BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan *true eksperimental-post test only controlled group design* yang bertujuan untuk mengetahui kadar efek antelmintik ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) terhadap cacing *Ascaris suum* secara in vitro.

4.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September sampai Desember 2014.

4.3 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan cacing *Ascaris suum* yang masih hidup dan aktif bergerak, diambil dari usus halus babi. Kemudian sampel dibagi menjadi tujuh kelompok perlakuan yaitu 5 perlakuan dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda, 1 kontrol positif dengan pyrantel pamoate 1% dan 1 kontrol negatif dengan larutan PBS yang mengandung 1% bovine serum.

4.4 Teknik Sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *purposive sampling* yaitu dengan memakai cacing yang masih aktif bergerak dengan ukuran yang relatif sama serta tidak dibedakan antara jantan dan betina karena sulit membedakan saat panjang cacing berkisar 20-30 cm.

Kriteria inklusi :

- Cacing *Ascaris suum* dewasa jantan dan betina
- Cacing masih aktif bergerak/ masih hidup
- Cacing tidak cacat/ kehilangan bagian tubuhnya

Kriteria eksklusi :

- Cacing tidak bergerak/ mati
- Cacing kehilangan bagian tubuhnya/cacat

Penentuan jumlah *quota sampling* ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$ (Arkeman dan David, 2006).

Keterangan :

n = jumlah sampel minimal yang dibutuhkan

t = jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan rumus tersebut penghitungan sampel tiap perlakuan adalah sebagai berikut :

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4{,}75$$

$$n = 5$$

Tiap kelompok perlakuan akan membutuhkan 5 sampel.

Perkiraan jumlah pengulangan yang akan dilakukan dengan rumus (Tjokronegoro, 1979)

p (n-1) ≥ 16,

berdasarkan rumus tersebut, maka penghitungannya sebagai berikut:

7 (n-1) ≥ 16

7n – 7 ≥ 16

7n ≥ 23

n ≥ 3,28

n = 3

keterangan :

p = jumlah kelompok coba

n = jumlah pengulangan

Jadi, jumlah pengulangan yang akan diperlukan untuk penelitian ini adalah minimal 3 kali.

4.5 Identifikasi Variabel

1. Variabel bebas

   Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dalam variasi konsentrasi.

2. Variabel terikat

   Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah kematian cacing *Ascaris suum* setelah pemberian larutan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) pada konsentrasi tertentu.

3. Variabel luar

a) Variabel luar yang dapat dikendalikan yaitu :

1) Jenis cacing

2) Ukuran cacing

3) Suhu percobaan

b) Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan yaitu :

1) Umur cacing

2) Variasi kepekaan cacing terhadap larutan yang diujikan

3) Beda waktu panen buah Avokad

4.6 Definisi Operasional

- Biji buah Avokad didapat dari Kecamatan Kasembon, Kabupaten Malang.
- Ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) adalah ekstrak yang dihasilkan dari biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) yang diperoleh melalui proses maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.Seluruh proses pembuatan ekstrak dikerjakan oleh tenaga ahli di Polinema. Sedangkan proses pemotongan hingga menjadi serbuk dilakukan di Materia Medika Batu.
- Konsentrasi ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) yang diperoleh dari proses maserasi dengan larutan PBS yang mengandung 1% bovine serum sesuai dengan kosentrasi yang diperlukan.
- Cacing *Ascaris suum* yang telah diperoleh dari rumah pemotongan hewan kemudian dimasukkan ke dalam rendaman larutan NaCl 0,9% dan dikirim ke

Lab Parasitologi FKUB. Kemudian sampel dimasukkan inkubator, lalu dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, sesuai dengan rancangan penelitian.

