

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan menggunakan rancangan penelitian *the post test only controlled group design* (Hajar, 1996), yaitu rancangan penelitian yang dilakukan randomisasi pada sampel sehingga kelompok control dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan *pre-test*.

4.2. Lokasi Penelitian

Daun pepaya (*Carica papaya L.*) yang digunakan untuk melakukan penelitian ini didapat dari Balai Materia Medica Batu. Daun pepaya yang diekstraksi dalam penelitian ini adalah daun pepaya dari varietas pepaya Bangkok, daun yang digunakan antara ranting kedua sampai ranting kelima. Proses ekstraksi daun pepaya dilakukan di Politeknik Negeri Malang dengan menggunakan metode maserasi.

Penelitian uji efektifitas ekstrak etanol daun pepaya terhadap *Ascaris suum* secara *in vitro* ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tanggal 12 November 2013.

4.3. Subjek Penelitian

Subyek penelitian adalah *Ascaris suum* yang masih hidup ditandai dengan gerak aktif. Cacing ini diperoleh dari usus babi di tempat penyembelihan di kecamatan Gadang, Malang.

1. Kriteria Inklusi

Merupakan karakteristik umum yang harus dipenuhi dalam penentuan subjek penelitian yang akan diteliti agar bisa digunakan di dalam penelitian (Nursalam, 2003). Pada penelitian ini kriteria inklusi yang digunakan berupa:

1. Cacing jantan atau betina dewasa
 2. Cacing yang hidup
 3. Cacing yang tidak cacat (luka)
2. Kriteria Eksklusi

Merupakan hal-hal yang menyebabkan sampel yang masuk dalam kriteria tidak dapat diikutsertakan dalam penelitian (Nursalam, 2003).

Pada penelitian ini kriteria eksklusi yang digunakan berupa:

1. Cacing sudah diam saat akan dimasukkan ke dalam cawan petri
2. Cacing mengalami trauma mekanik saat akan dimasukkan ke dalam cawan petri

4.4. Metode Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan teknik *quota sampling* yaitu mengambil sampel berdasarkan jumlah minimal yang ditetapkan dengan menggunakan rumus. Hasil penghitungan dari rumus tersebut dapat dilihat di bawah ini.

Jumlah sampel ditetapkan dengan menggunakan rumus ini, yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$.

Keterangan :

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

Karena penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka:

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

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

$$(n-1)(5-1) > 15$$

$$4n > 20$$

$$n > 5$$

(Federer dalam Budiyantri, 2009)

Sehingga subyek minimal yang akan diperlukan untuk penelitian ini adalah 6 ekor.

perkiraan jumlah pengulangan yang akan dilakukan diperkirakan menggunakan rumus berikut, yaitu $p(n-1) \geq 16$.

Keterangan :

n = besar sampel

p = jumlah kelompok perlakuan

Karena penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka:

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4.2$$

$$n \approx 5$$

(Tjokronegoro, 2001)

Jadi, jumlah pengulangan minimal yang akan diperlukan untuk penelitian ini adalah 5 kali.

4.5. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah 3 seri konsentrasi ekstrak daun pepaya berdasarkan hasil dari penelitian pendahuluan

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kematian *Ascaris suum*.

3. Variabel luar

a. Variabel luar yang dapat dikendalikan meliputi:

- 1) Jenis cacing
- 2) Suhu percobaan
- 3) Umur tanaman daun papaya

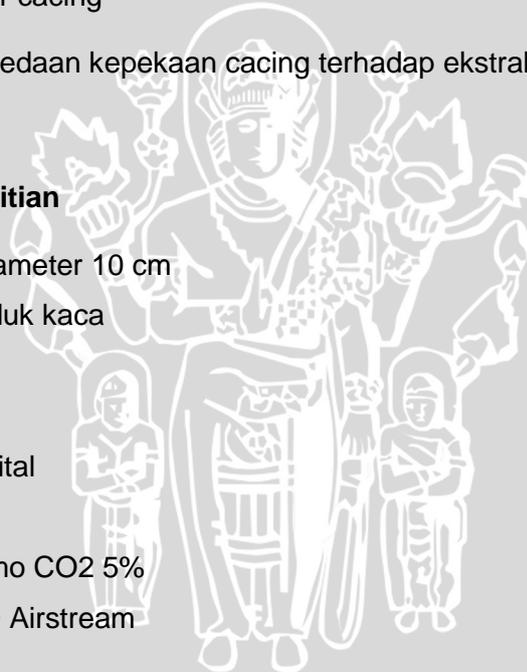
b. Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan yaitu:

