

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) berdasarkan prosedur yang direkomendasikan oleh *World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme* (WHOPES, 2009).

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Zoologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung pada bulan Oktober–Desember 2014.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi Penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Aedes aegypti* betina stadium dewasa. Telur nyamuk diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (Litbang P2B2) Ciamis dalam bentuk kering dengan media kertas saring.

## 2. Sampel Penelitian

### a. Kriteria inklusi

- a. Nyamuk *Aedes aegypti* betina
- b. Nyamuk yang dapat terbang
- c. Nyamuk berusia 2-5 hari
- d. Nyamuk sudah dipuasakan selama 24 jam

### b. Kriteria ekslusi

Nyamuk yang mati sebelum perlakuan.

### c. Besar sampel

Sesuai pedoman standar uji *repellent* setiap kurungan uji berisi 50 ekor nyamuk, penelitian ini menggunakan 3 kurungan uji sehingga total sampel yang digunakan yaitu 150 ekor nyamuk (Tabel 1) (WHOPES, 2009).

**Tabel 1. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian (WHOPES, 2009)**

Perlakuan	Jumlah Nyamuk (Ekor)
Ulangan I	50 ekor
Ulangan II	50 ekor
Ulangan III	50 ekor
Jumlah nyamuk yang digunakan	150 Ekor

### d. Relawan

Penelitian ini membutuhkan seorang relawan coba. Relawan akan menggunakan ekstrak *repellent* pada lengan bawah tangan kanan dan kiri untuk kemudian dilakukan uji secara langsung terhadap paparan

nyamuk. Menurut WHOPEs dan *Enviromental Protection Agency* (EPA), tes *repellent* ini dikondisikan sebagaimana lingkungan.

Relawan memiliki syarat tertentu yang harus dipenuhi, yaitu:

- a. Usia 18–55 tahun
- b. Tidak memiliki penyakit *immunocompromised*
- c. Tidak sensitif atau tidak memiliki alergi terhadap gigitan nyamuk
- d. Bukan wanita hamil atau menyusui
- e. Bukan perokok

Persetujuan sebagai relawan maka sebelumnya relawan menandatangani *informed consent* setelah diberikan penjelasan oleh peneliti mengenai gambaran penelitian (WHOPEs, 2009; EPA, 2010).

## **D. Bahan dan Alat Penelitian**

### **1. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

- a. 6 kilogram daun Pandan wangi
- b. 5 Liter Ethanol 96% sebagai pelarut dalam ekstraksi
- c. 1 Liter Alkohol 70% sebagai antiseptik
- d. Aquades untuk mengencerkan konsentrasi
- e. Pelet sebagai pakan larva
- f. 500 mL Madu atau air gula sebagai pakan nyamuk *Aedes aegypti*

## 2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah

- a. Aspirator untuk menangkap dan memindahkan nyamuk.
- b. Kurungan nyamuk untuk meletakkan nyamuk pada saat melakukan uji daya tolak dan untuk *rearing* nyamuk.
- c. Stopwatch untuk mengukur waktu pada saat menghitung jumlah nyamuk *Aedes aegyti* yang hinggap.
- d. Neraca analitik untuk menimbang daun Pandan wangi sebelum dihaluskan.
- e. Gelas ukur 100 ml, untuk mengukur jumlah air.
- f. Gelas ukur 5 ml, untuk mengukur pengenceran ekstrak
- g. Sarung tangan, untuk membatasi daerah lengan yang akan diuji.
- h. Kurungan nyamuk atau nampan plastik untuk *rearing* nyamuk 1 buah yaitu meletakkan stadium telur hingga pupa.
- i. Saringan, untuk menyaring ekstrak ethanol daun Pandan wangi.
- j. Pipet larva, untuk memindahkan telur, larva dan pupa.
- k. Blender, untuk menghaluskan daun Pandan wangi.
- l. Mangkuk, untuk meletakkan pupa nyamuk dan kemudian dimasukkan kedalam kurungan nyamuk.

## **E. Prosedur Penelitian**

Penelitian dibagi menjadi 2 tahap sebagai berikut:

### **1. Tahap Persiapan**

#### **a. Preparasi bahan uji**

Telur nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (Litbang P2B2) Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Daun Pandan wangi diperoleh dari daerah sekitar Bandar Lampung.

#### **b. Rearing nyamuk**

Telur nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam gelas atau mangkuk plastik yang berisi media air selama 1–2 hari hingga menetas menjadi stadium larva instar I–IV yang berlangsung selama 7–8 hari. Selama masa perkembangan, larva diberi pakan berupa pelet hingga mencapai fase tidak makan yaitu pupa. Pupa dipindahkan ke dalam mangkuk yang berisi media air dan dibiarkan di dalam kurungan selama 1–2 hari hingga berkembang menjadi nyamuk dewasa. Nyamuk betina dewasa akan dipisah dengan nyamuk jantan dan diberi pakan berupa air gula.