- *Lethal Concentration* adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh sejumlah cacing. Dalam penelitian ini digunakan *Lethal Concentration* 100 (LC_{100}) yaitu konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 100% cacing dalam kurun waktu tertentu.
- *Lethal Time* adalah waktu yang dibutuhkan untuk dapat menimbulkan kematian. *Lethal Time* 100 (LT_{100}) dalam penelitian ini adalah lama waktu yang dibutuhkan dari awal perlakuan untuk dapat membunuh 100% cacing pada konsentrasi tertentu.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Peralatan Penelitian

a. Cawan petri dengan diameter 15 cm

b. Gelas ukur

c. Pinset anatomis

d. Toples untuk menyimpan cacing

e. Inkubator

f. Laminar flow

g. Penggaris 30 cm

h. Sarung tangan

k. Timbangan

l. Penghitung waktu

m. Spiritus

n. Alat tulis

4.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah cacing *Ascaris suum* dengan ukuran panjang 15 sampai 25 cm, larutan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) berbagai konsentrasi, larutan PBS yang mengandung 1% bovine serum dan Pirantel pamoate (Combantrin) 1%. PBS (*Phosphate Buffered Saline*) merupakan larutan isotonis untuk mempertahankan osmolaritas sel sedangkan bovine serum digunakan sebagai nutrisi tambahan untuk metabolisme dan pertumbuhan sel (Rauch Caroline, 2008).

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Buah Avokad (*Persea americana* Mill)

Pembuatan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dikerjakan oleh tenaga ahli dari Polinema. Biji buah Avokad diperoleh dari Kecamatan Kasembon, Kabupaten Malang. Proses pembuatan serbuk dilakukan di Materia Medika. Biji buah Avokad dicuci bersih kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan dioven dengan suhu 40˚C selama 2 hari. Biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) yang sudah kering lalu dihaluskan hingga menjadi serbuk. Setelah itu dilanjutkan dengan proses maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) di dalam cairan etanol 96% selama 2x24 jam pada temperatur kamar dan terlindungi dari sinar matahari. Kemudian dilakukan evaporasi terhadap rendaman etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) sampai etanol 96% menguap dan didapatkan endapan. Endapan tersebut merupakan hasil dari ekstraksi etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) yang siap digunakan.

4.8 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.8.1 Penyiapan Larutan Uji

Cairan pelarut untuk melarutkan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) adalah PBS yang mengandung 1% bovine serum. Larutan stok ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji. Pembuatan larutan untuk perlakuan dilakukan dengan cara mengencerkan larutan stok ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan konsentrasi yang diinginkan menggunakan rumus:

$$\mathbf{M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2}$$

Keterangan :

M_1 = konsentrasi larutan stok ekstrak biji buah Avokad (*Persea americana* Mill)

M_2 = konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 = volume larutan stok yang harus dilarutkan (ml)

V_2 = volume larutan yang diperlukan untuk perlakuan (ml).

Sehingga perhitungan volume larutan stok yang dilarutkan untuk masing-masing konsentrasi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

A. Pembuatan larutan konsentrasi 40%

M_1 = 100%

M_2 = 40%

V_2 = 20 ml

V_1 = ?

$M_1V_1 = M_2V_2$

$100\%.V_1 = 40\%.20$ ml

V_1 = 8 ml

Sehingga untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 40% sebanyak 20 ml, diperlukan 8 ml ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan pelarut sebanyak 14 ml PBS yang mengandung 1% bovine serum.

B. Pembuatan larutan konsentrasi 22,5%

M_1 = 100%

M_2 = 42,5%

V_2 = 20 ml

V_1 = ?

$M_1V_1 = M_2V_2$

100%.V_1 = 42,5%.20 ml

V_1 = 8,5 ml

Sehingga untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 42,5% sebanyak 20 ml, diperlukan 8,5 ml ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan pelarut sebanyak 11,5 ml PBS yang mengandung 1% bovine serum.

C. Pembuatan larutan konsentrasi 45%

M_1 = 100%

M_2 = 45%

V_2 = 20 ml

V_1 = ?

$M_1V_1 = M_2V_2$

100%.V_1 = 45%.20 ml

V_1 = 9 ml

Sehingga untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 45% sebanyak 20 ml, diperlukan 9 ml ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan pelarut sebanyak 11 ml PBS yang mengandung 1% bovine serum.

D. Pembuatan larutan konsentrasi 47,5%

M_1 = 100%

M_2 = 47,5%

V_2 = 20 ml

V_1 = ?