- 1) Umur cacing
- 2) Perbedaan kepekaan cacing terhadap ekstrak yang diujikan

4.6. Bahan dan Alat

4.6.1 Peralatan Penelitian

1. Cawan petri diameter 10 cm
2. Batang pengaduk kaca
3. Labu ukur
4. Gelas ukur
5. Timbangan digital
6. Toples kaca
7. Incubator thermo CO2 5%
8. Laminar ESCO Airstream
9. Alkohol 70%
10. Thermometer
11. Pinset
12. Kompor listrik
13. Aquades
14. Spiritus
15. Korek api
16. Sendok stielis
17. Aluminium foil



4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaCl 0.9%, pirantel pamoate 0.01% dan ekstrak daun pepaya yang konsentrasinya didapat dari hasil penelitian pendahuluan.

4.7. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak Daun pepaya

Ekstrak daun pepaya yang digunakan merupakan hasil dari maserai etanol 96%, kemudian dilanjutkan dengan proses evaporasi. Serbuk daun pepaya didapat dari Materia Medika Batu, dan proses ekstraksi dilakukan di Politeknik Negeri Malang dengan menggunakan metode evaporasi (Yuswantina, 2009)

2. Subyek penelitian ini adalah cacing *Ascaris suum* yang diperoleh dari usus babi di tempat penyembelihan di kecamatan Gadang, Malang. Pengambilan cacing dilakukan pukul 06.00 WIB dikarenakan penyembelihan dilakukan pada saat itu juga. Cacing yang sudah diambil dimasukkan di dalam toples yang sudah diberi NaCl 0,9% dan penutup toplesnya diberi lubang agar ada sirkulasi udara. Waktu perjalanan yang dibutuhkan untuk sampai ke Lab. Parasit sekitar 15 menit dengan mengendarai sepeda motor.

3. Kontrol negatif

NaCl 0,9 pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol negative karena mempunyai sifat yang isotonis dan tidak merusak membrane sel pada tubuh cacing (Kuntari, 2009).

4. Kontrol positif

Pirantel pamoate 0,01% digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena pirantel pamoate dapat membunuh cacing dengan cara merusak struktur subseluler serta menghambat skresi asetilkolinesterase pada tubuh

cacing (Katzung, 2004)

5. Jumlah kematian cacing *Ascaris suum*

Jumlah kematian cacing *Ascaris suum* adalah jumlah cacing yang mati dalam tiap percobaan atau kelompok perlakuan. Parameter kematian cacing adalah tidak adanya respon gerakan ketika disentuh dengan pinset dan dimasukkan ke air dengan suhu 40° C. Pengamatan dilakukan tiap satu jam (Budiyanti, 2010). Penggunaan waktu 24 jam sebagai batas akhir pengamatan berdasarkan obat antihelmintik saat ini durasi kerjanya 24 jam (Gunawan, 2007).

6. *Lethal Concentracy 100* (LC₁₀₀)

Dosis ekstrak daun pepaya yang efektif ditentukan dengan penghitungan *Letal Concentracy 100* (LC₁₀₀). LC₁₀₀ adalah konsentrasi yang diperlukan untuk dapat membunuh 100% cacing pada waktu tertentu (IUPAC, 2006).

7. *Lethal Time 100* (LT₁₀₀)

LT₁₀₀ adalah waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 100% jumlah cacing pada konsentrasi tertentu (IUPAC, 2006). Pada penelitian ini, LT₁₀₀ digunakan untuk membandingkan efektivitas ekstrak daun pepaya dengan pirantel pamoate

4.8. Prosedur penelitian

1. Proses Ekstraksi Daun Pepaya

Proses maserasi ini dimulai dengan pemotongan kecil-kecil dan penggilingan daun pepaya untuk mempermudah proses pengeringan dan ekstraksi, kemudian simplisia daun pepaya dicampur dengan etanol 96% dengan perbandingan satu dibanding empat, campuran tersebut lalu dishaker selama 2 jam, lalu didiamkan selama 24 jam. Hasil shaker yang sudah didiamkan akan disaring dan diuapkan menggunakan mesin *Rotary Evaporator* selama 30 menit. Penggunaan ini *Rotary*

Evaporator menyebabkan pelarut etanol 96% menguap, sedangkan ekstrak daun pepaya mengendap, dengan pemanasan 40°C maka akan menjaga senyawa yang terlarut tidak akan rusak oleh suhu karena pelarut tidak mengalami pendidihan terlebih dahulu (Yuswantina, 2009).

