

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan ini menggunakan penelitian eksperimental laboratorium (*true eksperimental-post test only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui daya antelmintik ekstrak etanol kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) terhadap cacing *Ascaris suum*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi penelitian ini menggunakan cacing *Ascaris suum*.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian yang diambil adalah cacing *Ascaris suum* dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Inklusi:

- Cacing *Ascaris suum* jantan dan betina
- Cacing *Ascaris suum* yang masih aktif
- Cacing *Ascaris suum* yang memiliki anggota tubuh yang utuh

Eksklusi:

- Cacing *Ascaris suum* yang tidak memiliki anggota tubuh yang utuh
- Cacing *Ascaris suum* yang sudah mati

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dengan 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+)

yaitu (misal):

- Kontrol (-) : Larutan NaCl 0,9%
- Kontrol (+) : Pyrantel pamoat 1%
- Perlakuan I : 4 ml ekstrak kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) + 16 ml larutan NaCl 0,9% → Larutan ekstrak kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) 20%.
- Perlakuan II : 6 ml ekstrak kulit jeruk bali (*Citrus maxima*) + 14 ml larutan NaCl 0,9% → Larutan ekstrak kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) 30%.
- Perlakuan III : 8 ml ekstrak kulit jeruk bali (*Citrus maxima*) + 12 ml larutan NaCl 0,9% → Larutan ekstrak kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) 40%.

Maka perkiraan 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.

Tiap perlakuan membutuhkan 5 ekor cacing, maka setiap kali percobaan membutuhkan 3 kali perlakuan dan 1 kontrol negatif serta 1 kontrol positif sehingga berjumlah 70 ekor dan dilihat pengaruhnya pada jam ke- 1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7 dan ke-8.

4.3 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) pada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak kulit jeruk Bali (*Citrus maxima*) dengan berbagai konsentrasi dan menentukan waktu misalnya jam ke1, jam ke-2, jam ke-3 dan seterusnya.

4.5 Definisi Operasional

- Kulit jeruk Bali adalah jeruk yang diperoleh dari kebun jeruk di daerah Gianyar, Bali. jeruk yang digunakan adalah jeruk yang berkulit luarnya berwarna hijau kekuningan. Buahnya berbentuk bulat besar seperti bola sepak dengan diameter yang berukuran sekitar 3-5 cm.

- Cacing *Ascaris suum* adalah cacing gelang yang umumnya berada di dalam usus halus babi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) di Denpasar, Bali. Diletakan di dalam larutan NaCl 0,9%. Kemudian sampel dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, sesuai dengan rancangan penelitian.
- NaCl 0.9% merupakan larutan fisiologis yang digunakan sebagai kontrol negatif karena sifatnya yang isotonis dan tidak merusak membran sel cacing (Asri, 2006)
- Pirantel pamoat merupakan terapi lini pertama askariasis. Pirantel pamoat digunakan sebagai kontrol positif dapat membunuh cacing dengan cara merusak struktur subseluler dan menghambat sekresi asetilkolinesterase cacing. Selain itu, obat ini juga menghambat penyerapan glukosa secara ireversibel sehingga terjadi deplesi glikogen pada cacing (Octrie, 2008).
- Daya anthelmintik merupakan kemampuan ekstrak etanol kulit jeruk bali dalam menimbulkan kematian pada cacing *Ascaris suum*. Daya anthelmintik ditentukan dengan menghitung Lethal Concentration 100 dan Lethal Time 100 (Febrianta, 2013), serta membandingkannya dengan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif dan Pirantel pamoat sebagai kontrol positif (Mighra, 2007).
- Parameter kematian cacing adalah tidak adanya respon saat disentuh dengan pinset, tidak bergerak ketika dimasukkan ke dalam air dengan suhu 50° C, serta diikuti dengan warna tubuh yang memudar (Sen *et al.*, 2012). 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).

