

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yaitu 30%, 35%, 40%, 45% dan 50% serta aquades sebagai kontrol (0%) dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, sedangkan pembuatan ekstrak daun pandan wangi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada bulan Desember 2014.

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

##### **3.3.1 Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Ae. aegypti* betina yang diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2)

Ciamis, Jawa Barat, yang masih dalam stadium telur yang kemudian dipelihara sampai dewasa di lab. Telur didapatkan dalam bentuk kering dengan menggunakan kertas saring.

### 3.3.2 Sampel

#### a. Kriteria Inklusi

Nyamuk dewasa yang pingsan atau mati

#### b. Kriteria Eksklusi

Nyamuk dewasa yang tidak pingsan atau mati

#### c. Besar Sampel

Jumlah sampel nyamuk uji yang digunakan sebanyak 10 ekor nyamuk mengikuti penelitian Rosa (1999) dan ulangan 4 kali sehingga didapatkan 240 sampel nyamuk. Uji *bio assay* dilakukan berdasarkan standar WHO modifikasi Rosa (2005). (Tabel 1).

**Tabel 1.** Jumlah Nyamuk Uji yang Dibutuhkan

Perlakuan	Jumlah nyamuk x jumlah pengulangan	Total
Kontrol (-) : 0%	10 nyamuk x 4	40 nyamuk
Perlakuan I : 30%	10 nyamuk x 4	40 nyamuk
Perlakuan II : 35%	10 nyamuk x 4	40 nyamuk
Perlakuan III : 40%	10 nyamuk x 4	40 nyamuk
Perlakuan IV : 45%	10 nyamuk x 4	40 nyamuk
Perlakuan V : 50%	10 nyamuk x 4	40 nyamuk
Jumlah total nyamuk yang dipakai dalam penelitian		240 nyamuk

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

##### a. Alat preparasi bahan uji.

1. Gorden ukuran 25x25 cm,
2. Mangkuk plastik untuk perangkap nyamuk,
3. Kapas,
4. *Paper cup*,
5. Kotak kawat untuk pengembang biakan nyamuk,
6. Aspirator,

##### b. Alat untuk pembuatan larutan uji.

1. Timbangan untuk menimbang daun pandan wangi yang diperlukan.
2. Blender untuk menghaluskan daun pandan wangi.
3. Stoples dan kain kasa untuk proses maserasi daun pandan wangi.
4. *Rotary evaporator* untuk membuat ekstrak daun pandan wangi.
5. Pipet tetes untuk mengambil ekstrak pandan wangi.
6. Gelas ukur dan botol tertutup sebagai tempat untuk ekstrak daun pandan wangi.
7. Gelas ukur 100 ml untuk mengukur ekstrak daun pandan wangi.

**c. Alat untuk uji efektivitas.**

1. Gelas ukur 250 ml untuk mengukur jumlah air yang dibutuhkan.
2. Gordenn yang akan di celup dengan ekstrak pandan wangi.
3. Tali penggantung gordenn.
4. Mangkuk plastik untuk perangkap nyamuk.

**3.4.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah

- a. Daun pandan wangi sebanyak 10 kg
- b. 5 Liter Ethanol 96% sebagai pelarut saat pembuatan *stock* ekstrak.
- c. Aquades sebagai pengencer *stock* ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan.
- d. Nyamuk *Ae. aegypti*.
- e. Larutan air gula 10%
- f. 2 ekor marmut

**3.5 Prosedur Penelitian**

Penelitian dibagi menjadi 3 tahap :

**3.5.1 Tahap Persiapan**

**a. Preparasi Bahan Uji**

Nyamuk *Ae. aegypti* yang dipakai pada penelitian adalah nyamuk hasil pelihara telur yang diperoleh dari ruang insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat

kemudian telur dipelihara, ditetaskan dan diriring. Sedangkan daun pandan wangi diambil dari suplier yang telah di homogenkan jenisnya.

#### **b. Pembuatan Ekstrak pandan wangi**

Pembuatan ekstrak ini dilakukan sesuai dengan metode Harborne tahun 1996, ekstrak yang akan digunakan adalah daun pandan wangi. Daun pandan wangi sebanyak 10 kg lalu dibersihkan dengan air, lalu dicacah dan di keringkan dalam suhu ruangan 3x24 jam. Setelah kering, kemudian daun pandan wangi dibelender kering tanpa menggunakan air. Kemudian daun pandan wangi ditimbang sebanyak 30 gr, selanjutnya *simplisia* daun pandan wangi *dimaserasi* selama 3x24 jam menggunakan larutan etanol 96% sebanyak 5L, kemudian disaring dan dipekatan pada suhu  $40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$  dalam *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat daun pandan wangi konsentrasi 100% (Tabel 2).

#### **c. Pembuatan Dosis Ekstrak daun pandan wangi**

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.