2. Pembuatan ekstrak daun pepaya dalam berbagai konsentrasi

Hasil dari pembuatan ekstrak daun pepaya di atas memiliki konsentrasi 100%. Untuk mendapatkan berbagai nilai konsentrasi yang diinginkan, dilakukan pengenceran sesuai rumus berikut :

$$\% = \frac{w}{V} \times 100$$

(Seager and Slabaugh, 2010)

Keterangan: % = konsentrasi ekstrak

w = ekstrak yang dibutuhkan (gram)

V = volume total yang diinginkan (mililiter)

Dalam penelitian ini terdapat 2 kelompok yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dibagi 2, kontrol negatif dan kontrol positif. Untuk kelompok kontrol negatif digunakan NaCl 0.9% dan untuk kontrol positif digunakan pirantel pamoate 0.01%. Untuk kelompok perlakuan digunakan ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi 12.5%, 25% dan 50%.

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui interval konsentrasi yang tepat pada kelompok coba sebelum dilakukan penelitian yang sesungguhnya. Penentuan konsentrasi pada penelitian pendahuluan bersifat *trial and error*. Pada penelitian pendahuluan digunakan konsentrasi ekstrak daun pepaya 12.5%, 25% dan 50%. Jumlah cacing untuk masing-masing kelompok

perlakuan adalah 6 ekor. Dari penelitian pendahuluan didapatkan konsentrasi minimal yang dapat membunuh 100% cacing dalam 24 jam yaitu 25%. Kemudian dilakukan *step up* dan *step down* dari konsentrasi tersebut sebagai konsentrasi yang akan digunakan dalam eksperimen sesungguhnya yaitu 12.5%, 25% dan 50%.

3. Konsentrasi Larutan Pirantel pamoate

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi larutan pirantel pamoate sebesar 0,01%. Pembuatan larutan pyrantel konsentrasi 0,01% tersebut adalah sebagai berikut : Larutan pirantel konsentrasi 0,01 % = 0,01 mg pirantel pamoate + 100 ml cairan NaCL 0,9%.

