

## 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 daun sirsak (*Annona muricata L*) 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

Eksklusi:

- Cacing *Ascaris suum* yang kurang aktif
- Cacing *Ascaris suum* yang sudah mati

Penelitian ini meliputi 5 perlakuan ditambah 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+) yaitu (misal):

- Kontrol (-) :PBS ( Phosphate Buffer Saline)
- Kontrol (+) :Pyrantel pamoat 1%
- Perlakuan I : 6 ml ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L*) + 24 ml larutan PBS → larutan ekstrak etanol aun sirsak (*Annona muricata L*) 30%.
- Perlakuan II : 9 ml ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L*) + 21 ml larutan PBS → larutan ekstrak Daun sirsak (*Annona muricata L*) 32,5%.
- Perlakuan III : 12 ml ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L*) + 18 ml larutan PBS → larutan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) 35%
- Perlakuan IV : 15 ml ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L*) + 15 ml larutan PBS → larutan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) 37,5%
- Perlakuan V : 18 ml ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L*) + 12 ml larutan PBS → larutan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) 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 jamke- 1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8 dan 24.

#### 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 Daun sirsak (*Annona muricata L*) pada konsentersasi tertentu.

##### 4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) dengan berbagai konsentersasi 30%, 32,5%, 35%, 37,5% dan 40% sejumlah lima konsentrasi berbeda dan

menentukan waktu paparan misalnya jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3 dan seterusnya.

#### 4.5 Definisi Operasional

- Tanaman sirsak adalah tanaman yang tersebar di seluruh Indonesia. Sirsak merupakan tanaman dengan tinggi pohon sekitar 8 meter. Batang coklat berkayu, bulat, bercabang. Mempunyai daun bebentuk telur atau lanset, ujung runcing, tepi rata, pangkal meruncing, pertulangan menyirip, panjang tangkai 5 mm, hijau kekuningan.
- Cacing *Ascaris suum* adalah cacing gelang yang umumnya berada di dalam usus halus babi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan Kabupaten Malang
- *Lethal concentration* adalah dosis minimal yang menimbulkan kematian cacing 100% pada waktu 24 jam.
- *Lethal time* adalah presentasi kematian cacing dalam waktu 24 jam.
- Antihelmintik adalah sebuah zat yang memiliki kemampuan cukup untuk membunuh cacing

#### 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 etanol daun sirsak :
- Alat penggerus / blender
  - Corong gelas
  - Gelas ukur

- Labu erlemeyer atau beaker glass (dengan volume 1 liter) untuk merendam ekstrak etanol daun sirsak.
- 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%
- PBS (Phosphate Buffer Saline)
- FBS (Fetal Bovine Serum)
- Larutan uji konsentrasi 30%, 32,5%, 35%, 37,5% dan 40%
- Pyrantel pamoat (Combantrin) 1%

#### 4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Daun sirsak

- Etanol 80% sebagai pelarut ekstrak
- Larutan ekstrak daun sirsak
- Cacing *Ascaris suum*

#### 4.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun sirsak (*Annona muricata L*)

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya (Devi,2009). Daun sirsak dikeringkan kemudian diserbuk. Serbuk daun sirsak dimaserasi menggunakan ethanol 80% dengan perbandingan 1:3 (Farmakope Indonesia), diaduk selama 3 jam. Setelah proses pengadukan selesai lalu didiamkan dan direndam selama 1 malam, kemudian dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuumrotary evaporator* dengan pengurangan tekanan sampai dihasilkan ekstrak kental berupa pasta (Devi,2009).

#### 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

##### 4.7.1 Penyiapan Larutan

Cairan pelarut ekstrak etanol daun sirsak yang digunakan adalah PBS. Larutan stok ekstrak etanol daun sirsak dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji.

##### 4.7.2 Penyiapan Larutan Uji

Ekstrak pekat daun sirsak yang tersimpan di lemari es disesuaikan suhunya dengan suhu kamar dengan cara membiarkan di udara kamar selama 15 menit dan dianggap konsentersasi 100%.

Selanjutnya untuk mendapatkan 100 ml larutan dilakukan pengenceran dengan cara 50 ml ekstrak daun sirsak 100% ditambah dengan 50 ml pelarut PBS.

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

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

Keterangan :

$M_1$  :Konsentrasi larutan stok larutan ekstrak etanol daun sirsak

$M_2$  :Konsentrasi larutan yang diinginkan

$V_1$  :Volume larutan stok yang harus dilarutkan (ml)

$V_2$  :Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 30 ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan aquades sampai mencapai volume 30 ml.

#### 4.7.3 Persiapan Cacing *Ascaris suum*

Cacing *Ascaris suum* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari pemotongan babi di daerah Gadang, Kabupaten Malang. Cacing yang telah diidentifikasi dengan ciri morfologi berbentuk bulat panjang, panjang tubuh cacing dewasa jantan 15-25 cm, sedangkan cacing dewasa betina memiliki panjang 20-40cm.

Cacing yang telah diidentifikasi sebelumnya dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi rendaman larutan NaCl 0,9%.

