66.1598	75.5069
	K0.250	56.66667*	2.31241	.000	51.9931	61.3402
	K0.500	50.00000*	2.31241	.000	45.3265	54.6735
	K1	41.66667*	2.31241	.000	36.9931	46.3402
	K2	18.33333*	2.31241	.000	13.6598	23.0069

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lambran 3. Daya hambatan terhadap enzim asetilkholin esterase dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii pada cacing *Acaridia galli*

Kelompok	Konsentrasi (%)	Kadar Astilkholin esterase ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )						X $\pm$ SD
		1	2	3	4	5	6	
Kontrol	0	2.9	2.5	2.7	2.7	2.9	3.1	2.80 $\pm$ 0.21
Nanopartikel ekstrak daun <i>P.merkusii</i>	0.0625	2.8	2.4	2.6	2.7	2.8	2.7	2.67 $\pm$ 0.15
	0.125	2.1	2.2	2.4	2.1	2.6	2.4	2.30 $\pm$ 0.20
	0.250	1.8	1.6	2.1	2.3	1.9	1.8	1.92 $\pm$ 0.25
	0.500	1.6	1.4	1.7	1.3	1.8	1.6	1.57 $\pm$ 0.19
	1	1.2	0.9	1.1	0.8	1.2	1.1	1.05 $\pm$ 0.16
	2	0.8	0.7	0.8	0.6	0.9	0.7	0.75 $\pm$ 0.10
	4	0.5	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4	0.42 $\pm$ 0.08

Lampran 4. Hasil uji ANOVA dari daya hambatan terhadap enzim asetilkholin esterase dari berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak daun Pinus merkusii pada cacing *Acaridia galli*

### ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.233	7	4.748	153.977	.000
Within Groups	1.233	40	.031		
Total	34.467	47			

### Multiple Comparisons

Data

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	K0.0625	.13333	.10138	.196	-.0716	.3382
	K0.125	.50000*	.10138	.000	.2951	.7049
	K0.250	.88333*	.10138	.000	.6784	1.0882
	K0.500	1.23333*	.10138	.000	1.0284	1.4382
	K1	1.75000*	.10138	.000	1.5451	1.9549
	K2	2.05000*	.10138	.000	1.8451	2.2549
	K4	2.38333*	.10138	.000	2.1784	2.5882
K0.0625	Kontrol	-.13333	.10138	.196	-.3382	.0716
	K0.125	.36667*	.10138	.001	.1618	.5716
	K0.250	.75000*	.10138	.000	.5451	.9549
	K0.500	1.10000*	.10138	.000	.8951	1.3049
	K1	1.61667*	.10138	.000	1.4118	1.8216
	K2	1.91667*	.10138	.000	1.7118	2.1216
	K4	2.25000*	.10138	.000	2.0451	2.4549
K0.125	Kontrol	-.50000*	.10138	.000	-.7049	-.2951
	K0.0625	-.36667*	.10138	.001	-.5716	-.1618
	K0.250	.38333*	.10138	.001	.1784	.5882

	K0.500	.73333*	.10138	.000	.5284	.9382
	K1	1.25000*	.10138	.000	1.0451	1.4549
	K2	1.55000*	.10138	.000	1.3451	1.7549
	K4	1.88333*	.10138	.000	1.6784	2.0882
K0.250	Kontrol	-.88333*	.10138	.000	-1.0882	-.6784
	K0.0625	-.75000*	.10138	.000	-.9549	-.5451
	K0.125	-.38333*	.10138	.001	-.5882	-.1784
	K0.500	.35000*	.10138	.001	.1451	.5549
	K1	.86667*	.10138	.000	.6618	1.0716
	K2	1.16667*	.10138	.000	.9618	1.3716
	K4	1.50000*	.10138	.000	1.2951	1.7049
K0.500	Kontrol	-1.23333*	.10138	.000	-1.4382	-1.0284
	K0.0625	-1.10000*	.10138	.000	-1.3049	-.8951
	K0.125	-.73333*	.10138	.000	-.9382	-.5284
	K0.250	-.35000*	.10138	.001	-.5549	-.1451
	K1	.51667*	.10138	.000	.3118	.7216
	K2	.81667*	.10138	.000	.6118	1.0216
	K4	1.15000*	.10138	.000	.9451	1.3549
K1	Kontrol	-1.75000*	.10138	.000	-1.9549	-1.5451
	K0.0625	-1.61667*	.10138	.000	-1.8216	-1.4118
	K0.125	-1.25000*	.10138	.000	-1.4549	-1.0451
	K0.250	-.86667*	.10138	.000	-1.0716	-.6618
	K0.500	-.51667*	.10138	.000	-.7216	-.3118
	K2	.30000*	.10138	.005	.0951	.5049
	K4	.63333*	.10138	.000	.4284	.8382
K2	Kontrol	-2.05000*	.10138	.000	-2.2549	-1.8451
	K0.0625	-1.91667*	.10138	.000	-2.1216	-1.7118
	K0.125	-1.55000*	.10138	.000	-1.7549	-1.3451
	K0.250	-1.16667*	.10138	.000	-1.3716	-.9618
	K0.500	-.81667*	.10138	.000	-1.0216	-.6118
	K1	-.30000*	.10138	.005	-.5049	-.0951
	K4	.33333*	.10138	.002	.1284	.5382

K4	Kontrol	-2.38333*	.10138	.000	-2.5882	-2.1784
	K0.0625	-2.25000*	.10138	.000	-2.4549	-2.0451
	K0.125	-1.88333*	.10138	.000	-2.0882	-1.6784
	K0.250	-1.50000*	.10138	.000	-1.7049	-1.2951
	K0.500	-1.15000*	.10138	.000	-1.3549	-.9451
	K1	-.63333*	.10138	.000	-.8382	-.4284
	K2	-.33333*	.10138	.002	-.5382	-.1284

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.