Larutan Pirantel pamoate 0,01 % dan NaCL 0.9%

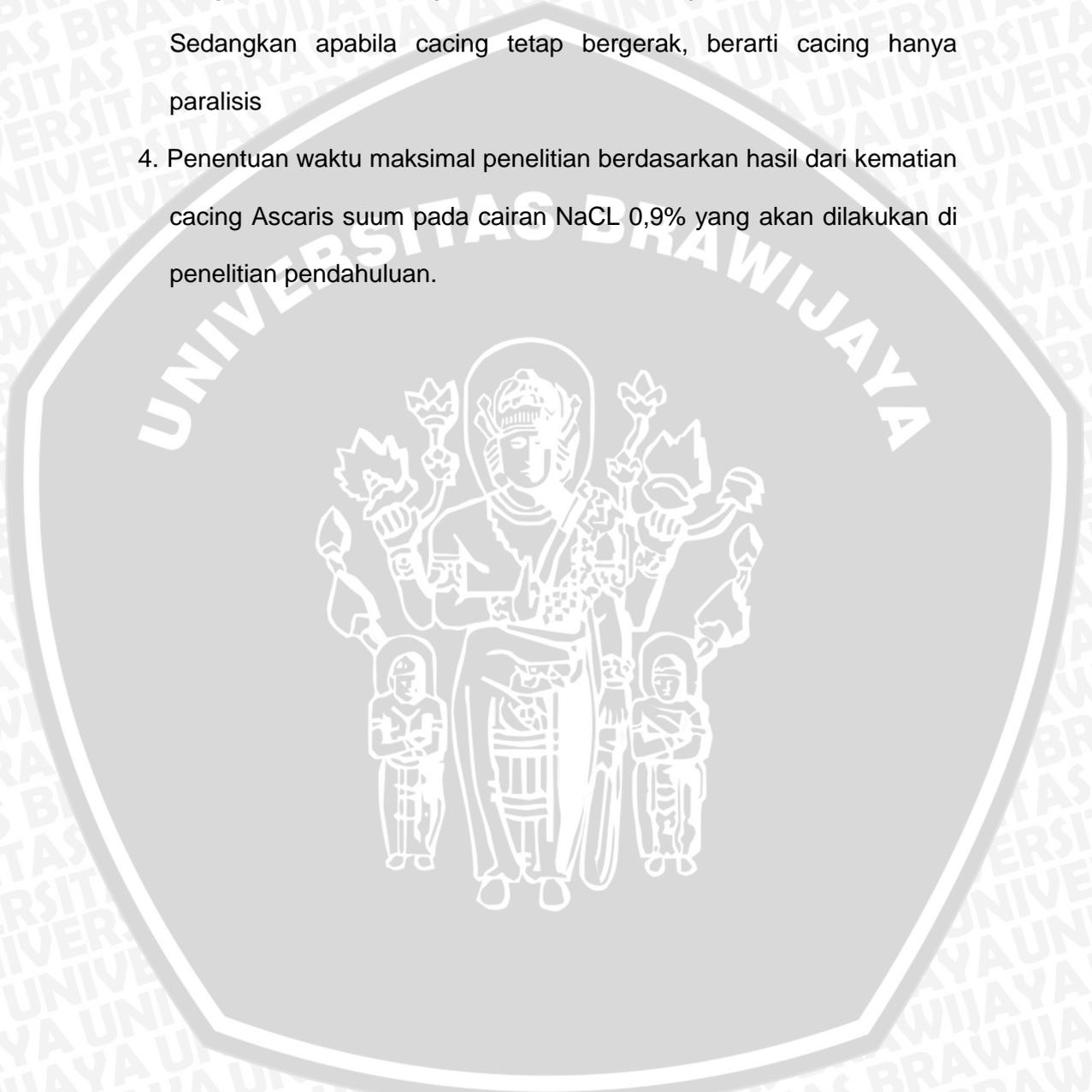
4. Pengamatan Cacing *Ascaris suum*

Prosedur penelitian ini adalah sebagai berikut. Cacing didapat dari lumen usus babi yang disembelih di rumah pemotongan hewan, Gadang. Penelitian ini memakai kontrol positif berupa pyrantel palmoate dan kontrol negative berupa cairan NaCl 0.9% .

