

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental - post test only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui daya antihelmintik ekstrak etanol bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap cacing *Ascaris suum* secara in vitro.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi penelitian ini adalah cacing *Ascaris suum* yang diambil dari Pasar Gadang, Malang.

4.2.2 Sampel

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

Inklusi:

- Cacing *Ascaris suum* jantan atau betina
- Cacing *Ascaris suum* yang masih aktif

Eksklusi:

- Cacing *Ascaris suum* yang cacat

4.2.3 Teknik Sampling

Pengambilan sampling dilakukan dengan cara *simple random sampling*. Sampel dikumpulkan semua, kemudian secara acak sederhana diambil sesuai dengan kebutuhan, yaitu 25 ekor cacing *Ascaris suum*.

4.3 Teknik Pengulangan

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dengan satu kontrol negatif dan satu kontrol positif, yaitu:

- Kontrol negatif : larutan PBS (*Phosphate Buffer Salline*)
- Kontrol positif : Pyrantel pamoate 1%
- Perlakuan I : 0.075 ml ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) + 29.925 ml larutan PBS → Larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) ¼%
- Perlakuan II : 0.15 ml ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) + 29.85 ml larutan PBS → Larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) ½%
- Perlakuan III : 0.225 ml ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) + 29.775 ml larutan PBS → Larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) ¾%

Maka perkiraan jumlah pengulangan yang akan dilakukan adalah dengan rumus:

(Tjokronegoro, 2004)

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$$n = 4$$

Keterangan:

p= jumlah kelompok data

n= jumlah pengulangan

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

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Tergantung

Variable tergantung dalam penelitian ini adalah potensi ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang digunakan sebagai antihelmintik terhadap *Ascaris suum*.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dan lama paparan larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

4.5 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dalam Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6 Definisi Operasional

- Bunga cengkeh diperoleh dari Materia Medika Batu. Ekstrak etanol bunga cengkeh adalah ekstrak yang dihasilkan dari serbuk bunga cengkeh dengan teknik ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol. Proses pengeringan sampai terbentuk serbuk dilakukan di Materia Medika Batu. Proses ekstraksi dikerjakan oleh tenaga ahli di Politeknik Negeri Malang.
- Konsentrasi pyrantel pamoate yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1%.
- Lethal Concentration 100 (LD_{100}) adalah konsentrasi minimal yang dibutuhkan untuk dapat membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (Budiyanti, 2010).
- Lethal Time 100 (LT_{100}) adalah waktu minimal yang dibutuhkan untuk dapat membunuh 100% jumlah cacing pada konsentrasi tertentu.
- Cacing dianggap mati apabila tidak terdapat respon gerakan aktif saat disentuh dengan menggunakan pinset, tidak ada tahanan dari tubuh cacing dan cacing terlihat lemas saat diangkat (Mahmudah, 2010).
- Efek antihelmintik dalam ekstrak bunga cengkeh adalah menghambat proses hidrolisis acetylcholine menjadi choline (Dalai *et al*, 2014). dan mempengaruhi transmisi impuls elektrik sepanjang perjalanan akson saraf, yang dapat dihitung dari jumlah cacing yang mati (Navas *et al*, 2010).

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah

- A. Alat untuk ekstraksi dan evaporasi ekstrak bunga cengkeh:

- Alat penggerus / blender
- Corong gelas
- Gelas ukur
- Labu erlemeyer atau beaker glass (dengan volume 1 liter) untuk merendam ekstrak bunga cengkeh.
- 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%
- Laminar flow
- PBS (*Phosphate Buffer Saline*)
- FBS (*Fetal Bovine Serum*)
- Larutan uji konsentrasi ¼%, ½%, dan ¾%
- Pyrantel pamoate (Combantrin) 10%

4.7.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Bunga cengkeh
- Etanol 90% sebagai pelarut ekstrak
- Larutan ekstrak bunga cengkeh
- Cacing *Ascaris suum*

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Cara Pengambilan Sampel

Sampel yang dipakai adalah cacing *Ascaris suum* yang berasal dari usus babi. Cacing *Ascaris suum* didapatkan dari tempat pemotongan hewan di Gadang, Malang. Untuk mengambil cacing, babi yang baru disembelih diambil ususnya dan dipotong membujur, isinya ditampung dalam ember. Mukosa usus dikerok untuk melepas cacing yang mungkin melekat pada mukosa. Isi usus kemudian disaring dan satu persatu cacing mulai diambil kemudian dimasukkan ke dalam toples. Untuk menjaga ketahanan hidup cacing secara in vitro, cacing direndam dalam larutan NaCl 0,9%.

