

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan menggunakan penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui efektifitas daun Srikaya (*Annona squamosa L*) sebagai antihelmintik terhadap cacing *Ascaris suum*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Cacing *Ascaris suum* sebagai sample penelitian ini diperoleh dari usus babi di rumah pemotongan hewan di daerah 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 dan betina
- Cacing *Ascaris suum* yang masih aktif bergerak (panjang 20-30 cm)

Eksklusi:

- Cacing *Ascaris suum* yang kurang aktif bergerak

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:

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

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

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

(Hanafiah, 2001)

Sehingga subyek minimal yang akan diperlukan untuk satu cawan petri adalah 5 ekor ditambah 2 cacing jika ada cacing yang mati.

(A) Jumlah Sampel

Besar pengulangan pada penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus menurut Tjokronegoro (2001), yaitu:

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

keterangan: n = Jumlah pengulangan

p = Jumlah kelompok coba

Karena dalam penelitian ini menggunakan 5 kelompok coba, maka:

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$$n \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang akan diperlukan untuk penelitian ini minimal adalah 4 kali. Jika setiap perlakuan membutuhkan 5 sampel, terdapat 5 perlakuan dan 4 kali pengulangan. Maka jumlah sampel keseluruhan adalah 100 sampel.

(B) Pengelompokan Sampel

Penelitian ini meliputi tiga perlakuan dengan satu kontrol negatif (-) dan satu kontrol positif (+) yaitu (misal):

- Kontrol (-) : Larutan PBS + FBS 1%
- Kontrol (+) : Pirantel pamoat dalam bentuk bubuk (*Combantrin* 1%)
- Perlakuan I : 50 ml ekstrak daun srikaya + 50 ml larutan PBS +1%FBS
→ Larutan ekstrak daun srikaya 50 %
- Perlakuan II : 40 ml ekstrak daun srikaya + 60 ml larutan PBS +1%FBS
→ Larutan ekstrak daun srikaya 40 %
- Perlakuan III : 30 ml ekstrak daun srikaya + 70 ml larutan PBS +1%FBS
→ Larutan ekstrak daun srikaya 30%

Konsentrasi daun srikaya diberi tambahan ethanol 96% sebagai *emulsifier* agar ekstrak daun srikaya dapat larut sempurna dalam larutan PBS + 1 % FBS. Tiap perlakuan membutuhkan lima ekor cacing. Setiap percobaan dibutuhkan tiga buah perlakuan serta satu kontrol negatif dan satu kontrol positif.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2016.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati oleh pemberian larutan daun srikaya pada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan daun srikaya dengan berbagai konsentrasi dan menentukan waktu misalnya jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3 dan seterusnya.

4.5 Definisi Operasional

a. Daun Srikaya

Daun srikaya (*Annona squamosa* L.) yang digunakan pada penelitian ini adalah daun srikaya yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yang diperoleh dari Balai Materia Medica, Malang atau perkebunan lain di daerah Malang.

b. Ekstrak Daun Srikaya

Ekstrak daun srikaya adalah ekstrak yang dihasilkan dari daun srikaya yang dikeringkan dengan teknik ekstraksi maserasi dan dilarutkan dengan ethanol 96%. Proses pembuatan ekstrak mulai dari pengeringan sampai terbentuk ekstrak dikerjakan oleh tenaga ahli di Politeknik Negeri Malang.

c. Konsentrasi Ekstrak Daun Srikaya

Konsentrasi ekstrak daun srikaya dibuat dengan cara melarutkan ekstrak daun srikaya dari proses maserasi dengan satuan berat ekstrak dalam gram per volume larutan PBS + FBS 1% sesuai konsentrasi yang telah ditentukan. Untuk mengetahui konsentrasi minimal yang diperlukan untuk membunuh cacing, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan.

d. Pengambilan Sampel Cacing

Ascaris suum diperoleh dari tempat pemotongan hewan di Gadang, Malang dengan kurun waktu kurang lebih satu jam setelah penyembelihan babi. Selanjutnya cacing dimasukkan ke dalam larutan PBS + FBS 1% dan dibawa ke Laboratorium Parasitologi untuk pemberian perlakuan.

e. Waktu kematian cacing adalah waktu yang dibutuhkan mulai dari pemberian perlakuan sampai kematian seluruh cacing dalam tiap inkubasi. Untuk melihat apakah cacing telah mati setelah diinkubasi, cacing – cacing tersebut diusik dengan batang pengaduk. Apabila cacing tetap diam, dipindahkan ke dalam air panas pada suhu 50° C. Apabila dengan diusik cacing tetap diam, berarti cacing tersebut sudah mati dan bila masih ada pergerakan berarti cacing hanya mengalami kelumpuhan (Kendyartanto, 2008)

f. *Lethal Concentration 100* (LC₁₀₀)

