

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

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only control group design*) dengan tujuan untuk mengetahui daya antihelmintik ekstrak etanol daun asam jawa (*Tamarindus indica*) terhadap cacing *Ascaris suum*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi penelitian ini adalah 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* yang aktif bergerak

Cacing *Ascaris suum* yang utuh

Eksklusi

Cacing yang mengalami trauma mekanik saat akan dimasukkan ke cawan petri

Penentuan besar sampel dihitung dengan rumus Federer:

Keterangan:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

Karena penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka:

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75$$

(Hanafiah, 2001)

a) Jumlah sampel

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 perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan pada penelitian ini minimal adalah 4 kali. Jadi, penelitian ini menggunakan 5 kelompok sampel dan 4 kali

pengulangan dan jika setiap perlakuan membutuhkan 5 sampel, maka jumlah sampel keseluruhan yang dibutuhkan adalah 100 sampel.

b) Pengelompokan Sampel

Penelitian ini meliputi tiga perlakuan dengan satu kontrol negatif (-) dan satu kontrol positif (+) yaitu:

1. Kontrol (-) : Larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) + 1% FBS
2. Kontrol (+) : Pirantel Pamoat dalam bentuk bubuk (*Combantrine* 1%)
3. Perlakuan I : 50 ml ekstrak etanol daun asam jawa + 50 ml larutan PBS +1%FBS
-> Larutan ekstrak etanol daun asam jawa 50%
4. Perlakuan II : 40 ml ekstrak etanol daun asam jawa + 60 ml larutan PBS +1%FBS -> Larutan ekstrak etanol daun asam jawa 40%
5. Perlakuan III : 30 ml ekstrak etanol daun asam jawa + 70 ml larutan PBS +1%FBS -> Larutan ekstrak etanol daun asam jawa 30%

Konsentrasi daun asam jawa diberi tambahan *aseton* 1% sebagai *emulsifier* agar ekstrak etanol daun asam jawa dapat larut sempurna dalam larutan PBS + 1% FBS. Tiap kelompok membutuhkan lima ekor cacing. Setiap kali percobaan terdiri atas tiga kelompok perlakuan dan satu kontrol negatif serta satu kontrol positif.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Brawijaya.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak etanol daun asam jawa pada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak etanol daun asam jawa (*Tamarindus indica*) dalam berbagai konsentrasi dan waktu.

4.5 Definisi Operasional

a. Daun asam jawa yang dapat dipakai untuk penelitian ini adalah daun asam jawa dengan spesifikasi daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yang diperoleh dari Balai Materia Medika, Malang.

b. Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa

Ekstrak etanol daun asam jawa adalah ekstrak yang dihasilkan dari daun asam jawa yang dikeringkan dengan teknik ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Proses pembuatan ekstrak mulai dari pengeringan sampai terbentuk ekstrak etanol dikerjakan oleh tenaga ahli di Politeknik Negeri Malang.

c. Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa

Konsentrasi ekstrak etanol daun asam jawa dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol daun asam jawa dari proses maserasi dengan satuan berat ekstrak etanol dalam gram per volume PBS +1%FBS sesuai konsentrasi yang telah ditentukan. Untuk mengetahui konsentrasi minimal yang diperlukan untuk membunuh cacing, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan.

d. Pengambilan sampel cacing

Ascaris suum diperoleh dari tempat pemotongan hewan di Gadang, Malang dengan kurun waktu kurang lebih dari satu jam setelah penyembelihan babi.

Selanjutnya cacing dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% dan dibawa ke Laboratorium Parasitologi untuk pemberian perlakuan.

e. Waktu kematian cacing adalah waktu yang dibutuhkan mulai dari pemberian perlakuan sampai matinya semua cacing dalam tiap inkubasi. Untuk melihat apakah cacing telah mati setelah diinkubasi cacing-cacing tersebut diusik dengan batang pengaduk. Jika cacing diam, dipindahkan kedalam air panas suhu 50°C. Apabila dengan diusik cacing tetap diam, berarti cacing tersebut telah mati dan jika masih bergerak hanya mengalami paralisis (Kendyartanto,2008).

f. *Lethal concentration 100 (LC₁₀₀)*

Dosis ekstrak etanol daun asam jawa efektif ditentukan dengan penghitungan *Lethal concentration 100 (LC₁₀₀)*. LC₁₀₀ adalah konsentrasi yang diperlukan untuk membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (IUPAC,2003).

4.6 Alat dan bahan Penelitian

1. Peralatan penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : cawan petri diameter 10 cm, batang pengaduk kaca, pinset gelas ukur, labu ukur, timbangan, toples, inkubator *thermo CO₂ 5%*, *Laminar Esco Airstream*, dan lain-lain.

