

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium (*true eksperimental-post test only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui daya antelmintik ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) terhadap cacing *Ascaris suum*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi merupakan sekumpulan unsur yang menjadi obyek penelitian. Pengertian lain mengenai populasi adalah Himpunan semua hal yang ingin diketahui. Populasi penelitian ini menggunakan cacing *Ascaris suum*.

4.2.2 Sampel

Sampel adalah unsur-unsur yang diambil dari populasi. Sampel penelitian yang diambil adalah cacing *Ascaris suum* dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Inklusi:

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

Eksklusi:

- ✓ Cacing *Ascaris suum* yang tidak memiliki bagian tubuh yang utuh karena kerusakan mekanis

4.2.3 Jumlah Sampel

Di dalam penelitian terdapat 3 perlakuan dengan 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+) yaitu (misal):

- Kontrol (-) : Larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum)
- Kontrol (+) : Pyrantel pamoat 1%
- Perlakuan I : 4 ml ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) + 16 ml larutan PBS dengan 1% FBS → Larutan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) 30%.
- Perlakuan II : 6 ml ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) + 14 ml larutan PBS dengan 1% FBS → Larutan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) 40%.
- Perlakuan III : 8 ml ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) + 12 ml larutan PBS dengan 1% FBS → Larutan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) 50%.

Besar pengulangan pada penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus menurut Tjokronegoro (2001), yaitu:

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$$n \approx 4$$

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 100 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 Lokasi Penelitian

Tempat Pelaksanaan Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Pengertian variable tergantung adalah variable yang sifatnya dipengaruhi variable lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) pada konsentration tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Pengertian variable bebas adalah variable yang sifatnya mempengaruhi variable lain. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan berbagai konsentrasi dan menentukan waktu misalnya jam ke1, jam ke-2, jam ke-3, jam ke-4 dan seterusnya.

4.5 Definisi Operasional

- Cacing *Ascaris suum* adalah cacing pengganti untuk *Ascaris lumbricoides*, dipilih *Ascaris suum* karena tidak ada perbedaan fisiologis antara kedua cacing tersebut. Cacing *Ascaris suum* atau cacing gelang adalah cacing yang berada di dalam usus halus babi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan di Gadang, Malang. Diletakan di dalam larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum). Kemudian sampel dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, sesuai dengan rancangan penelitian.
- Daun jambu biji adalah daun yg diambil dari pohon jambu biji yang terdapat di Balai Materia Medika, Batu.
- PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum) merupakan larutan fisiologis yang digunakan sebagai kontrol negative.
- 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 (Octrie, 2008).
- Daya anthelmintik merupakan kemampuan ekstrak etanol daun jambu biji dalam menimbulkan kematian pada cacing *Ascaris suum*. Daya anthelmintik ditentukan dengan menghitung Lethal Concentration 100 dan Lethal Time 100 (Febrianta, 2013).
- Waktu kematian cacing adalah waktu yang dibutuhkan mulai perlakuan sampai matinya cacing dalam ruang inkubasi. Untuk membuktikan bahwa cacing telah mati dalam inkubasi, cacing-cacing tersebut disentuh dengan pinset. Jika diam, dipindahkan ke dalam air 50° C. Kemudian disentuh

lagi, apabila tetap diam berarti cacing tersebut telah mati. Tanda lain cacing mati adalah warnanya memudar (Kendyartanto, 2008). Pengamatan dilakukan tiap 1 jam (Budiyantri, 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 Alat-alat

1. Peralatan Penelitian

- Alat untuk ekstraksi dan evaporasi ekstrak daun jambu biji: Labu erlemeyer atau beaker glass (dengan volume 1 liter) untuk merendam ekstrak daun jambu biji, gelas ukur, corong gelas, alat penggerus / blender, oven, neraca analitik, dan 1 set alat evaporasi yaitu: labu penampung, pendingin spiral, labu rotasi ekstraksi, waterbath dan vakum, klem statis, selang plastic, water pump, bak penampung aquadest dan tabung pemisah hasil ekstraksi.
- Alat-alat untuk uji potensi anti helmintik : Cawan petri diameter 10 c, incubator thermo CO₂ 5%, batang pengaduk kaca, timbangan, labu ukur, gelas ukur, pinset, toples untuk menyimpan cacing, PBS (Phosphate Buffer

Saline) dengan 1% FBS (Fetal Buffer Serum), pyrantel pamoat (Combantrin) 1%, dan larutan uji konsentrasi 20%, 30%, 40%,

2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cacing *Ascaris suum*, daun jambu biji, etanol 96% sebagai pelarut ekstrak, larutan ekstrak daun jambu biji

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

Kegiatan pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji dilakukan di polinema malang. Proses maserasi dimulai dengan pengeringan dan penggilingan daun jambu biji agar mudah diekstrak, lalu simplisia daun jambu biji dicampur dengan etanol 96% 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*. Penggunaan rotary evaporator ini menyebabkan pelarut menguap sedangkan ekstrak daun jambu biji 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 daun jambu biji yang digunakan adalah larutan aquades murni. Larutan stok ekstrak daun jambu biji 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 30%, 40%, dan 50% yang ditentukan dari hasil penelitian pendahuluan. Kontrol (+) menggunakan larutan pirantel pamoat 1% (Supriati, 2012), serta larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum) 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 daun jambu biji

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 Gadang, Malang. Cacing dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi rendaman larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum).

4.7.4 Langkah Penelitian

1. Siapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak daun jambu biji konsentration 30%, 40% dan 50%, kemudian dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37°C dalam inkubator 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 (40°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 Pengamatan dan Pengumpulan Data

Pengamatan bertujuan untuk mengetahui perubahan jumlah cacing yang hidup. 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 kematian jumlah cacing. Jumlah cacing yang mati dihitung dan dimasukkan kedalam table.

4.7.6 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.

4.7.7 Analisis Data

Jumlah kematian cacing setiap jamnya dianalisis menggunakan table dan grafik. Hasil uji dievaluasi secara statistik menggunakan metode analisis probit. Metode analisis probit adalah model non linier yang digunakan untuk menganalisis hubungan antara satu variabel dependen dengan beberapa variabel independen. Metode probit dapat digunakan untuk mengetahui *lethal concentration* 100 (LC₁₀₀) dan lethal time(LT₁₀₀) ekstrak daun jambu biji. Analisis probit dapat diguakan dengan aplikasi Mini tab 15.

4.8 Uji Penapisan Fitokimia

Uji penapisan fitokimia dilakukan untuk membuktikan bahwa kandungan aktif zat tersebut memang benar ada dalam ekstrak daun jambu biji. Uji penapisan fitokimia didapatkan bahwa senyawa aktif pada ekstrak daun jambu biji adalah flavonoid dan tannin

4.8.1 Flavonoid

Untuk membuktikan adanya kandungan bahan aktif pada ekstrak dipanaskan dengan 10 mL etil asetat yang telah diuapkan selama 3 menit. Campuran kemudian disaring dan 4 mL filtrat dikocok dengan penambahan 1 mL larutan amonia encer, terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

4.8.2 Tanin

Pemeriksaan Tanin, ekstrak ditambahkan dengan 1 mL larutan Fe(III) klorida 10%. Jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Robinson, 1995; Jones dan Kinghorn, 2006).



4.9 Skema Alur Kerja Penelitian

