

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan penelitian *post test controlled group design*.

4.2. Lokasi penelitian

Daun kumis kucing yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian ini didapatkan langsung dari Bangkalan, Madura. Sedangkan proses ekstraksi dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

Penelitian uji daya anthelmintik ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) sebagai anthelmintik terhadap cacing *Ascaris suum* secara *in vitro* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Sampel Penelitian

Cacing *Ascaris suum* sebagai sampel penelitian ini diperoleh dari usus babi di Rumah Pemotongan Hewan di kecamatan Gadang, Kabupaten Malang.

1. Kriteria inklusi :

1. Cacing dewasa
2. Masih hidup
3. Tidak cacat

2. Kriteria eksklusi :

1. Cacing sudah mati sebelum perlakuan

4.4. Metode Pengambilan Sampel

Jumlah pengulangan yang akan dilakukan adalah :

Dengan rumus : (Tjokronegoro, 2001)

$$p(n-1) \geq 16$$

$$5(n-1) \geq 16$$

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$$n \approx 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok coba

n = jumlah pengulangan

Jadi, jumlah pengulangan yang akan diperlukan untuk penelitian ini minimal adalah 4 kali pengulangan. Sedangkan jumlah sampel minimal setiap satu cawan petri ditetapkan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$.

Keterangan :

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

karena penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka :

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75 \text{ (Hanafiah, 2001)}$$

Sehingga perlakuan membutuhkan 5 ekor cacing untuk satu cawan petri, maka setiap kali percobaan membutuhkan 3 kali perlakuan dan 1 kontrol negatif serta 1 kontrol positif sehingga berjumlah 100 ekor dan dilihat pengaruhnya pada jam ke- 1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8, ke-9, ke-10, ke-11 dan jam ke-24.

4.5. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : ekstrak etanol daun kumis kucing dengan konsentrasi 20%, 30%, dan 40%.
2. Variabel terikat : cacing *Ascaris suum* yang mati

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

1. Peralatan penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : cawan petri diameter 10 cm, batang pengaduk kaca, pinset, gelas ukur, labu ukur, spuit 10cc, timbangan, inkubator thermo CO₂, laminar flow dll.

2. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kumis kucing konsentrasi 20%, 30%, 40%; NaCl 0.9%; Pirantel Pamoat 1% dan cacing *Ascaris suum*.

4.7. Definisi Operasional

1. ekstrak etanol daun kumis kucing

Adalah ekstrak yang terbuat dari daun kumis kucing yang di ekstraksi dengan metode maserasi, yaitu dengan direndam menggunakan etanol selama periode waktu tertentu. Langkah kerjanya adalah merendam bahan dalam suatu wadah menggunakan pelarut tertentu selama beberapa hari sambil sesekali diaduk, lalu disaring dan diambil larutannya.

2. kontrol negatif

adalah kelompok kontrol tanpa perlakuan. Dari kelompok kontrol negatif dapat dihasilkan suatu baseline sehingga perubahan pada variabel tergantung dapat terlihat. NaCl 0.9% pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol negatif karena sifatnya isotonis dan tidak merusak membrane sel cacing (Kuntari, 2008).

3. kontrol positif

adalah kelompok perlakuan yang besar kemungkinannya menghasilkan efek atau perubahan pada variabel tergantung. Pirantel pamoat digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena pirantel pamoat menimbulkan depolarisasi pada otot cacing dan meningkatkan frekuensi impuls, sehingga cacing mati dalam keadaan spastis (Syarif *et al.*, 2009).

4.kematian cacing *Ascaris suum*

Adalah cacing *Ascaris suum* yang mati dengan parameternya tidak adanya respon gerakan ketika disentuh dengan lidi dan kemudian tidak adanya respon saat dimasukan pada air denga suhu 50° C. Pengamatan dilakukan tiap 1 jam (Budiyanti, 2010). Penggunaan waktu 24 jam sebagai batas akhir pengamatan berdasarkan obat anthelmintik saat ini durasi kerjanya 24 jam (Gunawan, 2007)

5.Lethal Concentrasi 100 (LC100)

adalah konsentrasi yang diperlukan untuk dapat membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (IUPAC, 2003).

