

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian (*the post test only controlled group design*). Penelitian ini untuk mengetahui efek ekstrak etanol kulit jeruk nipis *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle antihelmintik terhadap cacing *Ascaris suum*.

4.2 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 sudah tidak bergerak saat akan dimasukkan ke dalam cawan petri
- ✓ Cacing mengalami trauma mekanik saat akan dimasukkan ke dalam cawan petri

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 (+) : Pirantel Pamoat 1%
- Perlakuan I : 6 ml ekstrak kulit jeruk nipis + 14 ml larutan PBS dengan 1% FBS → larutan ekstrak jeruk kulit nipis 30%
- Perlakuan II : 8 ml ekstrak kulit jeruk nipis + 12 ml larutan PBS dengan 1% FBS → larutan ekstrak kulit jeruk nipis 40%
- Perlakuan III : 10 ml ekstrak kulit jeruk nipis + 10 ml larutan PBS dengan 1% FBS → larutan ekstrak kulit jeruk nipis 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 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Oktober 2016.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Bebas

Pengertian variabel bebas adalah variabel yang sifatnya mempengaruhi variabel lain. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak kulit jeruk nipis *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle dengan berbagai konsentrasi dan menentukan waktu misalnya jam ke1, jam ke-2, jam ke-3, jam ke-4 dan seterusnya.

4.4.2 Variabel Tergantung

Pengertian variabel tergantung adalah variabel yang sifatnya dipengaruhi variabel lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak kulit jeruk nipis *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle pada konsentrasi tertentu.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat-Alat dan Bahan

1. Cawan petri diameter 10 cm
2. Batang kaca sebagai pengaduk
3. Gelas ukur
4. Pinset anatomis
5. Labu takar
6. Toples untuk menyimpan cacing
7. Inkubator CO₂
8. Larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%)
9. FBS (Fetal Bovine Serum)
10. PBS (Phosphate Buffer Saline)
11. Larutan uji dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%
12. Cacing *Ascaris suum*

4.5.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis

Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis dikerjakan oleh Politeknik Negeri Malang. Jeruk nipis sebanyak 6 kilogram dicuci bersih, dikupas dan dipotong

kecil-kecil, dan dikeringkan dengan di angin-anginkan. Kulit jeruk nipis yang sudah kering kemudian di haluskan menjadi bentuk serbuk. Selanjutnya dilakukan proses maserasi. Maserasi merupakan cara pencarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk kulit jeruk nipis dalam cairan etanol 96% selama dua hari pada temperatur kamar dan terlindung dari sinar matahari. Setelah itu, dilakukan proses evaporasi pada rendaman bubuk kulit jeruk nipis sampai etanol 96% menguap dan didapatkan endapan. Hasil endapan tersebut merupakan hasil ekstraksi dari kulit jeruk nipis dan siap digunakan.

4.6 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 fisiologis NaCl 0,9%. Kemudian sampel dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, sesuai dengan rancangan penelitian.
- Kulit buah jeruk nipis adalah kulit yang diambil dari buah jeruk nipis yang terdapat di Pasar Besar, Malang.
- Etanol 96% adalah larutan yang digunakan sebagai pelarut ekstrak yang terdapat senyawa flavonoid dan tannin. Jenis pelarut pengestraksi juga mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak, dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar (Arifianti, 2014).

- PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum) merupakan larutan fisiologis yang digunakan sebagai kontrol negatif.
- Daya antihelmintik merupakan kemampuan ekstrak etanol kulit jeruk nipis dalam menimbulkan kematian pada cacing *Ascaris suum*. Daya antihelmintik ditentukan dengan menghitung *Lethal Concentration* 100 dan *Lethal Time* 100 (Peter, 2006).
- 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. Penggunaan waktu 24 jam sebagai batas akhir pengamatan berdasarkan obat antihelmintik saat ini durasi kerjanya 24 jam (Gunawan, 2009).
- *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).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Larutan

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

4.7.2 Persiapan 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 positif (+) menggunakan larutan pirantel pamoat 1%, serta larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) dengan 1% FBS (Fetal Bovine Serum) sebagai kontrol negatif (-).

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 kulit jeruk nipis

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan (ml)

V_2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

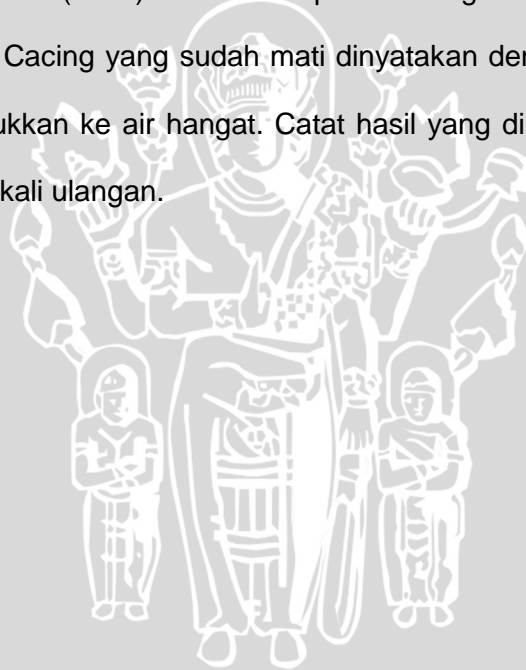
4.7.3 Persiapan Cacing *Ascaris suum*

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 NaCl 0,9%.

