

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan ini menggunakan penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only controlled group design*), yang bertujuan untuk mengetahui daya antihelmintik ekstrak kulit buah melinjo (*Gnetum gnemon L*) terhadap cacing *Ascaris suum*, Goeze.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini menggunakan cacing *Ascaris suum*, Goeze.

4.2.2 Sampel

Cacing *Ascaris suum* sebagai sampel 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 atau populasi agar dapat diikutsertakan dalam penelitian (Kemenkes, 2012). Pada penelitian ini kriteria inklusinya berupa :

1. Cacing jantan atau betina
2. Cacing yang aktif bergerak
3. Cacing dengan kondisi tubuh yang utuh

2. Kriteria Eksklusi

Merupakan keadaan yang menyebabkan subyek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi tetapi tidak dapat diikutsertakan dalam penelitian (Kemenkes, 2012).

Pada penelitian ini kriteria eksklusinya adalah :

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

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

Keterangan :

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

karena penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka :

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

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

$$4n > 19$$

$$n > 4,75$$

(Pratiwi, 2011)

Sehingga subyek minimal yang akan diperlukan untuk satu cawan petri adalah 5 ekor. Jumlah pengulangan yang akan dilakukan menggunakan rumus berikut :

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

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

$$5n-5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$$n = 4$$

Keterangan :

P = jumlah kelompok coba

n = jumlah pengulangan

(Aulia, 2011)

Jadi jumlah pengulangan minimal yang akan diperlukan untuk penelitian ini adalah 4 kali sehingga total cacing yang diperlukan adalah 100 cacing.

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 ekstrak kulit buah melinjo (*Gnetum gnemon L*) pada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah melinjo (*Gnetum gnemon L*) dengan konsentrasi 30%, 40%, dan 50%, sejumlah tiga konsentrasi berbeda dan menentukan waktu paparan misalnya jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3, sampai dengan jam ke-24.

4.5 Definisi Operasional

- Daya antihelmintik adalah kemampuan suatu obat untuk memberantas atau mengurangi cacing di dalam lumen usus atau jaringan tubuh.
- Kulit buah melinjo (*Gnetum gnemon L.*) yang digunakan adalah kulit buah yang berwarna kuning hingga merah kemudian di keringkan. Kulit buah melinjo diperoleh dari perkebunan di Serang, Banten.
- Cacing *Ascaris suum* adalah cacing gelang yang umumnya berada di dalam usus halus babi yang diperoleh dari tempat penyembelihan hewan di Kecamatan Gadang, Kabupaten Malang.
- *Lethal concentration* adalah jumlah konsentrasi ekstrak kulit buah melinjo (*Gnetum gnemon, L*) yang dibutuhkan untuk membunuh sejumlah cacing dalam waktu tertentu. Dalam penelitian ini digunakan LC₁₀₀ atau jumlah konsentrasi untuk membunuh 100% cacing (Peter, 2005)
- *Lethal time* adalah waktu yang dibutuhkan ekstrak kulit buah melinjo (*Gnetum gnemon, L*) untuk membunuh sejumlah cacing dengan konsentrasi tertentu. Dalam penelitian ini digunakan LT₁₀₀ atau waktu yang dibutuhkan untuk membunuh 100% cacing. LT₁₀₀ digunakan untuk membandingkan efektivitas ekstrak kulit buah melinjo dengan pirantel pamoat (Peter, 2005)

- Waktu kematian cacing adalah waktu matinya semua cacing dalam tiap rendaman setelah pemberian perlakuan. Cacing dianggap mati apabila cacing tidak bergerak secara aktif saat dimasukkan ke dalam air dengan suhu 50 °C.
- Pengamatan kematian cacing *Ascaris suum* dilakukan selama 24 jam.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Cawan petri berdiameter 10 cm
- Pinset
- Neraca Analitik
- Toples
- Inkubator thermo CO2 5%
- Laminar Esco Airstream
- Mortar

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah melinjo konsentrasi 30%, 40%, 50%, FBS 1% dalam PBS, pirantel pamoat 1%, dan cacing *Ascaris suum*.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

1. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Melinjo

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). Kulit buah melinjo yang digunakan adalah kulit yang berwarna merah. Kulit buah melinjo dikeringkan kemudian diserbuk. Serbuk Kulit buah melinjo 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.