$M_1$	$V_2$	$M_2$	$V_1 = \frac{V_2 M_2}{M_1}$
100 %	200 ml	50 %	100 ml
100 %	200 ml	45 %	90 ml
100 %	200 ml	40 %	80 ml
100%	200 ml	35 %	70 ml
100 %	200 ml	30 %	60 ml
Total			400 ml

Keterangan:

M1: Konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang tersedia

M2: Konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang dibuat

V1: Volume larutan yang diencerkan

V2: Volume larutan (air + ekstrak)

### 3.5.2 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi optimum bahan uji yang dapat membunuh nyamuk yang kemudian digunakan sebagai patokan pada pengujian akhir. Uji pendahuluan pada penelitian ini menggunakan larutan uji yaitu ekstrak ethanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% (Lampiran I).

Gorden yang telah disiapkan dicelupkan pada ekstrak ethanol daun pandan wangi dengan berbagai konsentrasi lalu dikering anginkan,

setelah gorden kering pengujian dilakukan. Kemudian dilakukan uji *bio assay* dengan memasukkan 10 ekor nyamuk *Ae. aegypti* betina pada mangkuk plastik yang telah dipasang dan kemudian ditutup dengan kapas, selanjutnya dilakukan pengamatan selama 30 menit, setelah itu jumlah nyamuk yang mati dihitung. Nyamuk yang masih hidup dikeluarkan dari mangkuk plastik, dimasukkan ke dalam *paper cup*, diberi makan larutan air gula 10% pada kapas, lalu diamati selama 24 jam. Nyamuk yang mati pada periode ini dihitung jumlahnya dan ditentukan persentase kematiannya. Uji *bio assay* dilakukan selama 30 menit dengan 4 kali pengamatan. Maka didapatkan mulai dari konsentrasi 30% pada uji sebenarnya dari uji pendahuluan tersebut.

### **3.5.3 Tahap Penelitian**

Pertama dilakukan pengenceran ekstrak yang telah ditentukan konsentrasinya yaitu 30%, 35%, 40%, 45%, 50% , dan 0% sebagai kontrol negatif dan siapkan gorden ukuran 25x25 cm. Kemudian celupkan gorden pada masing-masing konsentrasi ekstrak dan angkat, lalu gorden digantung dan dikering anginkan dalam ruangan, setelah gorden kering pengujian dapat langsung dilakukan.

Untuk mengetahui dosis efektifitas ekstrak daun pandan wangi terhadap nyamuk *Ae. aegypti* dilakukan uji *bio assay* dengan memasukkan 10 ekor nyamuk *Ae. aegypti* betina pada mangkuk plastik yang telah dipasang dan kemudian ditutup dengan kapas,

kemudian dilakukan pengamatan selama 30 menit, setelah itu jumlah nyamuk yang mati dihitung. Nyamuk yang masih hidup dikeluarkan dari mangkuk plastik, dimasukkan ke dalam *paper cup*, diberi makan larutan air gula 10% pada kapas, lalu diamati selama 24 jam. Nyamuk yang mati pada periode ini dihitung jumlahnya dan ditentukan persentase kematiannya. Uji *bio assay* dilakukan selama 30 menit dengan 4 kali pengulangan pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Atau penelitian dihentikan bila kematian nyamuk uji kurang dari 70%.

### **3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.6.1. Identifikasi Variabel**

##### a. Variabel Bebas

Gorden celup dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dengan 6 konsentrasi yaitu 0%, 30%, 35%, 40%, 45% dan 50%.

##### b. Variabel Terikat

Banyaknya nyamuk *Ae. aegypti* betina yang mati dan pingsan.

#### **3.6.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian**

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional (Tabel 3).



**Tabel 3.** Definisi Operasional Variabel Penelitian.

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala ukur
<b>Variabel bebas:</b> 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 30%, 35%, 40%, 45 %, 50% .	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 (30%, 35%, 40%, 45%, 50%)	ordinal
<b>Variabel terikat:</b> Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> betina yang pingsan dan mati	Nyamuk yang pingsan atau mati setelah di masukkan kedalam perangkap nyamuk dengan gorden yang telah di celup ekstrak daun pandan wangi	Melihat, mengecek dan mencatat jumlah nyamuk yang mati pada tiap pengulangan selama 30 menit setelah nyamuk dimasukkan dalam perangkap	<i>Hand counter</i>	Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> yang mati (0-10 nyamuk)	Rasio

Parameter efektivitas pada penelitian ini adalah berdasarkan penelusuran pustaka, karena belum ditemukan standar efektivitas insektisida. Oleh karena itu, parameter efektivitas hanya diinterpretasikan berdasarkan uji statistik yang dilakukan, suatu larutan dikatakan efektif jika memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol (konsentrasi 0%) sebagai pembandingnya yaitu  $p < 0,05$

### 3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang telah didapat dari hasil pengamatan akan diolah dengan menggunakan *software* statistik. Data dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*). Jika distribusi data normal, dilanjutkan dengan menggunakan uji analisis *repeated* ANOVA. Berikut ini adalah langkah-langkah melakukan uji analisis *repeated* ANOVA:

1. Memeriksa syarat uji parametrik *repeated* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok berpasangan:
  - a. Distribusi data harus normal;
  - b. Varians data tidak menjadi syarat (karena berpasangan)
2. Jika memenuhi syarat uji parametrik (distribusi data normal), dipilih uji *repeated* ANOVA;
3. Jika tidak memenuhi syarat, maka akan diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians sama;
4. Jika variabel transformasi data memenuhi syarat, maka dipilih uji parametrik *repeated* ANOVA;
5. Jika variabel hasil transformasi tidak memenuhi syarat, maka alternatifnya dipilih uji nonparametrik *friedman*, jika menghasilkan nilai  $p < \alpha$  ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* dengan *wilcoxon* untuk membandingkan *signifikansi* antar kelompok pada taraf kepercayaan 0,05 (Dahlan, 2011).

### 3.8 Aspek Etik Penelitian

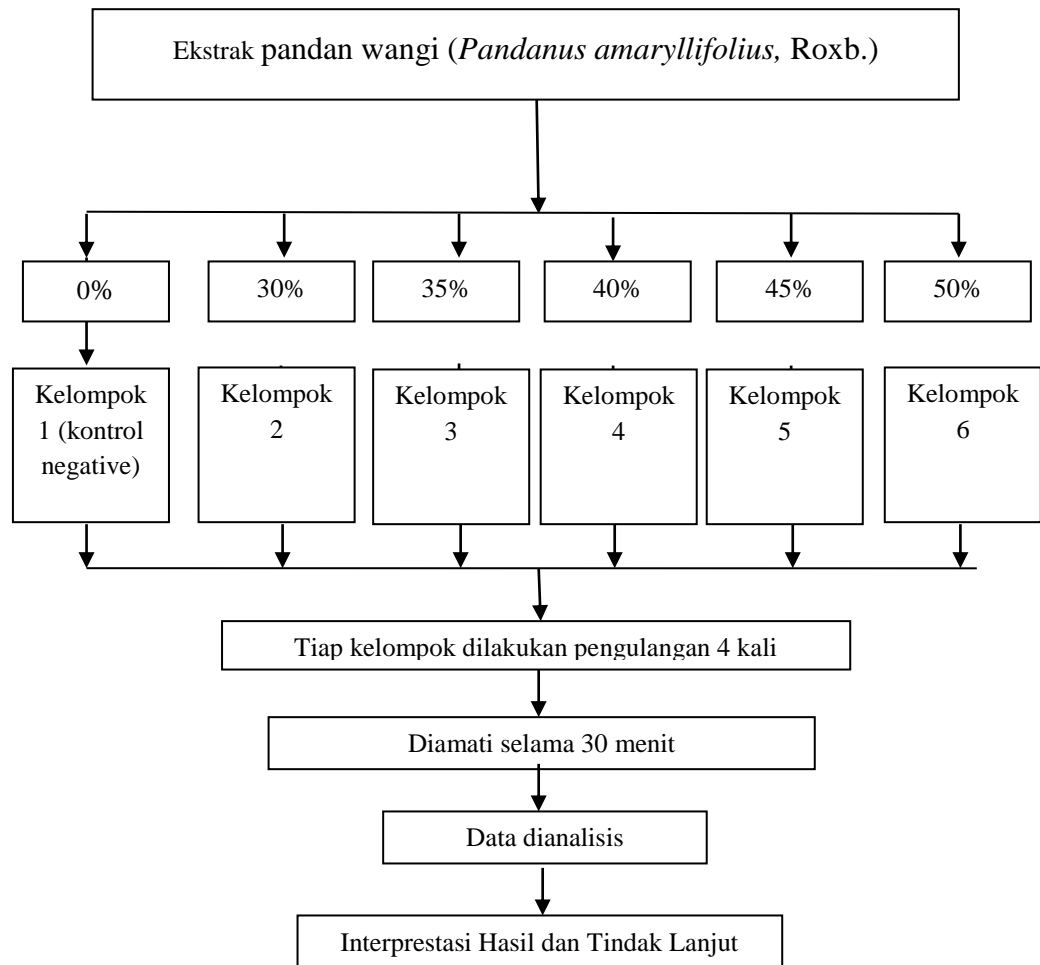
Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. Replacement, adalah keperluan 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.
2. Reduction, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu  $(r-1)(t-1) \geq 15$ , dengan r adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. Refinement, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, yaitu:
  - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara ad libitum.
  - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di animal house dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 300 ekor tiap kandang. Animal house berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.

- c. Bebas dari penyakit dan menjalankan program pemantauan, pada penelitian hewan coba dilakukan pengambilan sampel menggunakan aspirator dengan mempertimbangkan kenyamanan dan mengurangi rasa sakit pada hewan serta kerusakan struktur organ seminimal mungkin.

### 3.9 Alur Penelitian

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



**Bagan 3.** Diagram Alir Efektivitas Ekstrak Daun Pandan Wangi Insektisida Nyamuk *Ae. aeg*