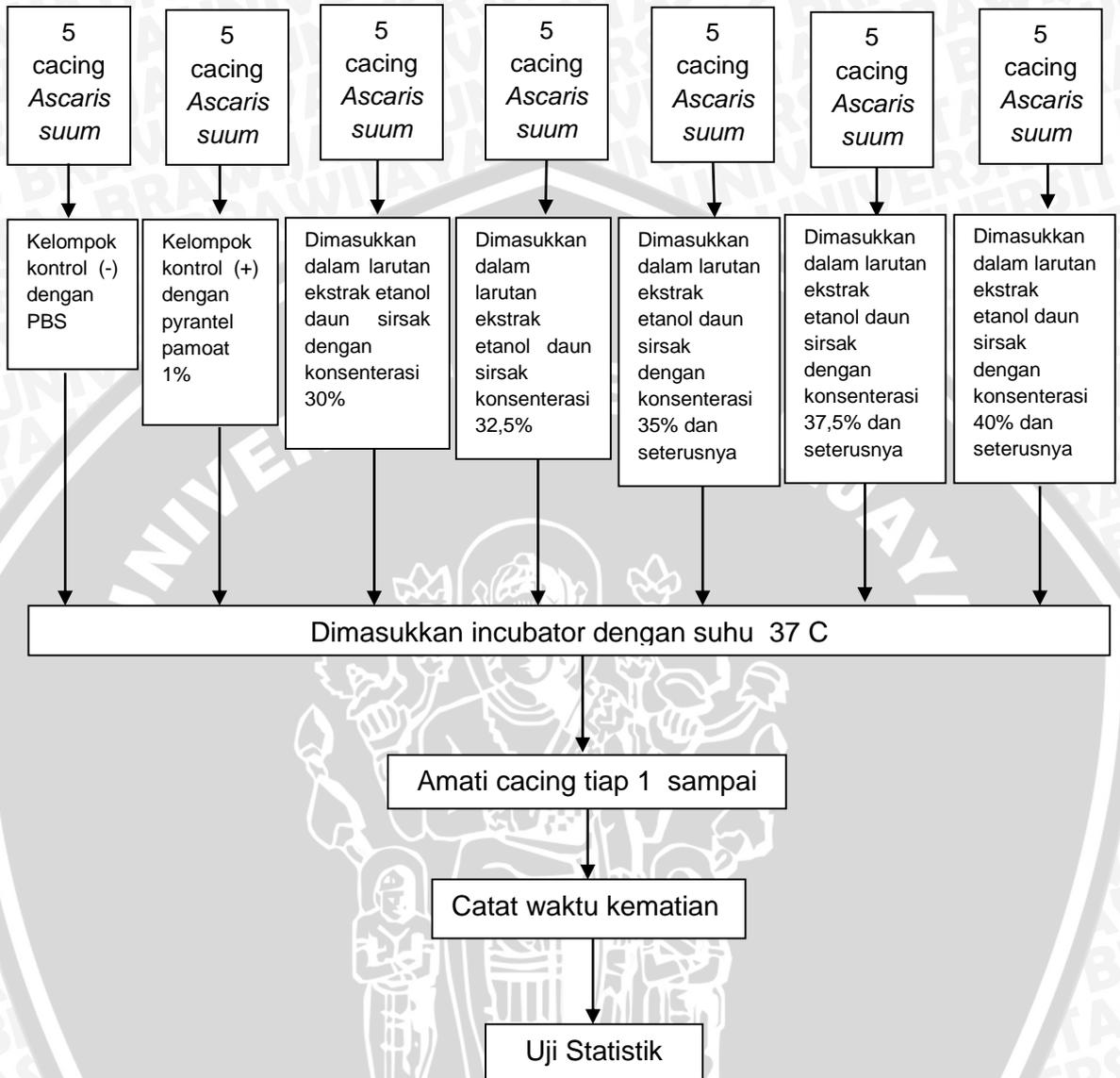
#### 4.7.4 Langkah Penelitian

1. Siapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak etanol daun sirsak konsentrasi 30%, 32,5%, 35%, 37,5% dan 40% kemudian dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37 ° C dalam incubator kurang lebih 5 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.

Langkah-langkah penelitian yang sama dilakukan pada penelitian pendahuluan guna mendapatkan dugaan konsentrasi yang efektif agar dapat mematikan cacing *ascaris suum* secara *in vitro* dengan dasar trial and error maupun penelitian utama untuk mendapatkan konsentrasi yang lebih tepat. Penelitian utama dilakukan pada konsentrasi konsentrasi diantara konsentrasi yang diduga efektif dari satu tingkat konsentrasi di bawahnya.



#### 4.7.5 Skema Alur Kerja Penelitian



Gambar 7. Skema Alur 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 dianalisa menggunakan tabel dan grafik. Hasil uji dievaluasi secara statistik menggunakan metode analisa probit dengan menggunakan program *Mini tab* untuk mengetahui adanya hubungan dan pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L*) terhadap kematian cacing *Ascaris suum*.