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh

Bunga cengkeh dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari selama 3-4 hari. Bunga cengkeh dihamparkan pada alas tikar atau plastik. Selama proses pengeringan, bunga cengkeh dibolak-balik agar keringnya merata. Proses pengeringan dianggap selesai jika warnanya telah berubah menjadi coklat tua, mengkilat, mudah dipatahkan dengan jari tangan.

Proses ekstraksi bunga cengkeh dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Serbuk bunga cengkeh dimaserasi dengan etanol 95% di dalam tabung labu, kemudian diaduk selama 3 jam. Setelah itu, direndam selama 1 malam, kemudiakan dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan lalu

dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator*. Dari proses ini didapatkan ekstrak kental bunga cengkeh. Ekstrak kental ini kemudian dituang ke dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan water bath sambil diaduk. Setelah itu, didapatkan ekstrak etanol bunga cengkeh yang siap digunakan.

4.8.3 Pembuatan Larutan

Cairan pelarut ekstrak etanol bunga cengkeh yang digunakan adalah larutan PBS. Persediaan larutan ekstrak etanol bunga cengkeh dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji.

4.8.4 Penyiapan Larutan Uji

Ekstrak bunga cengkeh yang tersimpan di lemari es, disesuaikan suhunya dengan suhu kamar dengan cara membiarkan di udara kamar selama 15 menit dan dianggap konsentrasinya 100%.

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

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

Keterangan :

M_1 : Konsentrasi larutan stok larutan ekstrak bunga cengkeh

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 konsentrasinya adalah 30 ml.

4.8.5 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bersifat *trial* dan *error* yang bertujuan untuk memperoleh konsentrasi minimal ekstrak bunga cengkeh yang dapat membunuh semua cacing *Ascaris suum* dalam satu cawan petri.

1. Siapkan 5 buah cawan petri disiapkan dan masing-masing diisi dengan 20 ml ekstrak etanol bunga cengkeh dengan konsentrasi 1%, 3%, 5%, larutan PBS+FBS, dan larutan pyrantel pamoate 1%.
2. 5 ekor cacing *Ascaris suum* dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri.
3. Diinkubasi pada suhu 37°C.
4. Pengamatan pada kelompok perlakuan dan pembanding dilakukan setiap 1 jam selama 9 jam dan jam ke-24 dengan cara merendam cacing ke dalam rendaman larutan hangat (37°C) kemudian cacing disentuh dengan pinset. Jika cacing tersebut tidak bergerak maka cacing tersebut dinyatakan mati.
5. Jumlah cacing yang mati dihitung. Waktu kematian cacing dihitung untuk menentukan rentang waktu pengamatan pada penelitian selanjutnya.
6. Tentukan konsentrasi untuk penelitian sesungguhnya.