$M_1V_1 = M_2V_2$

$100\%.V_1 = 47{,}5\%.20$ ml

V_1 = 9,5 ml

Sehingga untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 47,5% sebanyak 20 ml, diperlukan 9,5 ml ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan pelarut sebanyak 10,5 ml PBS yang mengandung 1% bovine serum.

E. Pembuatan larutan konsentrasi 50%

M_1 = 100%

M_2 = 50%

V_2 = 20 ml

V_1 = ?

$M_1V_1 = M_2V_2$

$100\%.V_1 = 50\%.20$ ml

V_1 = 10 ml

Sehingga untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 50% sebanyak 20 ml, diperlukan 10 ml ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan pelarut sebanyak 10 ml PBS yang mengandung 1% bovine serum.

4.8.2 Persiapan Cacing *Ascaris suum*

Cacing *Ascaris suum* yang digunakan adalah cacing dewasa dengan ciri morfologi berbentuk bulat panjang dengan panjang tubuh 15-25 cm. Cacing dimasukkan ke dalam toples yang telah diisi dengan rendaman larutan isotonis NaCl 0,9% untuk menjaga ketahanan hidup cacing secara *in vitro* (Rauch, 2008).

4.8.3 Langkah Penelitian

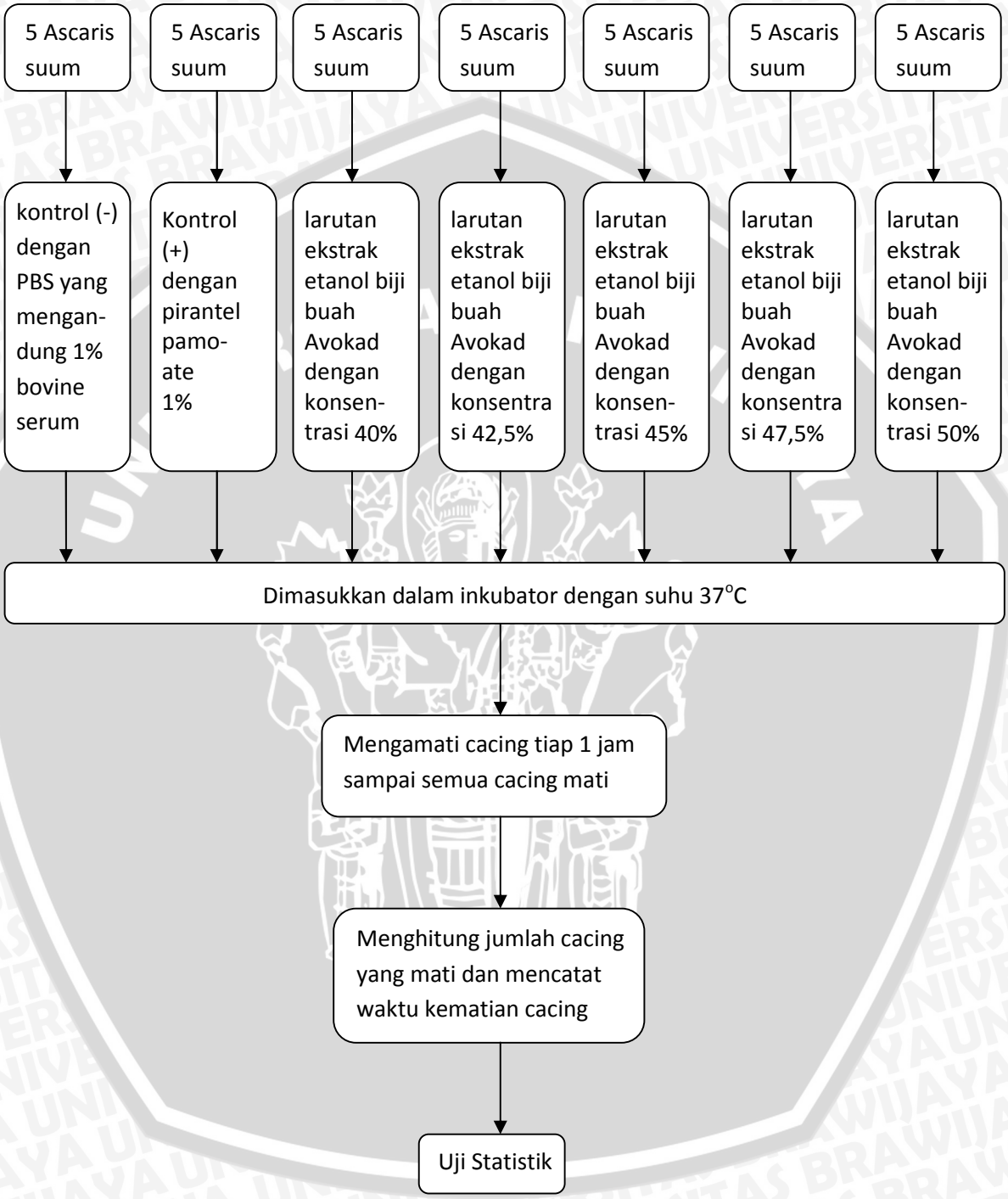
4.8.3.1 Penelitian Pendahuluan

1. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan asumsi *trial and error* pada konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% di Laboratorium Parasitologi FKUB guna menentukan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian utama.
2. Cawan petri disiapkan, masing-masing diisi larutan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%, larutan PBS yang mengandung 1% bovine serum dan pyrantel pamoate sebanyak 20 ml yang telah dihangatkan sebelumnya pada suhu 37^{O}C dalam incubator kurang lebih 15 menit.
3. Ke dalam masing-masing cawan petri dimasukkan cacing *Ascaris suum* yang masih aktif bergerak dengan menggunakan pinset yang sudah steril.
4. Kemudian diinkubasi pada suhu 37^{O}C.