Lethal Concentration 100 yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk membunuh 100% jumlah cacing pada waktu tertentu (IUPAC, 2003).

g. *Lethal Time 100* (LT₁₀₀)

Lethal Time 100 yaitu 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 srikaya dengan pirantel pamoat.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Peralatan Penelitian

Alat – alat yang akan digunakan pada penelitian ini antara lain: cawan petri diameter 10 cm, pinset, gelas ukur, labu ukur, pengaduk kaca, laminar *Esco Airstream*, neraca, toples, dan lain – lain.

2. Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun srikaya konsentrasi 30%, 40% dan 50%; PBS + FBS 1% gr/ml; pirantel pamoate 1% dan cacing *Ascaris suum*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Srikaya

Persiapan penelitian meliputi pembuatan ekstrak daun srikaya, yang hasilnya digunakan dalam proses penelitian ini. Pembuatan ekstrak dikerjakan oleh tenaga ahli di Politeknik Negeri, Malang. Daun srikaya (*Annona squamosa* L) diperoleh dari Balai Materia Medica Malang. Adapun prosesnya sebagai berikut

Daun srikaya sebanyak 1000 gram dicuci bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan diangin-anginkan kemudian disimpan di ruangan khusus penyimpanan. Setelah 3 jam, daun dihaluskan menjadi serbuk dengan mesin penyerbuk dan disaring dan diperoleh serbuk daun srikaya sebanyak 1000 gram.

- 1) Serbuk daun srikaya ditambahkan dengan 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 dan daun srikaya.
- 3) Ekstrak kental ini kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan *water bath* sambil terus diaduk.
- 4) Didapatkan ekstrak kental daun srikaya sebanyak 100 ml yang siap digunakan

Sumber : Materia Medika (1989)

4.7.2 Penentuan Konsentrasi Larutan Uji

Penentuan konsentrasi larutan uji dilakukan berdasarkan hasil orientasi dan penelitian – penelitian terdahulu, menggunakan tiga konsentrasi yaitu 30% gr/ml, 40% gr/ml, dan 50% gr/ml. Dalam 1 x 24 jam dilihat konsentrasi ekstrak yang pertama kali menimbulkan efek pada cacing. Dari hasil tersebut didapatkan konsentrasi minimal yang akan dilakukan untuk penelitian akhir. Selanjutnya ditetapkan tiga konsentrasi ekstrak yang digunakan pada penelitian akhir dengan kelipatan dari konsentrasi minimal tersebut. Berikut cara kerja penetapan konsentrasi larutan uji:

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

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi larutan stok larutan ekstrak daun srikaya

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan (ml)

V_2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Sehingga perhitungan volume larutan stok yang harus dilarutkan untuk masing – masing konsentrasi adalah sebagai berikut :

A. Pembuatan konsentrasi 30 % gr/ml:

$$M_1 = 100\%$$

$$M_2 = 30 \%$$

$$100 \times V_1 = 30 \times 100$$

$$V_1 = 30$$

Sehingga dalam larutan konsentrasi 40 gram per 100 ml, didapatkan 40 ml ekstrak daun srikaya dengan pelarut 100 ml PBS.

B. Pembuatan konsentrasi 40 % gr/ml:

$$M_1 = 100\%$$

$$M_2 = 40 \%$$

$$100 \times V_1 = 40 \times 100$$

$$V_1 = 40$$

Sehingga dalam larutan konsentrasi 40 gram per 100 ml, didapatkan 40 ml ekstrak daun srikaya dengan pelarut 100 ml PBS

