

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan ini menggunakan penelitian (*true eksperimental-post test only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui daya antelmintik ekstrak etanol bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) terhadap cacing *Ascaris suum*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini menggunakan 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* jantan dan betina
- Cacing *Ascaris suum* yang masih aktif

Eksklusi:

- Cacing *Ascaris suum* yang anggota tubuhnya terpotong atau tidak utuh
- Cacing *Ascaris suum* yang sudah mati

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dengan 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+) yaitu :

- Kontrol (-) :PBS (Phosphate Buffer Saline)
- Kontrol (+) :Pyrantel pamoat 1%
- Perlakuan I :6 ml ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) + 24 ml larutan PBS → Larutan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) 20%.
- Perlakuan II : 30 ml ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) + 21 ml larutan PBS → Larutan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) 30%.
- Perlakuan III : 12 ml ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) + 18 ml larutan PBS → Larutan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) 40%.

Maka 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 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 70 ekor dan dilihat pengaruhnya pada jam ke- 1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8 dan 24.

4.3 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L) pada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L) dengan berbagai konsentrasi 20%, 30% dan 40%% sejumlah tiga konsentrasi berbeda dan menentukan waktu paparan misalnya jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3 dan seterusnya.

4.5 Definisi Operasional

- Bunga kembang sepatu adalah bunga yang diperoleh dari kebun bunga di daerah Jembrana, Bali. Bunga yang digunakan adalah Bunga yang memiliki mahkota berwarna merah. Mahkota bunga terdiri dari 5 lembar atau lebih jika merupakan hibrida. Tangkai putik berbentuk silinder panjang dikelilingi tangkai sari berbentuk oval yang bertaburan serbuk sari. Bunga berbentuk terompet dengan diameter bunga sekitar 5 cm. hingga 20 cm. Putik (pistillum) menjulur ke luar dari dasar bunga.
- Cacing *Ascaris suum* adalah cacing gelang yang umumnya berada di dalam usus halus babi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan Kabupaten Malang
- *Lethal concentration* adalah dosis minimal yang menimbulkan kematian cacing 100% pada 24 jam pertama.
- *Lethal time* adalah presentasi kematian cacing dalam waktu 24 jam.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah

A. Alat untuk ekstraksi dan evaporasi ekstrak bunga kembang sepatu:

- Alat penggerus / blender
- Corong gelas
- Gelas ukur
- Labu erlemeyer atau beaker glass (dengan volume 1 liter) untuk merendam ekstrak bunga kembang sepatu.
- 1 set alat evaporasi: labu penampung, pendingin spiral, labu rotasi ekstraksi, waterbath dan vakum, klem statis, selang plastic, water pump, bak penampung aquadest dan tabung pemisah hasil ekstraksi.
- Oven
- Neraca analitik

B. Alat-alat untuk uji potensi anti helmintik :

- Cawan petri diameter 10 c
- Batang pengaduk kaca
- Pinset
- Gelas ukur
- Labu ukur
- Timbangan
- Toples untuk menyimpan cacing
- Inkubator Thermo CO2 5%
- PBS (Phosphate Buffer Saline)
- FBS (Fetal Bovine Serum)

- Larutan uji konsentrasi 20%, 30% dan 40%%
- Pyrantel pamoat (Combantrin) 10%

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Bunga kembang sepatu
- Etanol 80% sebagai pelarut ekstrak
- Larutan ekstrak bunga kembang sepatu
- Cacing *Ascaris suum*

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*)

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya (Devi,2009). Bunga kembang sepatu yang digunakan adalah Bunga yang memiliki mahkota berwarna merah. Bunga kembang sepatu dikeringkan kemudian diserbuk. Serbuk bunga kembang sepatu dimaserasi menggunakan ethanol 80% dengan perbandingan 1:3 (Farmakope Indonesia), diaduk selama 3 jam. Setelah proses pengadukan selesai lalu didiamkan dan direndam selama 1 malam, kemudian dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan pengurangan tekanan sampai dihasilkan ekstrak kental berupa pasta.(Devi,2009).

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Penyiapan Larutan

Cairan pelarut ekstrak bunga kembang sepatu yang digunakan adalah PBS. Larutan stok ekstrak bunga kembang sepatu dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji.

4.7.2 Penyiapan Larutan Uji

Ekstrak pekat bunga kembang sepatu yang tersimpan di lemari es disesuaikan suhunya dengan suhu kamar dengan cara membiarkan di udara kamar selama 15 menit dan dianggap konsentersasi 100%. Selanjutnya untuk mendapatkan 100 ml larutan dilakukan pengenceran dengan cara 50 ml ekstrak bunga kembang sepatu 100% ditambah dengan 50 ml pelarut PBS.

Pembuatan larutan untuk perlakuan dibuat dengan mengencerkan larutan stok tadi kepada konsentersasi yang diinginkan dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

M_1 :Konsentrasi larutan stok larutan ekstrak bunga kembang sepatu

M_2 :Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 :Volume larutan stok yang harus dilarutkan (ml)

V_2 :Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 30 ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan aquades sampai mencapai volume 30 ml.

4.7.3 Persiapan Cacing *Ascaris suum*

Cacing *Ascaris suum* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari pemotongan babi di daerah Gadang, Kabupaten Malang. Cacing yang telah diidentifikasi dengan ciri morfologi berbentuk bulat panjang, panjang tubuh cacing dewasa jantan 15-25 cm, sedangkan cacing dewasa betina memiliki panjang 20-40cm. Cacing yang telah diidentifikasi sebelumnya dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi rendaman larutan NaCl 0,9%.