- *Lethal Concentration* 100 adalah konsentrasi yang diperlukan untuk dapat membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (IUPAC, 2003)
- *Lethal time* 100 adalah waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 100% jumlah cacing pada konsentrasi tertentu (IUPAC, 2003)

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah

A. Alat untuk ekstraksi dan evaporasi ekstrak kulit jeruk Bali :

- Alat penggerus / blender
- Corong gelas
- Gelas ukur
- Labu erlemeyer atau beaker glass (dengan volume 1 liter) untuk merendam ekstrak kulit jeruk Bali.
- 1 set alat evaporasi: labu penampung, pendingin spiral, labu rotasi ekstraksi, waterbath dan vakum, klem statis, selang plastic, water pump, bak penampung aquadest dan tabung pemisah hasil ekstraksi.
- Oven
- Neraca analitik

B. Alat-alat untuk uji potensi anti helmintik :

- Cawan petri diameter 10 c
- Batang pengaduk kaca
- Pinset

- Gelas ukur
- Labu ukur
- Timbangan
- Toples untuk menyimpan cacing
- Inkubator Thermo CO₂ 5%
- NaCl 0,9%
- Larutan uji konsentrasi 20%, 30%, 40%
- Pyrantel pamoat (Combantrin) 1%

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Kulit jeruk Bali
- Etanol 96% sebagai pelarut ekstrak
- Larutan ekstrak kulit jeruk Bali
- Cacing *Ascaris suum*

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Bali (*Citrus maxima*)

Pembuatan ekstrak etanol kulit jeruk bali dilakukan di polinema malang. Proses maserasi dimulai dengan pengeringan dan penggilingan kulit jeruk bali agar mudah diekstrak, lalu simplisia kulit jeruk bali dicampur dengan etanol dengan perbandingan satu banding empat, campuran lalu dishaker selama 2 jam, lalu didiamkan selama 24 jam. Hasil shaker yang sudah didiamkan akan disaring dan di uapkan menggunakan mesin *Rotary Evaporator* selama 30 menit. Penggunaan rotary evaporator ini menyebabkan pelarut menguap sedangkan ekstrak kulit jeruk bali mengendap, dengan pemanasan dibawah titik pelarut maka akan terjamin senyawa terlarut tidak akan rusak oleh suhu karena pelarut tidak mengalami pendidihan terlebih dahulu.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Penyiapan Larutan

Cairan pelarut ekstrak kulit jeruk Bali yang digunakan adalah larutan aquades murni. Larutan stok ekstrak kulit jeruk Bali dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji.

4.7.2 Penyiapan Larutan Uji

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dengan 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+). 3 perlakuan tersebut menggunakan konsentrasi 20%, 30%, dan 40% yang ditentukan dari hasil penelitian pendahuluan. Kontrol (+) menggunakan larutan pirantel pamoat 1% (Supriati, 2012), serta larutan NaCl 0,9% sebagai kontrol (-).

Pembuatan larutan untuk perlakuan dibuat dengan mengencerkan larutan stok tadi kepada konsentersasi yang diinginkan dengan menggunakan rumus :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

M_1 : Konsentrasi larutan stok larutan ekstrak kulit jeruk Bali

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan (ml)

