

BAB.V. PEMBAHASAN.

Pada uji daya antelmintik digunakan cacing *Ascaridia galli* Schrank, karena selain lazim digunakan, mudah diperoleh, juga dianjurkan digunakan pada penelitian uji obat untuk askariasis dengan ayam sebagai binatang laboratorium (Duwel, 1975) karena mudah pengerjaannya. Uji *in vitro* digunakan metoda rendam (Lamson, 1935) dimodifikasi pada media dan cara penentuan kematian cacing. Berbeda dengan Lamson (1935) daya antelmintik diukur dengan potensi relatif terhadap piperasin sitrat, suatu ukuran yang lebih tajam dari pada ukuran berdasar jam kematian cacing. Media digunakan glukosa salin 5%, dan telah dibuktikan dalam penelitian ini, lebih baik dari pada air suling dan larutan NaCl 0,9% dalam hal ketahanan hidup cacing didalamnya. Glukosa salin 5% sesuai sebagai media penyimpan dan uji, selain isotonik juga mengandung glukosa. Tonisitas media yang sesuai dengan tonisitas hemolymph cacing perlu diperhatikan dalam menentukan media (Lamson, 1935). Sedangkan glukosa akan meningkatkan daya tahan cacing (Fairbairn, 1957) karena glukosa merupakan bahan baku biosintesa glikogen, disamping fruktosa, maltosa dan sukrosa. Dalam uji *in vitro* ini, efektifitas antelmintik diukur secara fisik, dengan motilitas cacing sebagai dasar kriteria kematian.

Berbeda dengan cara Lamson (1935), kematian cacing dalam penelitian ini dideteksi dengan cara mekanik dengan sentuhan pada bagian kepala (bagian sensitif) sehingga cenderung tidak mempengaruhi kondisi cacing.

Hasil analisis fitokimia pendahuluan dan pematapan ditemukan minyak atsiri dan senyawa berwarna kuning diantaranya kurkumin sebagai kandungan utama rimpang, sesuai dengan hasil penelitian Cassey *et al* (1972) dan Lawrence *et al* (1970). Sebagai tambahan dalam penelitian ini ditemukan senyawa golongan flavonoid, diantaranya cenderung ditemukan senyawa golongan isoflavan.

Pada identifikasi minyak atsiri hasil penelitian ini (diperoleh dengan cara destilasi air ekstrak kental PE) ternyata diperoleh beberapa hasil tetapan alami yang sesuai dengan hasil peneliti sebelumnya (Cassey, *et al*, 1972; Lawrence *et al.*, 1970); walaupun berbeda tempat tumbuh tanaman dan proses isolasinya. Perbandingan hasil analisis KGC minyak atsiri hasil penelitian dengan hasil analisis beberapa peneliti sebelumnya (Cassey *et al.*, 1972; Lawrence *et al.*, 1970) menunjukkan kesesuaian kandungan komponen utama yaitu sabinen dan terpinen-4-ol disamping perbedaan jumlah komponen hasil analisis. Pada penelitian ini ditemukan kurang lebih 42 komponen, dengan beberapa komponen dalam kadar cukup tinggi yaitu sabinen (21,26%), terpinen-4-ol (37,20%), seskuifelandren (6,70%), trans-1-(3,4-dimetoksifenil)-but-1-en (7,59%) dan trans-1-(3,4-dimetoksifenil)-but-1,3-dien (15,11%).

Komponen zingiberen, seskuifelandren, beta bisabolen dan 3,4-dimetoksi-benzaldehida yang belum ditemukan pada peneliti sebelumnya (Cassey *et al.*, 1972; Lawrence *et al.*, 1970). Perbedaan hasil analisis ini cenderung disebabkan perbedaan tempat tumbuh tanaman asal, macam, panjang kolom dan program operasi KGC.