2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun asam jawa konsentrasi 30%, 40%, 50% ; PBS +1% FBS konsentrasi 1%; Pirantel pamoat 1% dan cacing *Ascaris suum*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa

Pembuatan ekstrak etanol daun asam jawa dikerjakan oleh tenaga ahli di Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan Malang. Daun asam jawa diperoleh dari kebun tanaman obat keluarga di Balai Materia Medika. Daun asam jawa sebanyak 3000 gram dicuci bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan diangin-anginkan kemudian disimpan di ruangan khusus penyimpanan. Setelah 3 jam, daun dihaluskan menjadi serbuk dengan mesin penyerbuk dan disaring dan diperoleh serbuk daun asam jawa sebanyak 1000 gram.

- 1) Serbuk daun asam jawa ditambahkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml, diaduk selama 30 menit dan didiamkan 24 jam, setelah itu disaring dan diulang tiga kali.
- 2) Dari hasil penyaringan didapatkan ampas dan filtrat. Filtrat kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pemanas *water bath* dengan suhu 70°C. Dari proses ini didapatkan ekstrak etanol kental daun asam jawa.
- 3) Ekstrak etanol kental ini kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan *water bath* sambil terus diaduk.
- 4) Didapatkan ekstrak etanol daun asam jawa sebanyak 50 gram yang siap digunakan. Sumber : Materia Medika

4.7.2 Penentuan konsentrasi Larutan Uji

Penentuan konsentrasi larutan uji dilakukan berdasarkan hasil orientasi dan penelitian-penelitian terdahulu menggunakan tiga konsentrasi yaitu 30%, 40% dan 50%. Dalam 1x24 jam dilihat konsentrasi ekstrak etanol yang pertama kali

menimbulkan efek pada cacing. Dari hasil tersebut didapatkan konsentrasi minimal yang akan digunakan untuk penelitian akhir. Selanjutnya ditetapkan tiga konsentrasi ekstrak etanol yang akan digunakan untuk penelitian akhir dengan kelipatan dari konsentrasi minimal tersebut. Berikut cara kerja penetapan konsentrasi larutan uji:

- Larutan ekstrak etanol daun asam jawa ditimbang dengan satuan gram sehingga didapatkan berat ekstrak etanol sesuai dengan rancangan penelitian.
- Ditambahkan 100 ml larutan PBS +1%FBS.
- Didapatkan larutan ekstrak etanol daun asam jawa 40%, 30%, 20%.

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

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

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi larutan stok larutan lemak ekstrak etanol daun asam jawa

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 : Volume larutan yang harus dilarutkan (ml)

V_2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Sehingga perhitungan volume larutan stok yang harus dilarutkan untuk masing-masing konsentrasi adalah seperti berikut:

- A. Pembuatan konsentrasi 30%:

$$M_1 = 100\%$$

$$M_2 = 30\%$$

$$V_2 = 100\text{ml}$$

$$100 \times V_1 = 30 \times 100$$

$$V_1 = 30$$

Sehingga dalam larutan konsentrasi 20 gram per 100 ml, didapatkan 30 ml ekstrak etanol daun asam jawa dengan pelarut 100 ml PBS +1%FBS.

B. Pembuatan konsentrasi 40%:

$$M_1=100\%$$

$$M_2=40\%$$

$$V_2=100\text{ml}$$

$$100 \times V_1 = 40 \times 100$$

$$V_1 = 40$$

Sehingga dalam larutan konsentrasi 20 gram per 100ml, didapatkan 40ml ekstrak etanol daun asam jawa dengan pelarut 100ml PBS +1% FBS.