C. Pembuatan konsentrasi 50 % gr/ml:

$$M_1 = 100\%$$

$$M_2 = 50\%$$

$$100 \times V_1 = 50 \times 100$$

$$V_1 = 50$$

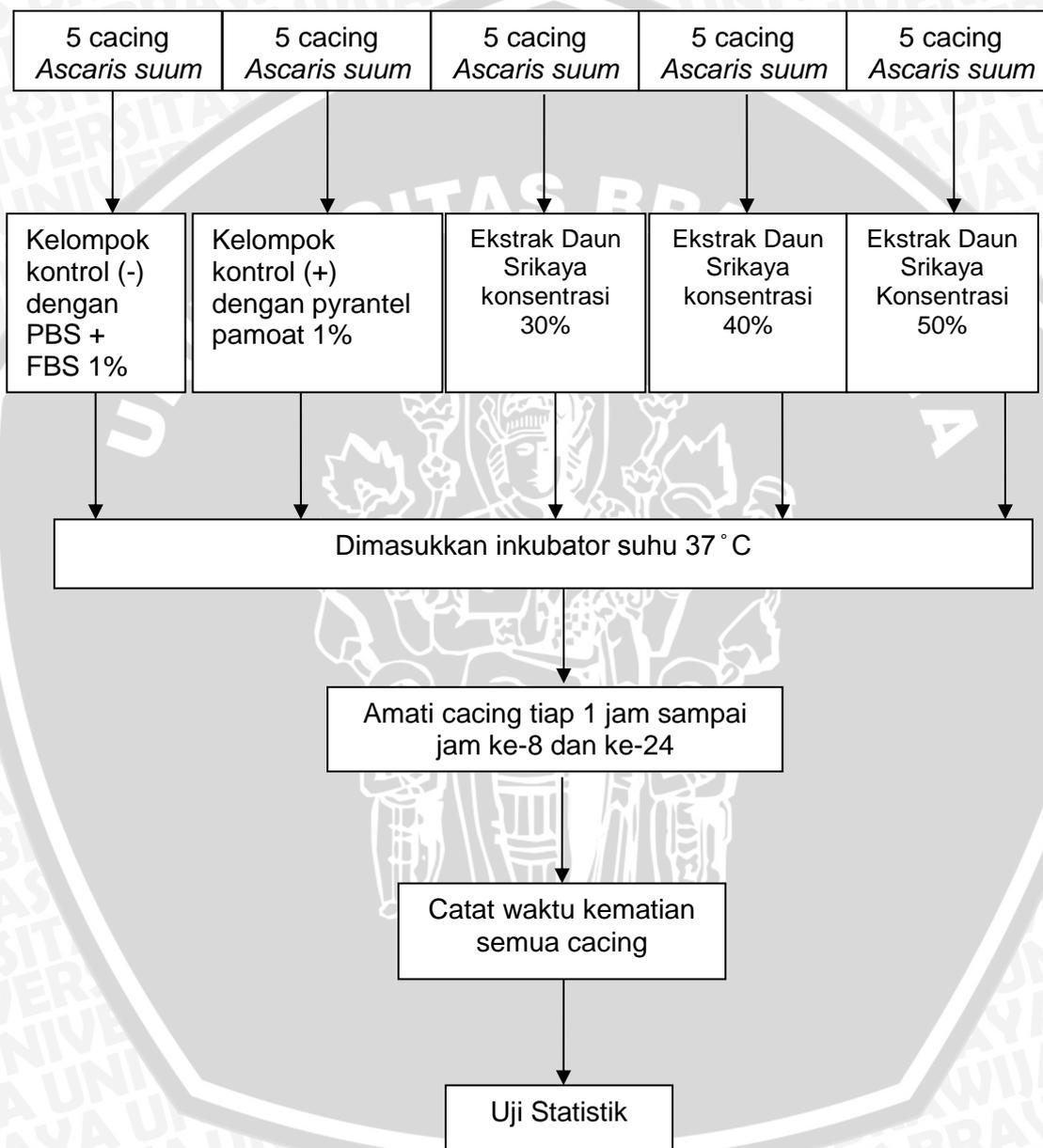
Sehingga dalam larutan konsentrasi 50 gram per 100 ml, didapatkan 50 ml ekstrak daun srikaya dengan pelarut 100 ml PBS.

4.7.3 Langkah Penelitian

1. Disiapkan cawan petri, masing-masing berisi larutan ekstrak daun srikaya dengan konsentersasi 30%, 40% dan 50% (berdasarkan penelitian eksplorasi konsentrasi), kemudian dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37 °C dalam inkubator kurang lebih 15 menit.
2. Lima ekor cacing *Ascaris suum* dimasukkan ke dalam cawan petri dengan menggunakan pinset yang sudah steril.
3. Diinkubasi pada suhu 37 °C.
4. Pengamatan dilakukan setiap 1 jam, dengan cara cacing direndam ke dalam rendaman air hangat (50⁰C) 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.

4.8 Skema Alur Kerja Penelitian

Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian



4.9 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, jam ke-9 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.

4.10 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.

4.11 Analisis Data

Data jumlah kematian cacing setiap jamnya dianalisa menggunakan tabel dan grafik. Data yang telah didapatkan kemudian dianalisis dengan uji *Shapiro Wilk* untuk mengetahui normalitas datanya. Setelah itu data hasil penelitian diolah dengan menggunakan analisis probit untuk mengetahui LC100 dan LT100 dari ekstrak daun srikaya (*Annona squamosa L.*)