6.Lethal Time 100 (LT100)

adalah waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 100% jumlah cacing pada konsentrasi tertentu (IUPAC, 2003). Pada penelitian ini,

LT100 digunakan untuk membandingkan efektivitas ekstrak etanol daun kumis kucing dengan pirantel pamoat.

4.8 Prosedur Penelitian

1. Proses Ekstraksi Etanol Daun Kumis Kucing

Metode pengeringan yang digunakan, yaitu dengan sinar matahari dan oven bertujuan untuk meningkatkan daya simpan produk. Pengeringan dilakukan setelah satu hari sebelumnya daun kumis kucing diangin anginkan, hal ini dimaksudkan untuk menutup stomata daunnya sehingga tidak terjadi penguapan zat-zat yang terkandung di dalamnya (Mahendra dan Kusuma, 2005). Pada hari selanjutnya, daun kumis kucing bisa dijemur di bawah sinar matahari langsung dan untuk pengeringan oven dilakukan pada suhu 40-50° C. Daun kumis kucing dihindarkan pada suatu wadah secara merata dan tidak saling menumpuk. Selama proses pengeringan sebaiknya daun dibolak-balik agar pengeringan yang didapat lebih merata. Setelah kering kemudian dihancurkan dengan blender, sehingga dihasilkan bubuk daun kumis kucing.

Dalam pembuatan ekstrak etanol daun kumis kucing ini membutuhkan 500 gram bubuk daun kumis kucing, metode yang digunakan maserasi dan pelarut yang digunakan adalah etanol 96%.

2. Penentuan Konsentrasi Larutan Uji yang Digunakan

Konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah 20%, 30%, 40%. Pembuatan konsentrasi untuk larutan uji sebagai berikut:

- Konsentrasi 20% : 20 g ekstrak daun kumis kucing + 100 ml larutan NaCl 0.9% → Larutan ekstrak daun kumis kucing 20%.
- Konsentrasi 30% : 30 g ekstrak daun kumis kucing + 100 ml larutan NaCl 0.9% → Larutan ekstrak daun kumis kucing 30%.

- Konsentrasi 40% : 40 g ekstrak daun kumis kucing + 100 ml larutan NaCl 0.9% → Larutan ekstrak daun kumis kucing 40%.

3. Konsentrasi Larutan Pirantel pamoat

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi larutan pirantel 1 %. Pembuatan larutan pirantel pamoat konsentrasi 1% tersebut adalah sebagai berikut:

Larutan pirantel pamoat konsentrasi 1% = 1 g pirantel pamoat + 100 ml NaCl 0.9%.

4. Pengamatan Cacing *Ascaris suum*

Sample diambil dari lumen usus babi potong. Sample dibagi menjadi 3 kelompok percobaan yaitu kelompok 1, 2 dan 3 adalah ekstrak etanol daun kumis kucing dengan konsentrasi 20%, 30% dan 40%. Kelompok 4 adalah pirantel pamoat 1% yang merupakan kontrol positif. Kelompok 5 adalah larutan NaCl 0.9% yang merupakan kontrol negatif.

