

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yaitu 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% dan 1% serta aquadest sebagai kontrol negatif (0%) dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Kontrol positif tidak digunakan pada penelitian ini disebabkan belum terdapatnya ovisida yang dijual atau digunakan di masyarakat luas. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali mengacu pada standar WHO mengenai panduan uji larvisida dan pada penelitian-penelitian sebelumnya mengenai ovisida (WHO, 2005 ; Bria, 2008).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di lapangan dan Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada bulan Oktober 2014.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Jawa Barat. Telur didapatkan dalam bentuk kering dengan menggunakan kertas saring.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan berdasarkan standarisasi WHO (2005) mengenai larvisida serta Bria (2008), yaitu untuk setiap perlakuan dipakai jumlah sampel 25 telur dengan pengulangan 4 kali sehingga didapatkan jumlah total sampel telur.

Tabel 1. Jumlah Sampel (WHO, 2005; Bria, 2008).

Perlakuan	Jumlah telur x jumlah pengulangan	Total
Kontrol (-) : 0%	25 telur x 4	100 telur
Perlakuan I : 0,1%	25 telur x 4	100 telur
Perlakuan II : 0,3%	25 telur x 4	100 telur
Perlakuan III : 0,5%	25 telur x 4	100 telur
Perlakuan IV : 0,7%	25 telur x 4	100 telur
Perlakuan V : 1%	25 telur x 4	100 telur
	Jumlah total telur yang dipakai dalam penelitian	600 Telur

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah

- a. Daun pandan wangi.
- b. Ethanol 96% sebagai pelarut saat pembuatan *stock* ekstrak.

- c. Aquades sebagai pengencer *stock* ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan.
- d. Telur *Aedes aegypti* dari strain Liverpool F-48.

3.4.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

3.4.2.1 Alat preparasi bahan uji.

- a. Kaca pembesar
- b. *Hand counter* untuk menghitung jumlah telur.

3.4.2.2 Alat untuk pembuatan larutan uji.

- a. Timbangan untuk menimbang daun pandan wangi.
- b. Blender untuk menghaluskan daun pandan wangi kering.
- c. Stoples dan kain kasa untuk maserasi daun pandan wangi.
- d. *Rotary evaporator* untuk pembuatan ekstrak pandan wangi.
- e. Pipet tetes untuk mengambil ekstrak daun pandan wangi.
- f. Gelas ukur dan botol tertutup sebagai tempat untuk ekstrak.
- g. Gelas ukur 100 ml untuk mengukur ekstrak daun pandan wangi.

3.4.2.3 Alat untuk uji efektivitas.

- a. Gelas ukur 250 ml untuk mengukur jumlah air yang dibutuhkan.
- b. Gelas plastik ukuran 250 ml untuk tempat perlakuan telur.
- c. Thermometer untuk menghitung suhu media.
- d. Batang pengaduk.
- e. Ph stick untuk mengukur ph media.

3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 2 tahap :

3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang dipakai pada penelitian adalah telur nyamuk *Aedes aegypti* F-48 strain Liverpool yang diperoleh dari ruang insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Sedangkan daun pandan wangi diambil dari lingkungan sekitar peneliti, di wilayah Kemiling, Bandar Lampung.

a. Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi.

Pembuatan ekstrak ini dilakukan sesuai dengan metode Harbone, ekstrak yang digunakan adalah daun pandan wangi yang telah dibersihkan, kemudian diblender menjadi serbuk. Serbuk ditimbang sebanyak 30 gram. Setelah diblender daun pandan wangi dikeringkan dengan cara dianginkan dengan suhu kamar 3x 24 jam. Setelah kering, selanjutnya simplisia daun pandan wangi dimaserasi selama 3x24 jam menggunakan larutan etanol 96%, kemudian disaring dan dipekatkan pada suhu 40⁰C –50⁰C dalam *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat daun pandan wangi konsentrasi 100%.

b. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Pandan

Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus :

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Dimana :

V_1 = volume larutan yang akan diencerkan (ml).

M_1 = konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang tersedia (%)

V_2 = volume larutan (air + ekstrak) yang diinginkan (ml).

M_2 = konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang dibuat (%)

Jumlah volume ekstrak daun pandan wangi disajikan pada

Tabel 2.

