

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium (*true eksperimental-post test only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui daya anthelmintik ekstrak daun kayu putih (*Malaleuca leucandendron*) terhadap *Ascaris suum* secara *in vitro*.

4.2 Lokasi Penelitian

Daun kayu putih yang dibutuhkan dalam penelitian ini diperoleh dari hutan kayu putih di Kupang, NTT. Proses ekstraksi daun kayu putih dilakukan di Politeknik Negeri Malang. Penelitian uji daya anthelmintik ekstrak daun kayu putih terhadap *Ascaris suum* secara *in vitro* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Ascaris suum sebagai sample penelitian ini diperoleh dari usus babi di Rumah Pemotongan Hewan di Kecamatan Gadang, Kabupaten Malang.

1. Kriteria inklusi :

Merupakan karakteristik umum yang harus dipenuhi subyek penelitian agar bisa ikut serta dalam penelitian (Nursalam, 2003). Pada penelitian ini kriteria inklusinya berupa cacing *Ascaris suum* yang masih aktif.

2. Kriteria eksklusi :

Merupakan hal-hal yang menyebabkan sampel tidak dapat diikuti sertakan dalam penelitian (Nursalam, 2003). Pada penelitian ini kriteria eksklusinya berupa cacing *Ascaris suum* yang sudah diam disaat memasuki cawan petri.

4.4 Metode Pengambilan Sample

Jumlah sample minimal setiap satu cawan petri ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$.

Keterangan:

n = besar sample

t = jumlah kelompok perlakuan

karena penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka:

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

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

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ (Hanafiah, 2001)}$$

Sehingga subyek minimal yang akan diperlukan untuk satu cawan petri adalah 5 ekor.

Besar pengulangan pada penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus :

$$p(n-1) \geq 16 \text{ (Tjokronegoro, 2001).}$$

keterangan: n = J umlah pengulangan

p = J umlah kelompok coba

Karena dalam penelitian ini menggunakan 5 kelompok coba, maka:

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$$n \approx 4$$

Jadi, jumlah pengulangan minimal yang akan diperlukan dalam penelitian ini adalah 4 kali. Tiap perlakuan masing-masing membutuhkan 5 ekor cacing, sehingga dalam

penelitian ini diperlukan 100 cacing. Dilihat pengaruhnya pada jam ke-1 sampai ke-11 dan jam ke-24.

4.5 Identifikasi Variabel

4.5.1 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak daun kayu putih pada konsentrasi tertentu.

4.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun kayu putih

4.6 Bahan dan alat

4.6.1 Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri diameter 10cm, pinset, gelas ukur, timbangan, toples, inkubator termo CO₂, laminar E sco Airstream, dll.

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kayu putih konsentrasi 20% , 30% , dan 40% , Pirantel pamoat 1% , NaCl 0.9% , dan *Ascaris suum*.

4.7 Definisi Operasional

- Ekstrak etanol daun kayu putih

Adalah ekstrak yang dihasilkan dari daun kayu putih yang dikeringkan dan diproses dengan metode maserasi, yaitu dengan direndam menggunakan etanol 96% selama periode waktu tertentu. Langkah kerjanya adalah merendam bahan dalam suatu wadah

menggunakan pelarut tertentu selama beberapa hari sambil sesekali diaduk, lalu disaring dan diambil larutannya.

- Cacing *Ascaris suum*

Adalah cacing gelang yang berada di dalam usus halus babi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan di Gadang. Sebelum dijadikan sampel penelitian dilakukan identifikasi morfologi cacing terlebih dahulu.

- Kontrol negatif

Adalah kelompok kontrol tanpa perlakuan. Dari kelompok kontrol negatif dapat diperoleh suatu *baseline* sehingga perubahan pada variabel terikat dapat terlihat. NaCl 0.9% merupakan larutan fisiologis yang digunakan sebagai kontrol negatif karena sifatnya yang isotonis dan tidak merusak membran sel cacing (Asri, 2006).

- Kontrol positif

Adalah kelompok perlakuan yang dapat menghasilkan efek atau perubahan pada variabel terikat. Pirantel pamoat digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan terapi lini pertama askariasis. Obat ini dapat membunuh cacing dengan cara menimbulkan depolarisasi pada otot cacing dan meningkatkan frekuensi impuls serta menghambat sekresi enzim asetilkolinesterase cacing. Selain itu, pirantel pamoat juga menghambat penyerapan glukosa secara ireversibel sehingga terjadi deplesi glikogen pada cacing (Octrie, 2008).