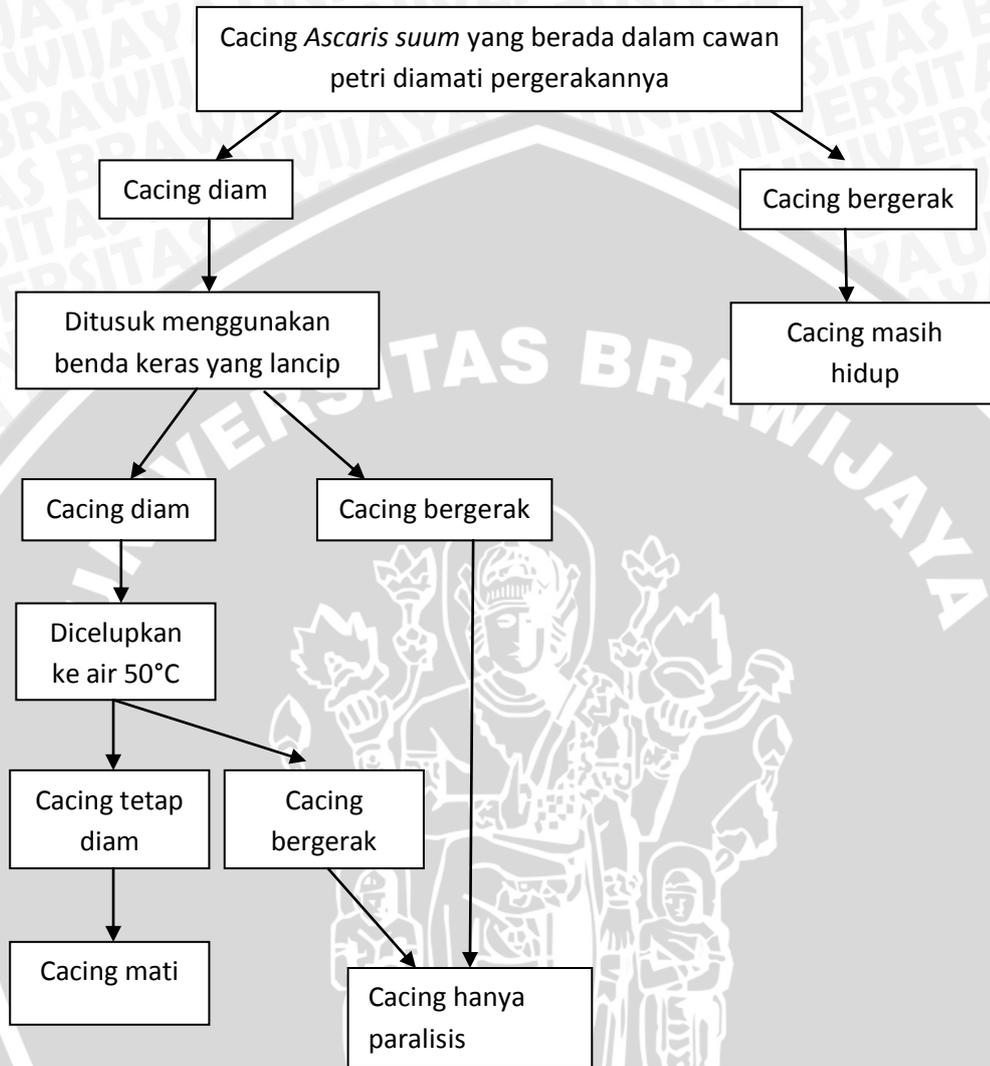
Masing-masing kelompok kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dan setiap pengulangan berisi 5 ekor cacing *Ascaris suum* yang direndam dalam 20 ml ekstrak etanol daun kumis kucing, larutan pirantel pamoat 1%, dan larutan NaCl 0,9% sesuai dengan konsentrasi masing-masing.

1. Cawan petri masing-masing diberi ekstrak etanol daun kumis kucing, pirantel pamoat sesuai konsentrasi masing-masing serta NaCl 0.9% yang telah dihangatkan dulu pada suhu 37°C.
2. *Ascaris suum* dimasukkan kedalam masing-masing cawan petri yang sudah disiapkan, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C.
3. Cacing *Ascaris suum* kemudian diamati setiap 1 jam. Untuk melihat apakah cacing mati, paralisis atau masih normal, maka cacing diusik dengan batang