4.7.4 Langkah Penelitian

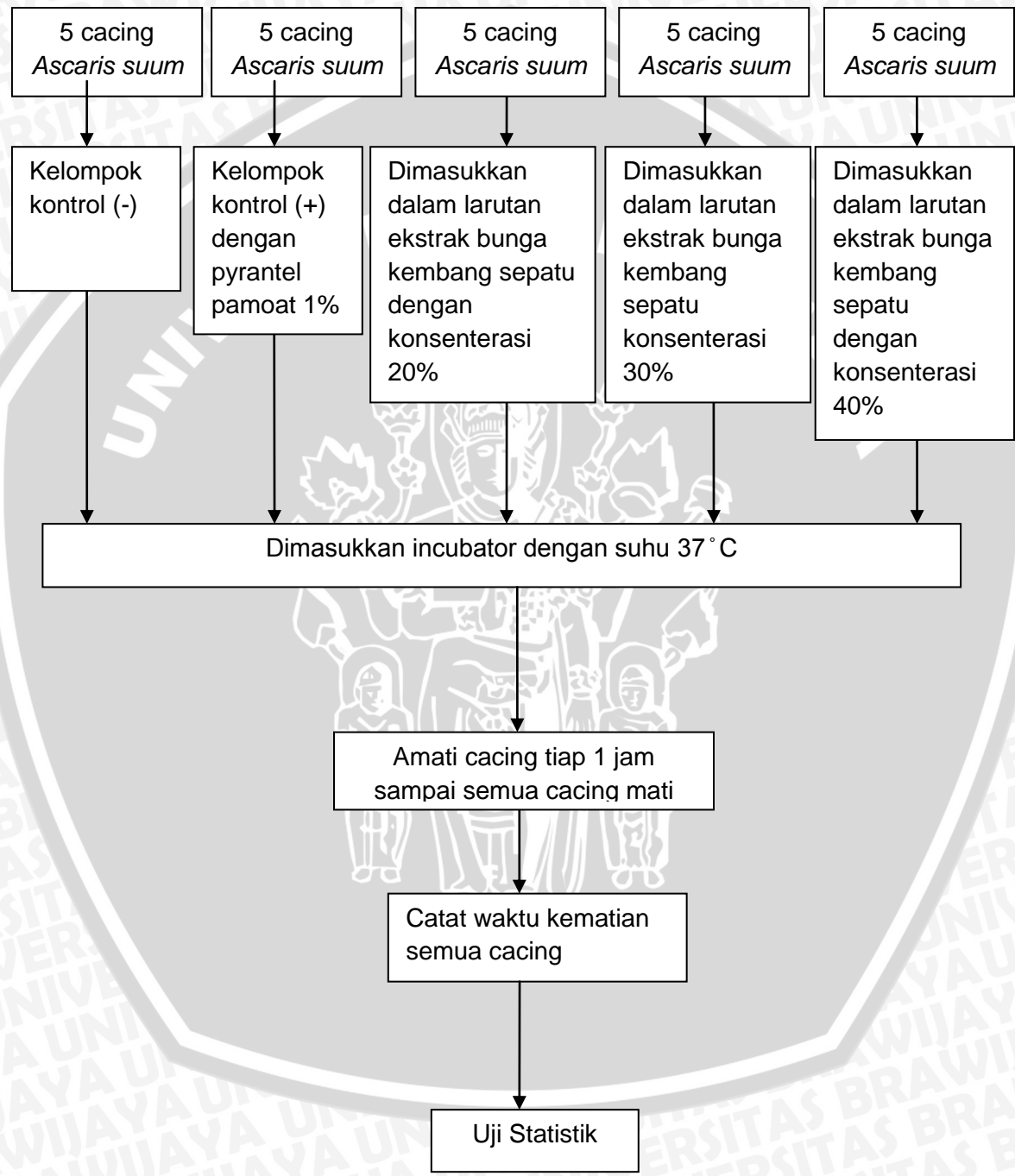
1. Siapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak bunga kembang sepatu konsentrasi 20%, 30% dan 40% kemudian dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37° C dalam incubator kurang lebih 15 menit.
2. Masukkan 5 ekor cacing *Ascaris suum* ke dalam cawan petri dengan menggunakan pinset yang sudah steril.
3. Diinkubasi pada suhu 37° C.
4. Pengamatan dilakukan setiap 1 jam, dengan cara merendam cacing ke dalam rendaman air hangat (37°C) kemudian cacing disentuh

dengan pinset. Jika cacing tidak bergerak maka cacing tersebut dinyatakan mati.

5. Hasil yang diperoleh dicatat.
6. Penelitian ini dilakukan 4 kali ulangan.



4.7.5 Skema Alur Kerja Penelitian



4.7.6 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 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.

4.7.7 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.

4.7.8 Analisis Data

Data jumlah kematian cacing *Ascaris suum* setiap jamnya dianalisis menggunakan tabel dan grafik. Hasil uji dievaluasi secara statistik menggunakan metode analisa probit dengan menggunakan program *Mini tab* untuk mengetahui adanya hubungan dan pengaruh ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L*) terhadap kematian cacing *Ascaris suum*.