- Daya anthelmintik

Daya anthelmintik merupakan kemampuan ekstrak daun kayu putih dalam menimbulkan kematian pada *Ascaris suum*. Daya anthelmintik ditentukan dengan menghitung *Lethal Concentration* 100 dan *Lethal Time* 100 (Fabrianta, 2013), serta membandingkannya dengan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif dan Pirantel pamoat 1% sebagai kontrol positif (Mighra, 2007).

- Kematian cacing *Ascaris suum*

Parameter kematian cacing adalah tidak adanya respon saat disentuh dengan pinset, tidak bergerak ketika dimasukkan ke dalam air dengan suhu 50° C (Sen *et al.*, 2012). Pengamatan dilakukan tiap 1 jam (Budiyanti, 2010).

- *Lethal Concentration 100*

Lethal Concentration 100 adalah konsentrasi yang diperlukan untuk dapat membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (IUPAC, 2003)

- *Lethal time 100*

Lethal time 100 adalah waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 100% jumlah cacing pada konsentrasi tertentu (IUPAC, 2003)

4.8 Persiapan dan Prosedur Penelitian

4.8.1 Proses Ekstraksi Daun Kayu Putih

Proses maserasi dimulai dengan pengeringan dan penggilingan daun kayu putih agar mudah diekstrak, lalu simplisia daun kayu putih dicampur dengan etanol 96% dengan perbandingan satu banding empat dan dibiarkan sambil sesekali diaduk. Proses dilakukan dengan mengganti pelarut tiap 1x24 jam selama 3 hari. Hasil maserasi kemudian dikumpulkan dan disaring. Pemekatan dilakukan dengan menggunakan mesin *Rotary Evaporator* selama 30 menit (Sepdahlia, 2013). Penggunaan alat ini dipilih karena mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih. Dengan pemanasan 60°C maka senyawa terlarut tidak rusak oleh suhu, seperti pada penelitian Chet (2009) menunjukkan bahwa kandungan flavonoid optimal pada suhu 60°C dan berkurang pada suhu di atasnya.

4.8.2 Persiapan Larutan Uji

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dengan 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+). 3 perlakuan tersebut menggunakan konsentrasi 20%, 30%, dan 40% yang ditentukan dari hasil penelitian pendahuluan. Kontrol (+) menggunakan larutan pirantel pamoat 1%, serta larutan NaCl 0,9% sebagai control (-). Persiapan larutan uji sebagai berikut:

- Perlakuan I : 20 g ekstrak daun kayu putih + 100 ml larutan NaCl 0,9% –Larutan ekstrak daun kayu putih 20% .
- Perlakuan II : 30 g ekstrak daun kayu putih + 100 ml larutan NaCl 0,9% –Larutan daun kayu putih 30% .

- Perlakuan III: 40 g ekstrak daun kayu putih + 100 ml larutan NaCl 0,9% –Larutan daun kayu putih 40% .
- Kontrol (+) : 1 g pirantel pamoat + 100 ml NaCl 0,9% –larutan pirantel pamoat 1%
- Kontrol (-) : Larutan NaCl 0,9%