Dari perbandingan kromatogram minyak atsiri dengan kolom kapiler FFAP 85m X 0,5mm dan dengan kolom OV-17 2% 3m, dikuatkan dengan perbandingan Rt senyawa baku beberapa komponen, cenderung dapat dikatakan bahwa puncak 3, 6, 7 9, 10, 14 dan 20 pada kromatogram hasil pemisahan kolom OV-17 adalah sabinen, limonen, gamma-terpinen, parasimen, terpinen-4-ol dan zingiberen (Gambar IV.B.1, IV.B.2 dan Lampiran 17).

Pada uji daya antelmintik *in vitro* ekstrak, residu minyak atsiri dan fraksi digunakan sediaan emulsi gom arab dalam larutan glukosa salin 5%. Ditentukan serbuk gom arab 200 mg% dalam sediaan emulsi setelah dilakukan uji serbuk gom arab, tragakan dan polisorbat terhadap ketahanan hidup cacing (Tabel IV.C.1. dan IV.C.2). Daya tahan hidup cacing lebih pendek dalam larutan polisorbat 80, cenderung disebabkan salah satu sifat larutan surfaktan yaitu menaikkan tekanan osmotik dari larutan, sebab pembentukan misel; jika tingkat tekanan osmotik larutan tidak sesuai dengan tekanan osmotik hemolymph cacing, akan mempengaruhi kondisi cacing tersebut. Hal ini tidak terdapat pada emuls serbuk gom arab yang merupakan

larutan benar dalam golongan liofil dispers yang hidrofil. Hanya kekentalan emuls serbuk gom arab cenderung mengganggu pelepasan fasa dispers.

Hasil uji antelmintik *in vitro* diketahui potensi relatif ekstrak PE > ekstrak MeOH, juga potensi relatif minyak atsiri > ekstrak PE, memperkuat perkiraan senyawa dengan daya antelmintik terutama terdapat dalam minyak atsiri, sehingga penelitian diarahkan kepada minyak atsiri dan komponennya.

Berdasar atas:

1. Kadar yang cukup tinggi dari sabinen dan terpinen-4-ol dalam minyak atsiri yang diteliti.
2. Telah ada metoda yang mantap untuk pemisahan golongan hidrokarbon dan hidrokarbon teroksigenasi (Ikan, 1969; Scheffer *et al.*, 1976a; Scheffer *et al.*, 1977).
3. Kualitas bioaktifitas yang berbeda antara golongan hidrokarbon dan hidrokarbon teroksigenasi (Janssen *et al.*, 1984).
4. Radas yang tersedia.
5. Kebutuhan jumlah cukup besar akan fraksi untuk uji antelmintik *in vitro* dan *in vivo*.

maka penelitian diarahkan untuk pemisahan fraksi sabinen dan terpinen-4-ol dari minyak atsiri. Dalam usaha ini akan dilakukan pemisahan secara destilasi fraksi dengan pengurangan tekanan, dilanjutkan dengan pemisahan secara KK preparatif untuk memisahkan fraksi hidrokarbon dan hidrokarbon teroksigenasi.

Walaupun destilasi merupakan cara yang kurang disarankan pada fraksinasi komponen minyak atsiri, tetapi dengan usaha pengurangan tekanan akan dapat dihindari dampak yang kurang baik yang dapat terjadi.

Dengan menggunakan hasil analisis komponen minyak atsiri dengan cara KGC (Tabel IV.B.7.) sebagai dasar pembahasan, maka dapat diperkirakan sebagai berikut:

Jika sabinen terdapat dalam kadar 21,26% pada hasil destilasi air ekstrak PE, maka diperkirakan sabinen (t.d. 161° - 165° C) akan merupakan komponen utama dalam fraksi destilasi dengan tekanan 35mm Hg pada suhu 40° - 60° C (fraksi permulaan); sedang terpinen-4-ol (t.d. 209° - 212° C dan t.d. 10. 86° - 87° C) baru mulai terdapat pada fraksi 70° C keatas. Jika terjadi pencemaran terpinen-4-ol, trans-menth-2-ene-1-ol, cis-menth-2-ene-1-ol pada fraksi sabinen mudah dipisahkan dengan metoda KK pada kolom silikagel dan eluen heksan, heksan:dietil-eter(1:1) dan dietil-eter, atau eluen/campuran eluen lain dengan polaritas yang menaik seperti etil-asetat atau diklormetan; dapat pula dilakukan prafraksinasi ulang pada fraksi sabinen dengan tekanan yang lebih rendah yaitu 10 mm Hg pada suhu 35° - 45° C.

Diperkirakan sulit untuk memisahkan sabinen dari pinen, mirsen, alfa-terpinen, b-felandren, gamma-terpinen dan para-simen dengan metoda KK, sehingga fraksinasi secara KK untuk memperoleh kadar sabinen yang lebih tinggi dalam jumlah besar masih diragukan akan berhasil.

da cara pemeriksaan jumlah EPG dalam tinja yang dikumpulkan dalam 1 hari dan yang dikumpulkan pada periode berlainan dalam 1 hari; hal ini cenderung disebabkan variasi jumlah dan jenis kelamin cacing, siklus bertelur dan *sexual maturity* yang berlainan, sebagai akibat variasi waktu menetas yang disebabkan perbedaan tingkat infektivitas dari telur yang diinfeksi.

Kenyataan-kenyataan diatas dipakai sebagai dasar dalam usaha untuk mengendalikan variabel -variabel dalam uji antelmintik *in vivo* secara Penurunan Jumlah Telur.

Walaupun telah dicoba untuk mengendalikan beberapa variabel, hasil EPG masih tetap sangat bervariasi (Lampiran 29), sehingga dicoba diatasi dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap kovariat tunggal dan Rancangan *split plot* pada hasil pemeriksaan EPG pada periode tertentu, untuk memperoleh informasi yang lebih banyak dan masih berkaitan data yang ada.

Dengan hasil analisis kovarian dan varian dapat ditunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian Fraksi terpinen-4-ol 300 mg merupakan memberikan respon yang diharapkan. Dengan penaikan pemberian dosis akan lebih dapat jelas diketahui respon obat yang bersangkutan (Lampiran 30 dan Gambar IV.E.2.). Dengan dasar ini maka pada uji antelmintik *in vivo* metoda Uji Terkontrol, pemberian dosis ditingkatkan menjadi masing-masing 300 dan 500 mg per ayam. Analisis varian jumlah penurunan cacing dalam usus ayam pasca mati pada ayam perlakuan terhadap kontrol di-

lanjutkan uji beda rerata beda rerata penurunan jumlah cacing pada ayam perlakuan, dengan pemberian minyak atsiri, Fraksi sabinen dan terpinen-4-ol masing-masing 300 mg dan 500 mg per ayam, piperasin sitrat 100 mg per ayam dan larutan glukosa salin 5%, 5 ml per ayam, menunjukkan daya mematikan cacing terkuat pada Fraksi terpinen-4-ol, diikuti minyak atsiri dan Fraksi sabinen (Tabel IV.E.7. dan IV.E.8.). Jika diperhitungkan prosentase jumlah cacing mati dalam usus pasca perlakuan dengan masing-masing 500mg Fraksi terpinen-4-ol, minyak atsiri dan Fraksi sabinen diperoleh berturut-turut 87,40%, 80,10% dan 62,00%.