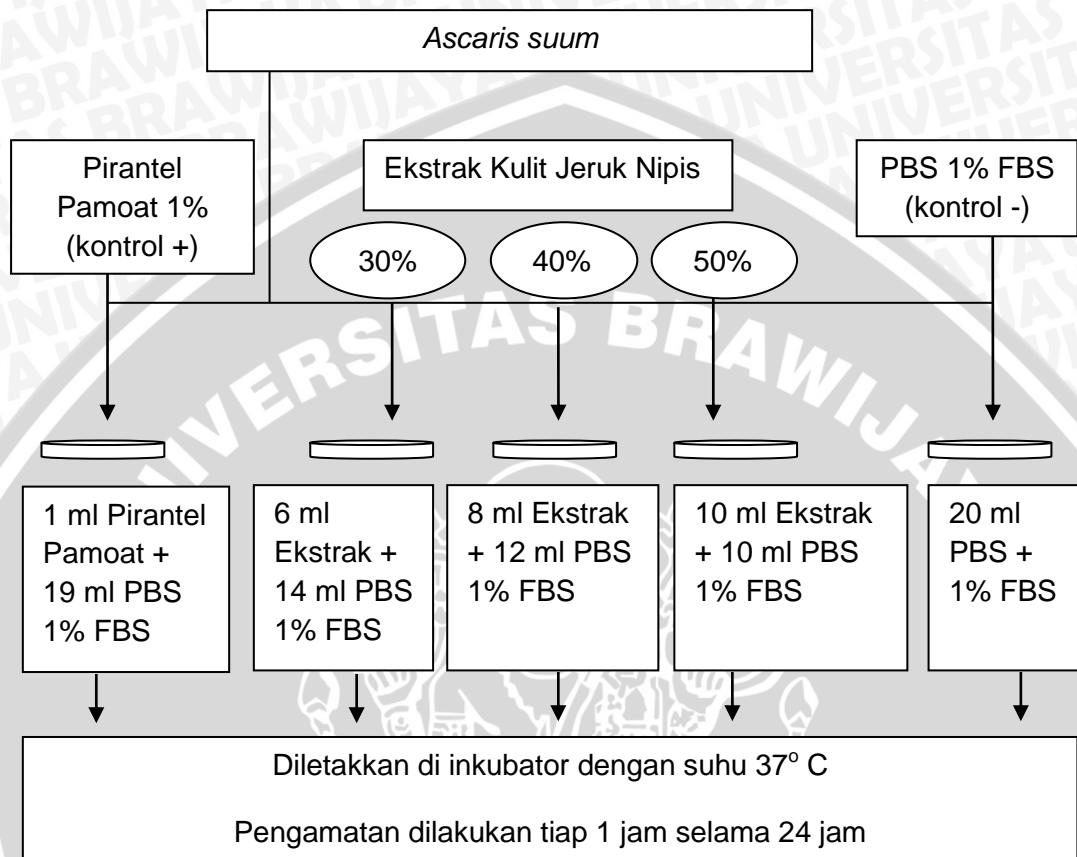
4.7.4 Langkah Penelitian

Menyiapkan sebanyak 25 cacing *Ascaris suum* yang masih hidup dan aktif bergerak. Lalu mempersiapkan konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis untuk dimasukkan ke dalam cawan petri sebesar 30%, 40%, 50%, dan sebelumnya

sudah dilakukan penghangatan terlebih dahulu di inkubator pada suhu 37°C kurang lebih 15 menit. Lalu mempersiapkan larutan PBS dengan 1% FBS untuk kontrol negatif. Masukkan cacing *Ascaris suum* masing-masing sebanyak 5 ekor ke dalam cawan petri yang sudah dipersiapkan terlebih dahulu. Meletakkan cawan petri yang sudah berisi cacing *Ascaris suum* ke dalam inkubator pada suhu 37°. Setelah itu setiap 1 jam sampai jam ke 24 dengan mengambil cawan petri lalu melihat apakah cacing *Ascaris suum* masih hidup. Menentukan apakah masih hidup atau mati dengan cara memasukkan cacing tersebut ke dalam rendaman air hangat suhu (40°C) dan dilihat apakah ada gerakan aktif atau tidak pada cacing tersebut. Cacing yang sudah mati dinyatakan dengan tidak adanya gerakan ketika dimasukkan ke air hangat. Catat hasil yang diperoleh dan ulang penelitian sebanyak 4 kali ulangan.



4.7.5 Skema Alur Kerja Penelitian



4.8 Pengolahan dan Analisa Data

Masing-masing kelompok akan memiliki sampel sebanyak 5 sampel. Untuk menentukan apakah hasil penelitian ini bermakna atau tidak, data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik dengan Analisis Probabilitas (Analisa Probit) dan syarat dari analisa probit adalah distribusinya normal dan untuk mengetahui distribusi data normal bisa menggunakan uji kolmogorov-Smirnov. Kemudian untuk mengetahui ada atau tidak hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan banyaknya cacing dilakukan uji kolerasi pearson untuk sebaran data normal dan uji kolerasi spearman (untuk sebaran data tidak normal). Selanjutnya

data dianalisa menggunakan analisa probit untuk mencari LC_{100} dan LT_{100} .

Analisa statistik menggunakan program mini tab 15.

