

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only control group design*) yang bertujuan untuk mengetahui daya ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) sebagai antihelmintik terhadap cacing *A. suum*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah cacing *A. suum*.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian yang diambil adalah cacing *A. suum* dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Inklusi :

Cacing *A. suum* jantan dan betina

Cacing *A. suum* yang masih aktif bergerak

Cacing *A. suum* yang tidak mengalami trauma mekanik

Eksklusi :

Cacing *A. suum* yang sudah tidak aktif

Cacing mengalami trauma mekanik saat akan dimasukkan ke cawan petri

4.2.3 Jumlah Sampel

Penelitian ini meliputi tiga disis perlakuan, yang didapatkan dari penelitian pendahuluan sebelumnya, dengan satu kontrol negatif (-) dan satu kontrol positif (+) yaitu :

- Kontrol (-) : Larutan NaCl 0,9%
- Kontrol (+) : Pirantel Pamoat dalam bentuk bubuk (*Combantrine* 1%)
- Perlakuan I : 20 gram ekstrak mimba + 100 ml larutan NaCl 0,9%
→Larutan ekstrak mimba 20%.
- Perlakuan II : 30 gram ekstrak mimba + 100 ml larutan NaCl 0,9%
→Larutan ekstrak mimba 30%.
- Perlakuan III : 40 gram ekstrak mimba + 100 ml larutan NaCl 0,9%
→Larutan ekstrak mimba 40%.

Tiap perlakuan membutuhkan lima ekor cacing. Setiap kali percobaan dibutuhkan tiga kali perlakuan dan satu kontrol negatif serta satu kontrol positif.

Maka perkiraan jumlah pengulangan yang akan dilakukan adalah :Dengan rumus:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \approx 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok coba

n = jumlah pengulangan

Jadi, jumlah pengulangan yang akan diperlukan untuk penelitian ini minimal adalah 4 kali.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2013.



4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah cacing *A. suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak daun mimba pada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak mimba (*Azadirachta indica*) dalam berbagai konsentrasi dan waktu.

4.5 Definisi Operasional

a. Daun Mimba

Daun mimba yang dapat dipakai untuk penelitian ini adalah daun mimba yang diperoleh dari Balai Materia Medica, Malang.

b. Ekstrak Daun Mimba

Ekstrak daun mimba adalah ekstrak yang dihasilkan dari daun mimba yang dikeringkan dengan teknik ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut ethanol 96%. Karena bahan aktif merupakan senyawa polar, sehingga lebih efektif, jika diekstraksi dengan pelarut polar. Proses pembuatan ekstrak mulai dari pengeringan sampai terbentuk ekstrak dikerjakan oleh tenaga ahli di Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan Malang.

c. Daya Anthelmintik

Daya anthelmintik ekstrak daun mimba, dihitung dari prosentase jumlah cacing yang mati. Jumlah kematian cacing adalah banyaknya cacing yang mati dalam tiap rendaman setelah diberi perlakuan.

d. Waktu Kematian Cacing

Waktu kematian cacing adalah waktu yang dibutuhkan mulai dari perlakuan sampai matinya semua cacing dalam tiap inkubasi. Untuk melihat apakah cacing telah mati setelah diinkubasi, cacing-cacing tersebut diusik di batang pengaduk.

Jika cacing diam, dipindahkan ke dalam air 50°C. Kemudian diusik lagi. Apabila cacing tetap diam, berarti cacing tersebut telah mati dan jika masih bergerak berarti cacing hanya mengalami paralisis (Kendyartanto, 2008).

e. *Lethal Concentracy 100* (LC100)

Dosis ekstrak daun mimba efektif ditentukan dengan penghitungan *Letal Concentracy 100* (LC100). LC100 adalah konsentrasi yang diperlukan untuk dapat membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (IUPAC,2003).

f. *Lethal Time 100* (LT100)

LT100 adalah waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 100% jumlah cacing pada konsentrasi tertentu (IUPAC, 2003). Pada penelitian ini, LT100 digunakan untuk membandingkan efektivitas ekstrak daun mimba dengan Pirantel pamoat.

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 daun mimba konsentrasi 20%, 30%, 40%, NaCl 0,9%, Pirantel pamoate 1% dan cacing *A. suum*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Mimba

Pembuatan ekstrak daun mimba dikerjakan oleh tenaga ahli di Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan Malang. Daun mimba diperoleh dari kebun

tanaman obat keluarga di Balai Materia Medika. Daun mimba sebanyak 1000 gram dicuci bersih, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan dengan dikering anginkan kemudian disimpan di ruang khusus penyimpanan. Kemudian, daun dihaluskan menjadi serbuk dengan mesin penyerbuk dan disaring dan diperoleh serbuk daun mimba sebanyak 100 gram.

- 1) Serbuk daun mimba ditambahkan pelarut ethanol 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 kental daun mimba.
- 3) Ekstrak kental ini kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan *water bath* sambil terus diaduk, hingga tidak tercium bau ethanol.
- 4) Didapatkan ekstrak daun mimba sebanyak 50 gr yang siap digunakan.