C. Pembuatan konsentrasi 50%:

$$M_1=100\%$$

$$M_2=50\%$$

$$V_2=100\text{ml}$$

$$100 \times V_1 = 50 \times 100$$

$$V_1 = 50$$

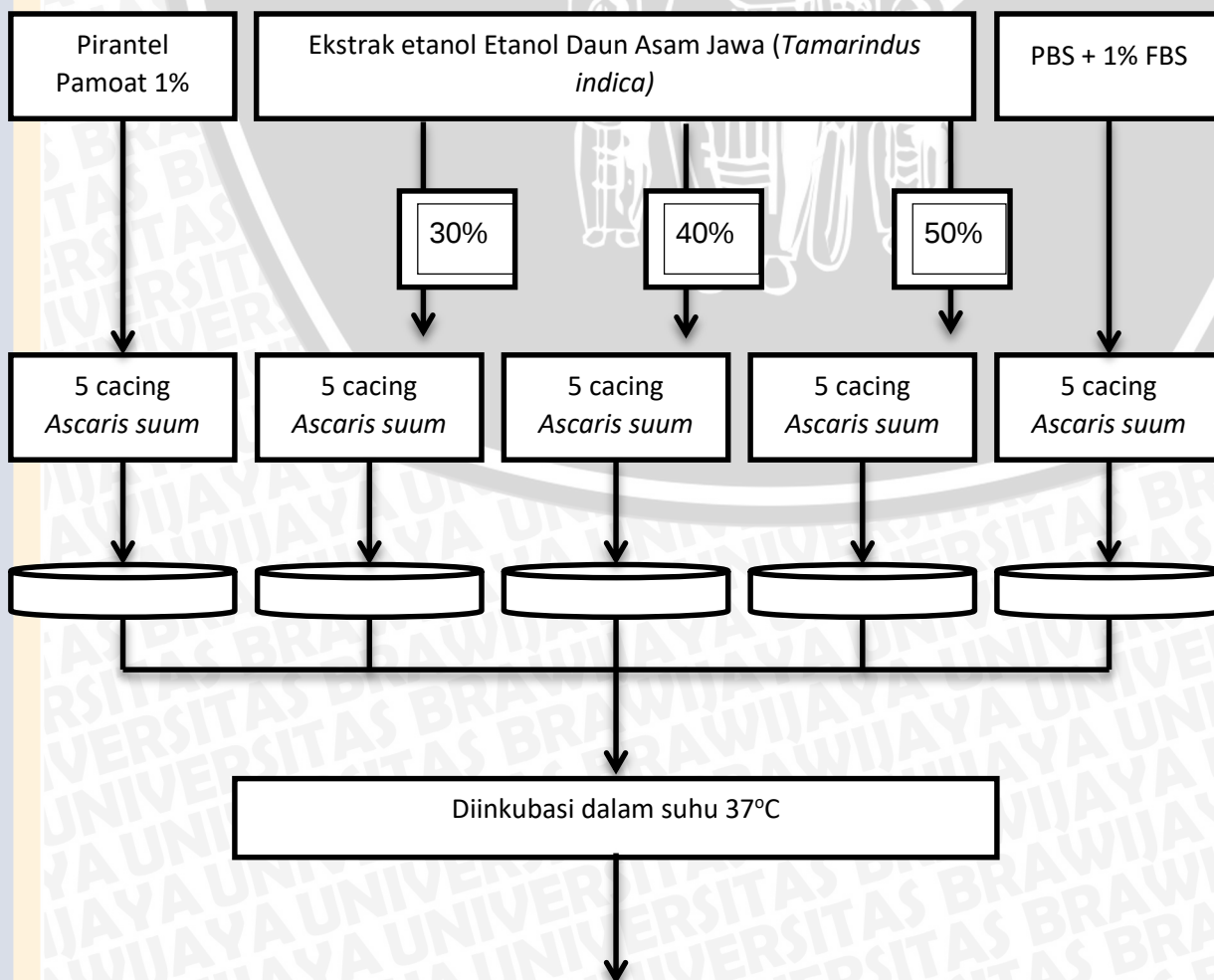
Sehingga dalam larutan konsentrasi 20 gram per 100ml, didapatkan 50ml ekstrak etanol daun asam jawa dengan pelarut 100ml PBS +1%FBS.

4.7.3 Langkah Penelitian

- 1) Didahulukan dengan menyiapkan 5 buah cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak etanol daun asam jawa sebanyak 20ml dalam konsentrasi 30%, 40% dan 50%, kontrol positif serta kontrol negatif yang terlebih dahulu dihangatkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama kurang lebih 15 menit.

- 2) Cacing *Ascaris suum* sebanyak 5 ekor ditaruh pada masing-masing cawan petri.
 - 3) Diinkubasi pada suhu 37°C
 - 4) Untuk melihat apakah cacing telah mati setelah diinkubasi, cacing-cacing tersebut diusik dengan batang pengaduk. Jika cacing diam, dipindahkan ke dalam air panas suhu 50°C. Apabila dengan diusik cacing tetap diam berarti cacing tersebut telah mati dan jika masih bergerak berarti cacing hanya mengalami paralisis.
- (Kendyartanto, 2008)
- 5) Hasil yang diperoleh dicatat.
 - 6) Penelitian dilakukan 4 kali pengulangan.

4.8 Diagram Alur Penelitian



4.9 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, jam ke-9 dan jam ke-24. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mencari kematian jumlah cacing. Jumlah cacing yang mati dihitung dan dimasukkan dalam tabel.

4.10 Analisis Data

Data jumlah kematian cacing setiap jamnya dianalisa menggunakan tabel dan grafik. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas datanya. Hasil uji kemudian dievaluasi secara statistik menggunakan metode analisa Probit dengan menggunakan program komputer SPSS untuk mengetahui LC_{100} dan LT_{100} ekstrak etanol daun asam jawa (*Tamarindus indica*).