Tabel 2. Volume Ekstrak Daun Pandan Wangi yang Dibutuhkan.

M_1	V_2	M_2	$V_1 = \frac{V_2 M_2}{M_1}$	Pengulangan ($V_1 \times 4$)
100 %	200 ml	1 %	2 ml	8 ml
100 %	200 ml	0,7 %	1,4 ml	5,6 ml
100 %	200 ml	0,5 %	1 ml	4 ml
100%	200 ml	0,3 %	0,6 ml	2,4 ml
100 %	200 ml	0,1 %	0,2 ml	0,8 ml
Total				20,8 ml

3.5.2 Tahap Penelitian

Untuk menilai dosis efektif ekstrak daun pandan wangi sebagai ovisida telur *Aedes aegypti* dilakukan dengan menilai daya tetas telur dengan menggunakan konsentrasi yaitu 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 1% , dan 0% sebagai kontrol negatif. Kemudian ekstrak daun pandan wangi dengan

berbagai konsentrasi tersebut diencerkan menggunakan aquadest dengan volume yang dihasilkan masing-masing 200 ml. Kontrol negatif (0%) diisi menggunakan aquadest. Setiap perlakuan berisi 25 butir telur nyamuk *Aedes aegypti* dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Setiap harinya dalam tiga hari dengan menggunakan termometer dilakukan pengukuran suhu media dan pH media dengan menggunakan pH stick pada masing-masing gelas yang berisi telur nyamuk dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (Bria, 2008).

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1 Identifikasi Variabel

3.6.1.1 Variabel Bebas

Berbagai konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dengan 6 konsentrasi yaitu 0%, 0,1%, 0,3%, 0,5 %, 0,7% dan 1%.

3.6.1.2 Variabel Terikat

Banyaknya telur *Aedes aegypti* yang tidak menetas.

3.6.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Definisi Operasional Variabel Penelitian.

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala ukur
Variabel bebas: Berbagai konsentrasi ekstrak daun pandan wangi.	Ekstrak daun pandan wangi didapatkan dengan proses masserasi dengan menggunakan etanol 96 % serta dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,1%; 0,3%, 0,5%, 0,7%, 1% .	Menimbang ekstrak dan menghitung rumus $M_1V_1=M_2V_2$.	<i>Analytical balance</i> , Gelas ukur, pipet tetes	Didapatkan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (0,1%;0,3%;0,5%,0,7%,1%)	Ordinal
Variabel terikat: Telur <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menetas	Telur yang tidak membentuk larva setelah diletakkan di dalam media air	Melihat, mengecek dan mencatat jumlah telur yang tidak menetas pada tiap pengulangan setiap 6 jam sekali selama 3 hari pengamatan (Bria, 2008)	<i>Hand counter</i>	Telur <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menetas (0-25 telur)	Rasio

Parameter efektivitas pada penelitian ini diinterpretasikan berdasarkan uji statistik yang dilakukan, suatu larutan dikatakan efektif jika memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol (konsentrasi 0%) sebagai pembandingnya yaitu $p < 0,05$. Selain itu dilakukan penghitungan ED_{50} dan ED_{99} untuk melihat konsentrasi yang efektif untuk membunuh 50% dan 99% dari jumlah populasi.

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang telah didapat dari hasil pengamatan akan diolah dengan menggunakan *software* statistik. Berikut ini adalah langkah-langkah melakukan uji analisis *one way* ANOVA:

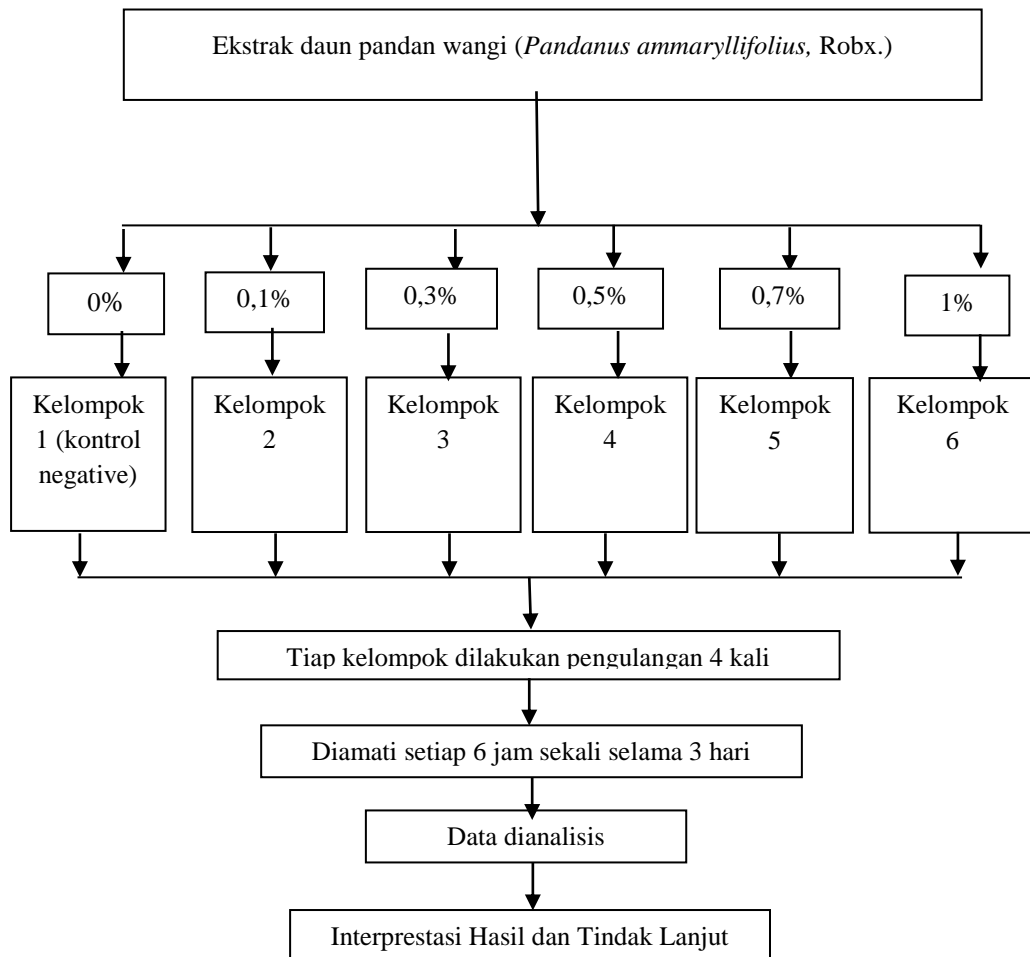
- a. Memeriksa syarat uji parametrik *one way* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan:
 - a. Distribusi data harus normal;
 - b. Varians data harus sama;
- b. Jika memenuhi syarat uji parametrik (distribusi data normal, varians sama), dipilih uji *one way* ANOVA;
- c. Jika tidak memenuhi syarat, maka akan diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians sama;
- d. Jika variabel transformasi data memenuhi syarat, maka dipilih uji parametrik *one way* ANOVA;
- e. Jika variabel hasil transformasi tidak memenuhi syarat, maka alternatifnya dipilih uji nonparametrik Kruskal-Wallis, jika pada uji *one way* ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < \alpha$ ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan melakukan analisis *post Hoc* pada taraf kepercayaan 0,05 (Dahlan , 2008).

3.8 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini diajukan untuk memperoleh Keterangan Lolos Kaji etik dari komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Telur *Aedes aegypti* didapat dari Instalasi Insektarium P2B2 Ciamis dengan keadaan telur yang non-infeksius dan didapatkan tidak adanya transmisi virus ke telur. Etika penelitian pada hewan coba menggunakan prinsip 3R, yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Sedangkan *refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pengujian ovisida dilakukan dengan metode dari P2B2 dan metode standar dari WHO (WHO, 2005; Bria, 2008). Pengujian ini telah mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 1 Desember 2014 melalui surat nomor 2136/UN26/8/DT/2014 (Lampiran 1).

3.9 Alur Penelitian

Untuk memperjelas proses penelitian, maka disajikan diagram alur penelitian sebagai berikut,



Gambar 11. Diagram Alir Efektivitas Ekstrak Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*, Robx.) sebagai Ovisida *Aedes aegypti* (Linn.)