5. Pengamatan dilakukan setiap 1 jam. Untuk melihat apakah cacing mati, paralisis, atau masih normal setelah diinkubasi, cacing-cacing tersebut diusik dengan pinset. Jika cacing diam, masukkan kedalam rendaman air panas dengan suhu 50^{O}C kemudian disentuh dengan pinset. Apabila cacing tetap diam berarti cacing tersebut telah mati, namun jika bergerak berarti cacing tersebut hanya paralisis.
6. Hasil yang diperoleh dicatat.

4.8.3.2 Penelitian utama

1. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, penelitian utama dilakukan pada konsentrasi 40%, 42,5%, 45%, 47,5% dan 50%
2. Langkah pelaksanaan pemeriksaan dalam penelitian utama sama dengan pada penelitian pendahuluan kecuali kadar atau persentase konsentrasi larutan ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) yang digunakan dan jumlah pengulangan perlakuan (pada penelitian utama pengulangan perlakuan pada masing- masing konsentrasi dan kontrol (+) maupun kontrol (-) sebanyak 3 kali).
3. Hasil pengulangan masing-masing perlakuan pada tiap periode perlakuan kemudian dicatat.

4.8.4 Skema Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1. Skema alur kerja penelitian

4.8.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan tiap jam 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 . Pengamatan dilakukan dengan melihat jumlah kematian cacing pada tiap kelompok perlakuan. Jumlah cacing mati kemudian dihitung dan dimasukkan dalam tabel.

4.8.6 Pengumpulan Data

Data hasil yang diperoleh dari pengamatan dimasukkan kedalam tabel dan kemudian diklasifikasikan menurut perlakuannya, jumlah kematian cacing, dan waktu pengulangan. Dari tabel tersebut, hasilnya kemudian dianalisa dan dimasukkan dalam perhitungan statistik.

4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh dari penghitungan jumlah kematian cacing tiap jamnya kemudian dianalisa menggunakan tabel dan grafik. Hasil uji dievaluasi secara statistik untuk mengetahui *lethal concentration* (LC_{100}) dan *lethal time* (LT_{100}) ekstrak etanol biji buah Avokad (*Persea americana* Mill) menggunakan metode analisa probit dengan menggunakan program *Mini tab* 16.