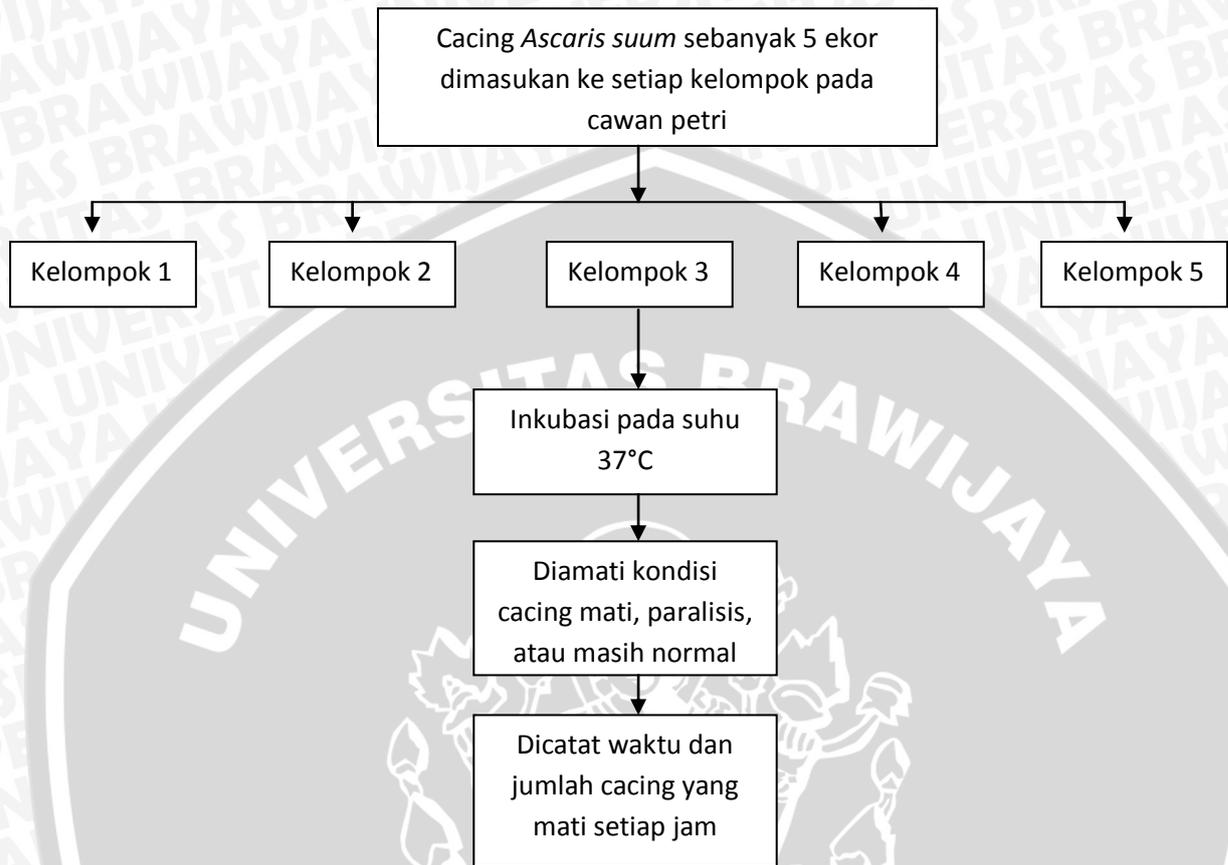
pengaduk, jika pada saat diusik cacing tidak bergerak, maka cacing tersebut dimasukan ke dalam air 50°C, jika cacing tetap tidak bergerak saat dimasukan ke air 50°C maka cacing tersebut telah mati. Sedangkan apabila cacing bergerak, berarti cacing hanya paralisis.



Cara untuk mengamati cacing *Ascaris suum* :



4.9. Alur Kerja Penelitian



Keterangan :

Kelompok 1 : adalah ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) konsentrasi 20%

Kelompok 2 : adalah ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) konsentrasi 30%

Kelompok 3 : adalah ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) konsentrasi 40%

Kelompok 4 : adalah larutan kontrol positif pirantel pamoat 1%

Kelompok 5 : adalah larutan kontrol negatif NaCl 0.9%

4.10. Pengolahan Data dan Analisis Data

4.10.1. Pengolahan Data

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang didapat dari jumlah cacing yang mati setiap 1 jam dan dicatat sampai jam ke 24. Data tersebut dianalisis menggunakan tabel dan grafik, kemudian dievaluasi secara statistik dengan program komputer.

4.10.1. Analisis Data

Pada penelitian ini digunakan analisis probit untuk mencari LC100 dan LT100 dari ekstrak etanol daun kumis kucing. Hingga sekarang Probit analysis masih menjadi metode statistik pilihan untuk meneliti *dose-response relationship* (Vincent, 2008). Syarat dari uji probit adalah distribusinya normal (Dahlan, 2008). Normalitas data dianalisis dengan one sample Kolmogorov-Smirnov *test*.