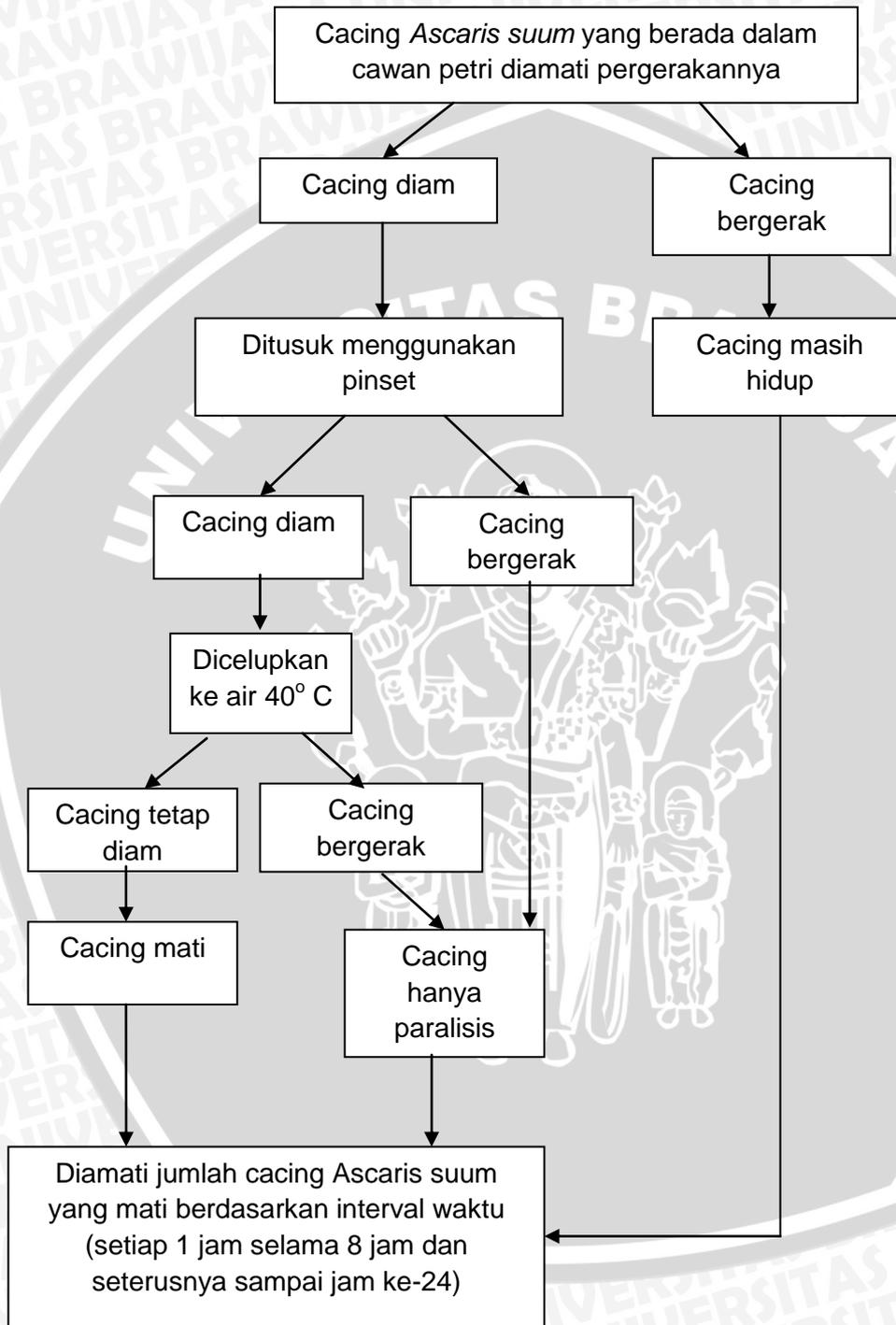
Masing-masing kelompok kemudian direplikasi sebanyak 5 kali dan setiap replikasi berisi 6 ekor cacing *Ascaris suum* yang direndam dalam 20 ml konsentrasi ekstrak daun Pepaya, larutan pirantel pamoate, dan larutan Nacl 0,9% sesuai dengan konsentrasi masing-masing.

1. Cawan petri masing-masing diberi ekstrak daun pepaya, *pirantel pamoate* sesuai konsentrasi masing-masing serta NaCl 0,9% yang telah dihangatkan dulu pada suhu 37°C
2. *Ascaris suum* dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri yang sudah disiapkan, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C