Dari beberapa metoda uji yang telah dilakukan terdapat kesesuaian antara hasil daya antelmintik Fraksi terpinen-4-ol, minyak atsiri dan sabinen, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan Uji Penurunan Jumlah Telur dan Uji Terkontrol. Pada uji *in vivo* metoda Penurunan Jumlah Telur, terdapat banyak variabel yang sukar dikendalikan. Pada metoda Uji Terkontrol variabel tidak begitu banyak. Sehingga sesuai dengan tujuan penelitian daya antelmintik, maka lebih tepat digunakan metoda Uji Terkontrol.

dengan fraksinasi kolom, dapat dipisahkan Fraksi sabinen dengan kadar 84,11% dan Fraksi terpinen-4-ol dengan kadar 92,23% dari minyak atsiri rimpang *Z. purpureum*. Kecenderungan Fraksi sabinen tanpa senyawa teroksigenasi diperlihatkan pada analisis spektra IR (Gambar IV.D.9); sabinen dan p-simen merupakan komponen diantara komponen fraksi tersebut (Gambar IV.D.10. dan IV.D.12.). Sedangkan terpinen-4-ol dapat dideteksi dalam Fraksi terpinen-4-ol (Gambar IV.D.14.).

Dari hasil uji *in vitro* dengan membandingkan potensi relatif terhadap piperasin sitrat, diketahui bahwa daya antelmintik terkuat berturut-turut terdapat pada Fraksi terpinen-4-ol, minyak atsiri dan Fraksi sabinen. Uji antelmintik *in vivo* dilakukan terhadap ketiganya sebagai uji pemantapan.

Dari orientasi penentuan waktu dan cara pemantauan EPG pada kelompok ayam terinfeksi (Lampiran 27) dapat dibahas dan disimpulkan sebagai berikut:
Pada penginfeksian dengan telur infektif banyaknya telur tidak berbanding searah dengan banyaknya cacing yang menetas. Pada penelitian ini ditetapkan penginfeksian dengan telur infektif sebanyak 250 telur. Rata-rata menetas 5 -20%. Faktor terutama pada penelitian ini cenderung disebabkan *strain* ayam, umur pada waktu penginfeksian dan ransum. Pada minggu ke 6 dan 7 pasca penginfeksian baru terlihat jumlah EPG yang mantap pada pemeriksaan tinja. Tidak terdapat perbedaan dalam variasi EPG pa-

Sangat sukar memisahkan terpinen-4-ol dari cis dan trans - menth-2-ene-1-ol yang merupakan senyawa isomer dengan metoda KK.

Pemisahan terpinen-4-ol dari trans-1-(3,4-dimetoksi-fenil) but-1-en dan trans-1-(3,4-dimetoksi-fenil)but-1,3-dien dapat dilakukan dengan eluen dengan polaritas sedang.

Prafraksinasi minyak rimpang *Zingiber purpureum* pada suhu 65° - 75° C (35 mm Hg) menghasilkan 34,64 g fraksi sabinen, dengan kadar sabinen \pm 65-75% dan 52,74 g residu. Sedang prafraksinasi ulang 34 g fraksi sabinen pada suhu 35° - 45° C (10 mm Hg) menghasilkan 17,85g fraksi sabinen dengan kadar 84,11%.

Prafraksinasi 50 g residu pada $62,5^{\circ}$ - $70,0^{\circ}$ C (10 mm Hg) menghasilkan 33,22 g fraksi terpinen-4-ol dengan kadar 65-80%. Destilat yang keluar pada suhu diatas $70,0^{\circ}$ yang tentunya berisi sebagian besar komponen minyak atsiri dengan titik didih yang lebih tinggi, ditinggalkan karena terjadi perubahan warna ketuaan, yang mungkin disebabkan terjadinya proses polimerisasi atau lainnya.

Sedang fraksinasi kolom selanjutnya dari 30 g fraksi II, diperoleh 620 ml fraksi ke-40 sampai dengan 50, dan setelah dipekatkan diperoleh fraksi terpinen-4-ol dengan bobot 16,87 g dengan kadar 92,23%. (Tabel IV.D.4.). Dengan prafraksinasi secara destilasi fraksi dengan pengurangan tekanan, prafraksinasi ulang dan dilanjutkan