2. Konsentrasi Larutan Ekstrak Etanol Kulit Buah Melinjo yang Digunakan

Konsentrasi larutan ekstrak etanol kulit buah melinjo yang digunakan adalah 30%, 40%, dan 50% dan diamati tiap 1 jam. Pembuatan konsentrasi untuk larutan ekstrak etanol kulit buah melinjo sebagai berikut:

Ekstrak pekat kulit buah melinjo 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 kulit buah melinjo 100% ditambah dengan 50 ml pelarut.

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 kulit buah melinjo

- 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 20 ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan PSB yang mengandung 1% FBS sampai mencapai volume 20 ml.

Konsentrasi I : 6 ml ekstrak kulit buah melinjo + 14 ml FBS 1% dalam PBS = Larutan ekstrak kulit buah melinjo 30%

Konsentrasi II : 8 ml ekstrak kulit buah melinjo + 12 ml FBS 1% dalam PBS = Larutan ekstrak kulit buah melinjo 40%

Konsentrasi III : 10 ml ekstrak kulit buah melinjo + 10 ml FBS 1% dalam PBS = Larutan ekstrak kulit buah melinjo 50%

3. Konsentrasi larutan pirantel pamoat

Pada penelitian ini digunakan larutan Pirantel pamoat sebesar 1%. Pembuatan larutan pirantel pamoat 1 % tersebut adalah sebagai berikut : 0,2 ml pirantel pamoat + 19,8 ml FBS 1% dalam PBS.

4. Pengamatan Cacing *Ascaris suum*

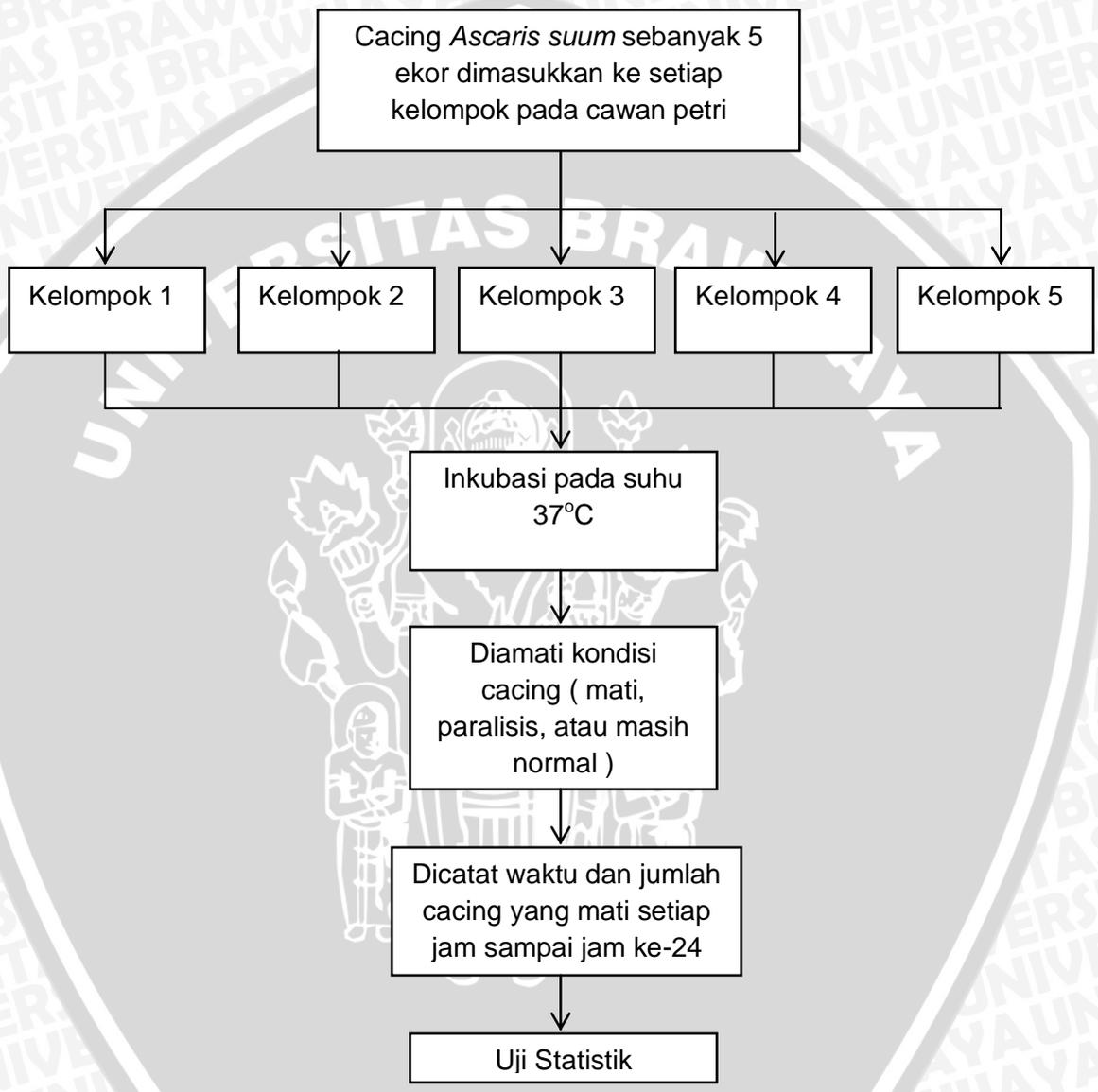
Prosedur penelitian ini adalah sebagai berikut : sampel diambil dari lumen usus babi potong. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok percobaan yakni kelompok 1, 2, dan 3 adalah ekstrak kulit buah melinjo dengan konsentrasi masing - masing 30%, 40%, dan 50%. Kelompok 4 adalah pirantel pamoat 1% yang merupakan kontrol