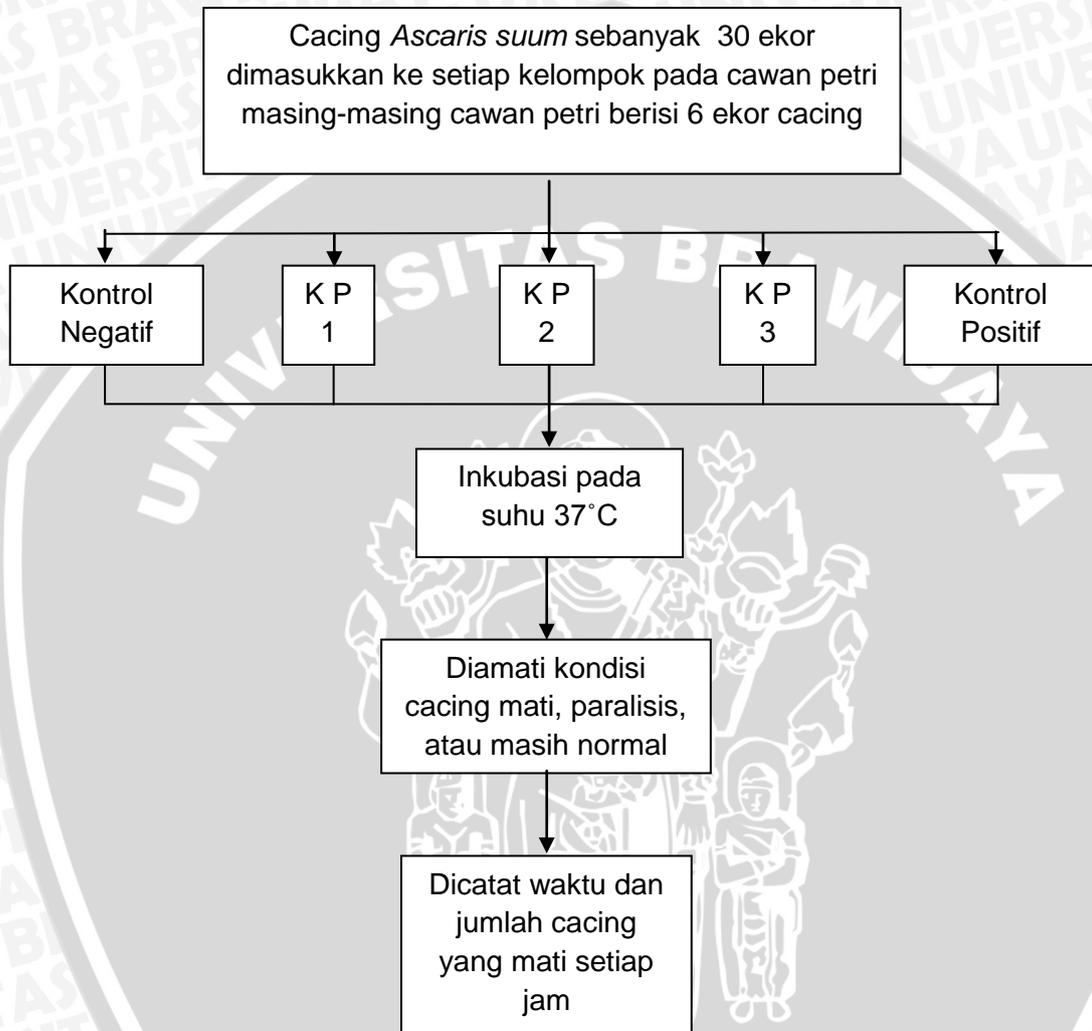
3. Cacing *Ascaris suum* kemudian diamati. Untuk melihat apakah cacing mati, paralisis atau masih normal, maka cacing diusik dengan batang pengaduk. Jika cacing diam, maka cacing tersebut telah mati. Sedangkan apabila cacing tetap bergerak, berarti cacing hanya paralisis
4. Penentuan waktu maksimal penelitian berdasarkan hasil dari kematian cacing *Ascaris suum* pada cairan NaCl 0,9% yang akan dilakukan di penelitian pendahuluan.



Cara untuk mengamati cacing *Ascaris suum* :



4.9. Alur Kerja Penelitian



Keterangan :

Kontrol Negatif : adalah cairan NaCl 0.9% fisiologis

KP 1-3 : adalah ekstrak etanol daun pepaya dengan konsentrasi 50%, 25% dan 12.5%.

Kontrol Positif : adalah larutan pirantel pamoate 0,01 %

4.10. Pengolahan dan Analisis Data

Rancangan penelitian ini termasuk dalam experimental murni dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Statistik yang digunakan untuk mencari perbedaan antara kelompok dengan lebih dari 2 kelompok adalah *One way ANOVA*, dengan syarat sebagai berikut :

1. Memeriksa syarat uji statistik anova untuk lebih dari dua kelompok tidak berpasangan
 - a. Sebaran data harus normal
 - b. Varians data harus sama
 - c. Observasi adalah independent yaitu nilai suatu observasi tidak berkaitan dengan nilai yang lain
 - d. Varians setiap kelompok sama dengan kelompok lain

Data-data dari hasil penelitian yang telah dikelompokkan dan dimasukkan ke dalam tabel, menggunakan *One-way ANOVA*. *Anova* digunakan untuk menganalisis apakah ada perbedaan persentase kematian cacing *Ascaris suum* dewasa antara lebih dari dua kelompok. Apabila didapatkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan analisis dengan uji *post hoc TUCKEY* untuk menguji kelompok mana saja yang memiliki perbedaan nyata. Kemudian dilanjutkan dengan analisis korelasi *Pearson*, dimana analisis ini untuk melihat kekuatan hubungan antara 2 variabel, yaitu konsentrasi larutan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) dengan jumlah kematian cacing *Ascaris suum*. Selain itu, turut dilakukan uji regresi linear. Untuk uji analisis *One – way ANOVA*, uji analisis *post hoc (LSD test)*, uji korelasi *Pearson* menggunakan fasilitas SPSS 15 dari Windows.