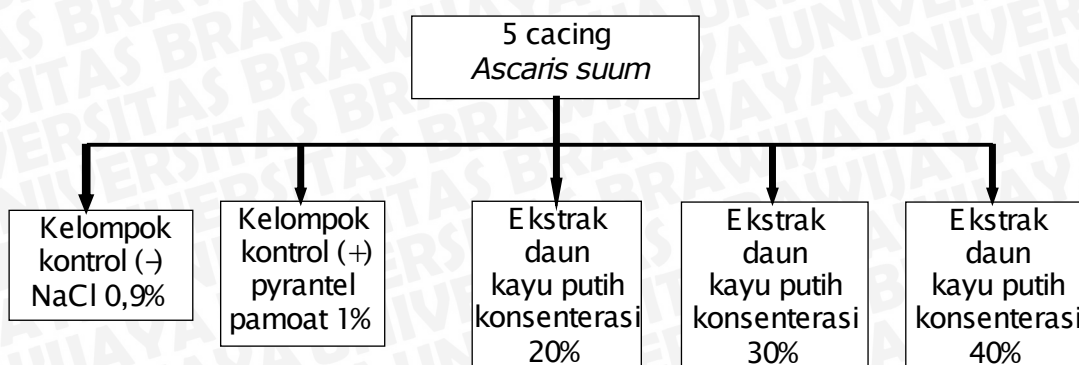
4.8.3 Persiapan *Ascaris suum*

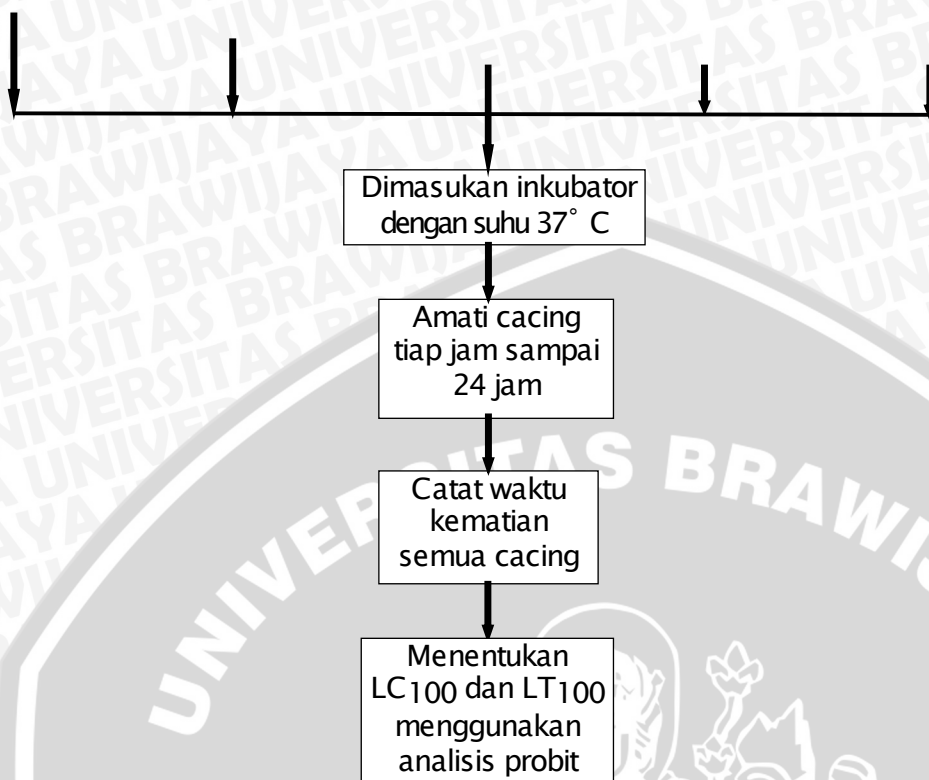
Ascaris suum yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari rumah pemotongan babi di Gadang. Cacing dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi rendaman larutan NaCl 0,9%.

4.8.4 Prosedur Penelitian

1. Siapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak daun kayu putih konsentrasi 20% , 30% 40% , dan pirantel 1% , serta NaCl 0,9% , kemudian dihangatkan terlebih dahulu dalam inkubator pada selama kurang lebih 15 menit.
2. Masukkan 5 ekor *Ascaris suum* ke dalam cawan petri dengan menggunakan pinset.
- 3.
4. Pengamatan dilakukan setiap 1 jam, dengan cara merendam cacing yang sudah tidak bergerak ke dalam rendaman air hangat 50° C, kemudian cacing disentuh dengan pinset. Jika cacing tidak bergerak maka cacing tersebut dinyatakan mati (Sen *et al.*, 2012)
5. Hasil yang diperoleh dicatat.
6. Penelitian ini dilakukan 4 kali ulangan.

4.9 Skema Alur Kerja Penelitian





4.10 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada jam ke-1 sampai jam ke-11 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.

4.11 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.

4.12 Analisis Data

Data hasil penelitian diolah dengan menggunakan analisis probit untuk mengetahui LC100 dan LT100 dari ekstrak etanol daun kayu putih.