positif. Kelompok 5 adalah larutan FBS 1% dalam PBS yang merupakan kontrol negatif.

Masing – masing kelompok kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dan setiap pengulangan berisi 5 ekor cacing *Ascaris suum* yang direndam dalam 20 ml ekstrak kulit buah melinjo, larutan pirantel pamoat dan larutan FBS 1% dalam PBS sesuai dengan konsentrasi masing – masing.

1. Cawan petri masing-masing diberi ekstrak kulit buah melinjo sesuai dengan konsentrasi masing – masing, pirantel pamoat, serta FBS 1% dalam PBS yang telah dihangatkan dulu pada suhu 37°C.
2. *Ascaris suum* sejumlah 5 ekor dimasukkan ke dalam masing – masing cawan petri yang sudah disiapkan, kemudian di inkubasi dengan suhu 37°C
3. Cacing *Ascaris suum* kemudian diamati. Untuk melihat apakah cacing mati, paralisis atau masih normal, maka cacing diusik dengan pinset. Jika pada saat diusik cacing tidak bergerak, maka cacing tersebut dimasukkan ke dalam air dengan suhu 50°C. Jika cacing tidak bergerak pada suhu 50°C, maka cacing tersebut telah mati. Sedangkan apabila cacing bergerak, berarti cacing hanya paralisis.

4.8 Skema Alur Kerja Penelitian



Keterangan :

Kelompok 1 : konsentrasi 30%

Kelompok 2 : konsentrasi 40%

Kelompok 3 : konsentrasi 50%

Kelompok 4 : larutan kontrol positif pirantel pamoat 1%

Kelompok 5 : larutan kontrol negatif FBS 1% dalam PBS

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Rancangan penelitian ini termasuk dalam *experimental murni* dengan rancangan penelitian *post-test only control group design*. Pada penelitian ini digunakan analisa probit untuk mencari LC_{100} dan LT_{100} dari ekstrak kulit buah melinjo. Hingga sekarang metode probit analisis masih menjadi metode statistik pilihan untuk metode *dose response relationship* (Vincent 2008). Syarat dari uji probit adalah distribusinya normal. Untuk mengetahui distribusi data normal atau tidak, dapat digunakan uji Shapiro-Wilk. Uji ini lebih akurat dibandingkan dengan uji Kolmogorov-Smirnov jika jumlah data kurang dari 50. Analisis statistik diolah dengan menggunakan program MINI TAB 17.