4.7.2 Penentuan Konsentrasi Larutan Uji

Penentuan konsentrasi larutan uji dilakukan berdasarkan hasil orientasi dan penelitian-penelitian terdahulu menggunakan lima konsentrasi yaitu 5%, 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%. Dari hasil tersebut didapatkan konsentrasi minimal yang akan digunakan untuk penelitian akhir. Selanjutnya ditetapkan tiga konsentrasi ekstrak yang akan digunakan untuk penelitian akhir dengan kelipatan dari konsentrasi minimal tersebut. Berikut cara kerja penetapan konsentrasi larutan uji :

- a) Larutan ekstrak daun mimba ditimbang dengan satuan gram sehingga didapatkan berat ekstrak sesuai dengan rancangan penelitian
- b) Ditambahkan 100 ml larutan NaCl 0,9%
- c) Didapatkan larutan ekstrak daun mimba 20%, 30%, dan 40%.

4.7.3 Langkah Penelitian

1) Didahulukan dengan disiapkan 3 buah cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak daun mimba sebanyak 20 ml dalam konsentrasi 20%; 30%; dan 40% yang terlebih dahulu dihangatkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama kurang lebih 15 menit.

2) Cacing *A. suum* sebanyak 5 ekor ditaruh pada masing-masing 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:

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

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

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

$$4n > 19$$

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

Sehingga subyek yang diperlukan adalah minimal 5 ekor.

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 pada suhu 50°C. Apabila dengandiusik cacing tetap diam, berarti cacing tersebut telah mati dan jikamasih bergerak berarti cacing hanya mengalami paralisis. (Kendyartanto, 2008)

5) Hasil yang diperoleh dicatat.

6) Penelitian dilakukan 4 kali pengulangan

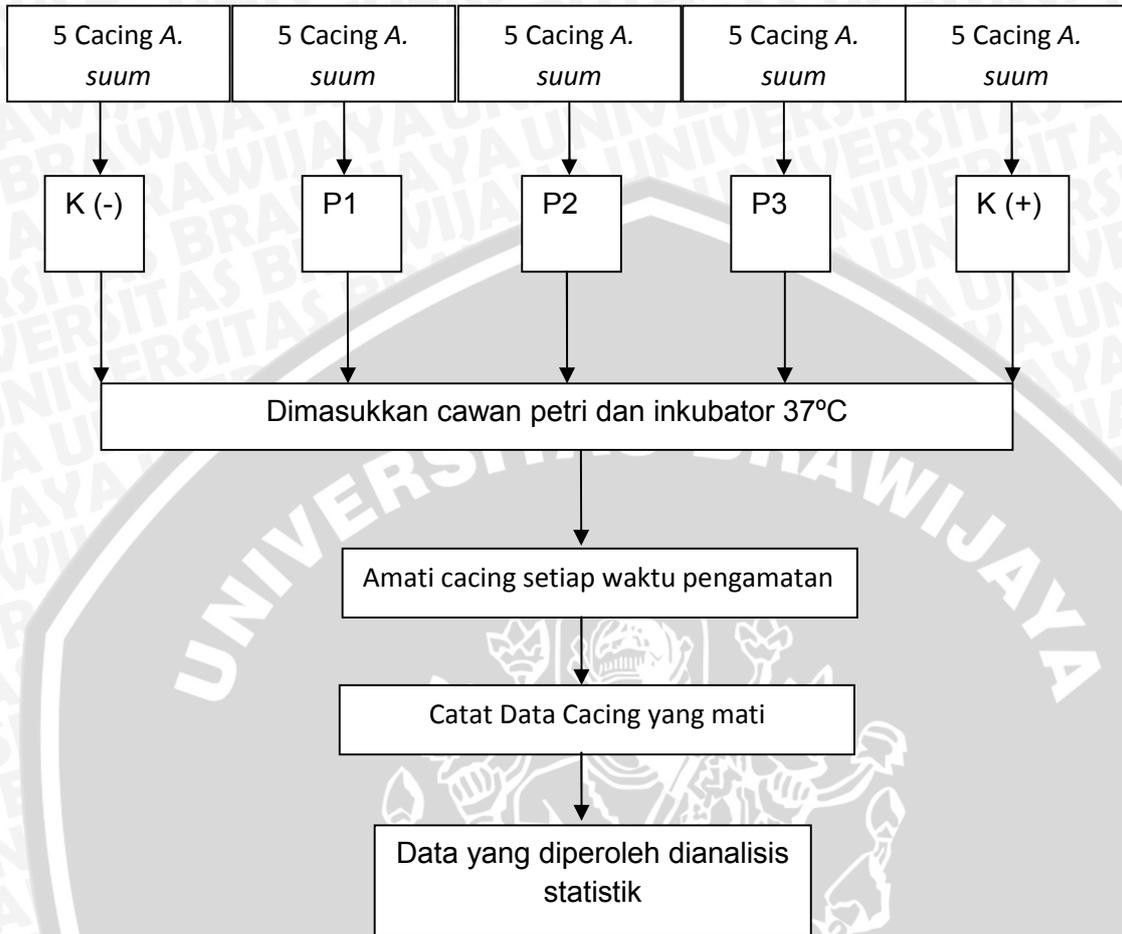
4.8 Pengamatan dan Pengumpulan Data

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, jam ke-10, jam ke-11 dan jam ke-24. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mencari kematian jumlah cacing. Jumlah cacing yang mati dihitung dan dimasukkan dalam tabel.

4.9 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 *IBM SPSS 22.0* untuk mengetahui LC100 dan LT100 ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) dan Pirantel Pamoat, sebagai Kontrol Positif.

4.10 Diagram alur kerja penelitian



Keterangan :

K(+) : Kontrol positif : Pirantel Pamoate

K(-) : Kontrol negatif : Larutan NaCl 0.9%

P1: konsentrasi 20 %

P2: konsentrasi 30 %

P3: konsentrasi 40 %

Gambar 4.1 Alur Penelitian