V_2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

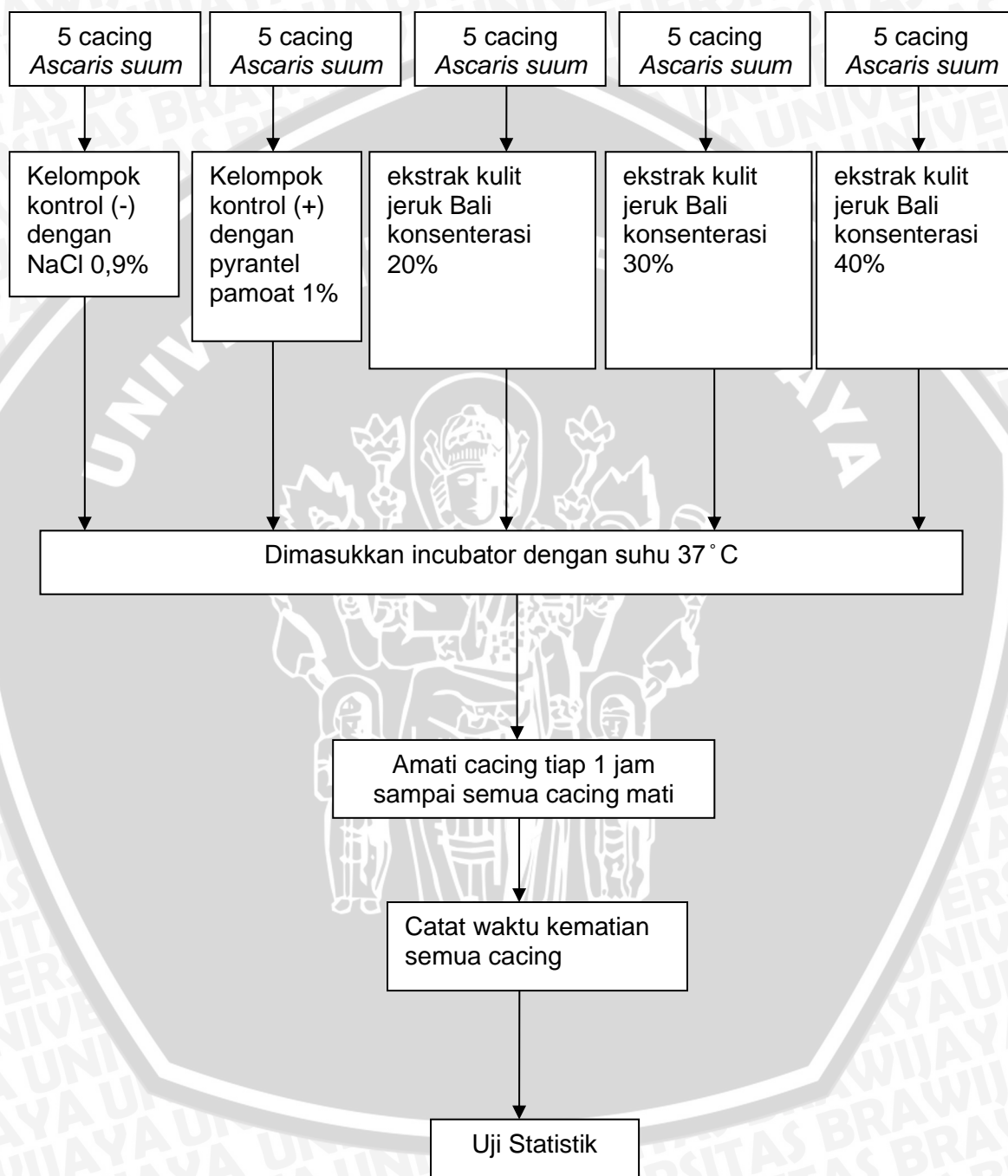
4.7.3 Persiapan Cacing *Ascaris suum*

Cacing *Ascaris suum* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari pemotongan babi di daerah Gianyar, Bali. Cacing dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi rendaman larutan NaCl 0,9%.

4.7.4 Langkah Penelitian

1. Siapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak kulit jeruk Bali konsentrasi 20%, 30% dan 40%, kemudian dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37 °C dalam incubator kurang lebih 15 menit.
2. Masukkan 5 ekor cacing *Ascaris suum* ke dalam cawan petri dengan menggunakan pinset yang sudah steril.
3. Diinkubasi pada suhu 37 °C.
4. Pengamatan dilakukan setiap 1 jam, dengan cara merendam cacing ke dalam rendaman air hangat (37 °C) kemudian cacing disentuh dengan pinset. Jika cacing tidak bergerak maka cacing tersebut dinyatakan mati.
5. Hasil yang diperoleh dicatat.
6. Penelitian ini dilakukan 4 kali ulangan.

4.7.5 Skema Alur Kerja Penelitian



4.7.6 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3, jam ke-4, jam ke-5, jam ke-6, jam ke-7, jam ke-8 dan jam ke-24. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mencari perubahan jumlah cacing yang hidup. Jumlah cacing yang mati dihitung dan dimasukkan dalam tabel.

4.7.7 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari pengamatan dimasukkan dalam tabel dan diklasifikasikan menurut perlakuan, jumlah cacing yang mati, dan waktu pengulangan. Dari tabel tersebut, hasilnya akan dianalisis dan dimasukkan dalam perhitungan statistik.

4.7.8 Analisis Data

Data jumlah kematian cacing *Ascaris suum* setiap jamnya dianalisis menggunakan tabel dan grafik. Hasil uji dievaluasi secara statistik menggunakan metode analisis probit dengan menggunakan program Mini tab 15 untuk mengetahui *lethal concentration* 100 (LC_{100}) dan *lethal time* (LT_{100}) ekstrak kulit jeruk bali.