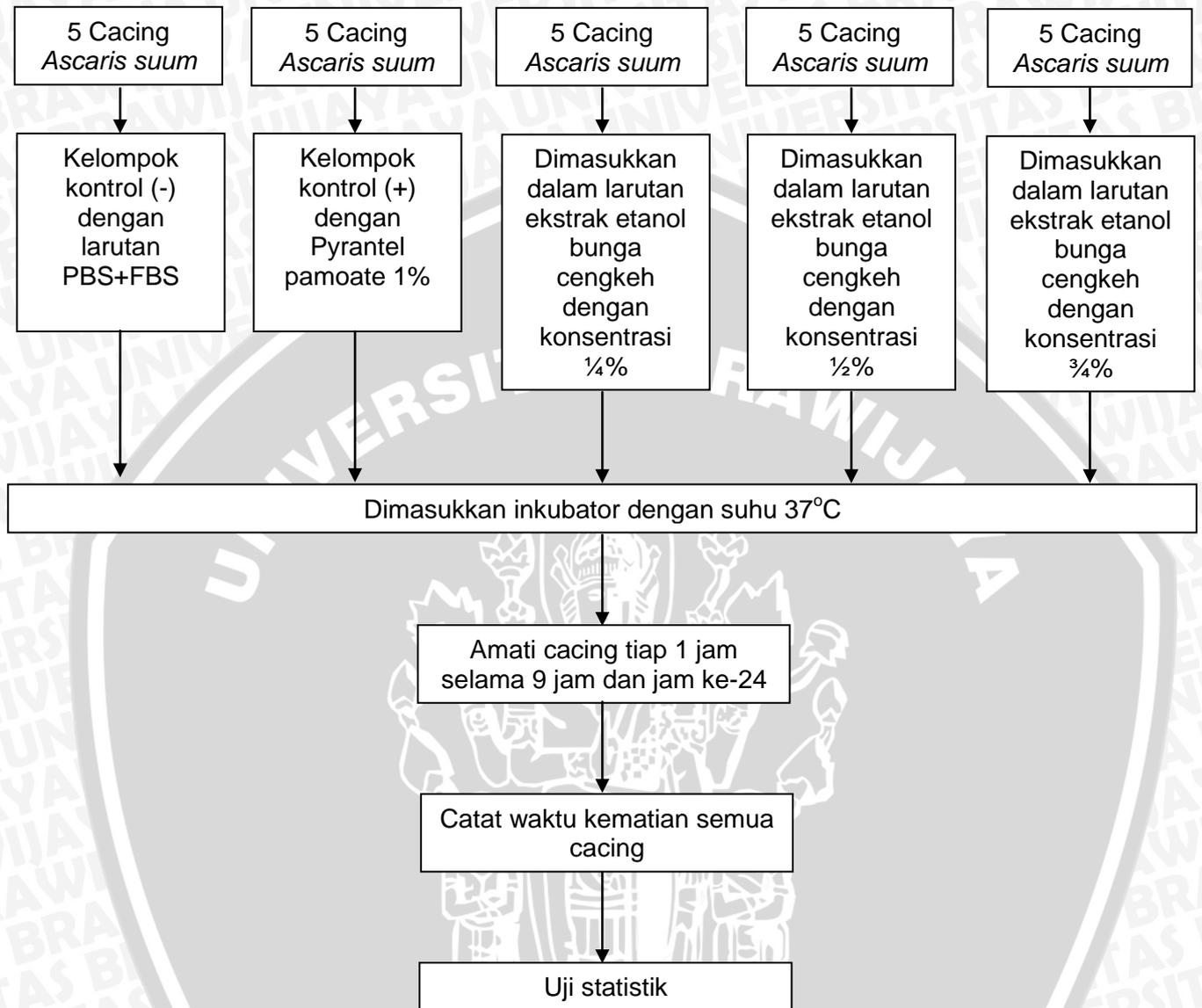
4.8.6 Penelitian Pengulangan

1. Siapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak etanol bunga cengkeh dengan konsentrasi yang didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan, yaitu ¼%, ½%, dan ¾%.
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 selama 9 jam dan pada jam ke-24. Kemudian cacing yang mati dicatat jumlahnya tiap jam pengamatan.
5. Penelitian ini dilakukan 4 kali ulangan.



4.9 Rancangan Penelitian



4.10 Pengolahan dan Analisis Data

Penelitian ini termasuk dalam eksperimental murni dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Pada penelitian ini, hasil uji dievaluasi secara statistik dengan menggunakan metode analisis probit dalam program *Mini tab 15* untuk mengetahui adanya hubungan dan pengaruh ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap kematian *Ascaris suum*. Analisis probit digunakan untuk menganalisis berbagai jenis dosis-respons atau respon percobaan binomial dalam berbagai bidang dan untuk mengetahui konsentrasi optimum yang dapat membunuh cacing.