#### **c. Aklimatisasi**

Nyamuk *Aedes aegypti* betina dewasa yang akan diuji ditangkap menggunakan aspirator dan dipindahkan ke kurungan nyamuk sebanyak 3 buah. Masing-masing kurungan berjumlah 50 ekor.

Kemudian nyamuk dibiarkan dalam ruangan uji selama kurang lebih 24 jam.

**d. Pembuatan ekstrak ethanol daun Pandan wangi**

Pembuatan ekstrak ethanol daun Pandan wangi menggunakan pelarut berupa ethanol 96%. Daun Pandan wangi sebanyak 6 kg yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air). Setelah itu potongan daun Pandan wangi ditimbang terlebih dahulu baru kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Potongan daun Pandan wangi direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96% sebanyak 5 L lalu disaring. Proses selanjutnya dilakukan evaporasi pada ekstrak untuk menghilangkan kandungan ethanol sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa *repellent* ekstrak ethanol daun Pandan wangi konsentrasi 100% dalam bentuk padat. Perbedaan konsentrasi dibuat berdasarkan rumus pengenceran (Tabel 2). Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Keterangan:

V1 = volume larutan mula-mula

M1 = konsentrasi mula-mula

V2 = volume larutan sesudah diencerkan

M2 = konsentrasi sesudah diencerkan

**Tabel 2. Jumlah ekstrak ethanol daun Pandan wangi yang dibutuhkan pada penelitian (WHOPES, 2009)**

M1	V2	M2	$V1 = \frac{V2 \cdot M2}{M1}$	Pengulangan (V1 x 3)
100%	1 ml	10%	0,10 ml	0,30 ml
100%	1 ml	20%	0,20 ml	0,60 ml
100%	1 ml	30%	0,30 ml	0,90 ml
100%	1 ml	40%	0,40 ml	1,20 ml

#### e. Uji pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi hambat optimum bahan uji yang dapat menolak nyamuk yang kemudian digunakan sebagai patokan pada pengujian akhir. Uji pendahuluan pada penelitian ini menggunakan larutan uji daun Pandan wangi dengan konsentrasi dimana masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25% kemudian dicari dosis untuk memperoleh persentase daya tolak 50% dan 99% terhadap kontak nyamuk *Aedes aegypti*.

## 2. Tahap Penelitian

Untuk menilai dosis efektif ekstrak ethanol daun Pandan wangi, uji aktivitas *repellent* dilaksanakan mengikuti prosedur yang direkomendasikan oleh WHOPES. Uji aktivitas *repellent* menggunakan subjek manusia, metode ini dipilih karena sesuai dengan kondisi penggunaan yang sebenarnya (WHOPES, 2009).

**a. Persiapan ekstrak ethanol daun Pandan wangi**

1. Ekstrak ethanol daun Pandan wangi diencerkan sampai didapatkan konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40%.
2. Pengenceran menggunakan aquades.

**b. Persiapan nyamuk *Aedes aegypti***

1. Nyamuk betina dan nyamuk jantan dipisahkan menggunakan aspirator.
2. Kemudian 50 ekor nyamuk betina dimasukkan ke dalam kurungan dengan volume kurungan 40x40x40 cm.

**c. Syarat relawan**

1. Relawan harus menghindari penggunaan minyak wangi atau produk lainnya yang bersifat wewangian minimal 12 jam sebelum pengujian dan selama pengujian.
2. Relawan harus bukan seorang perokok atau paling lama tidak merokok selama 12 jam dan tidak merokok selama pengujian.
3. Sebelum lengan relawan dimasukkan ke dalam kurungan uji, relawan menggunakan sarung tangan yang panjangnya sampai pergelangan tangan.

**d. Uji *repellent* ekstrak ethanol daun Pandan wangi**

Ekstrak ethanol daun Pandan wangi akan diaplikasikan pada lengan bawah relawan. Sebelum dan setelah percobaan setiap area tes (lengan



bawah) dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air, kemudian dikeringkan.

1. Pertama lengan kiri sebagai kontrol dioleskan dengan 1 ml alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam kurungan nyamuk. Amati dan catat jumlah nyamuk yang hinggap dalam periode waktu 30 detik, jika >10 ekor nyamuk hinggap maka pengujian dapat dimulai.
2. Setelah 30 detik lengan tersebut dikeluarkan dengan hati-hati dari kurungan nyamuk.
3. Kemudian lengan yang sama diolesi dengan dosis paling rendah yaitu 5% ekstrak ethanol daun Pandan wangi. Masukkan tangan kembali ke dalam kurungan untuk diamati selama 30 detik.
4. Lengan tidak boleh bergerak selama pengujian

Prosedur ini diulang untuk setiap kenaikan dosis. Uji dilakukan berurutan dan harus dilaksanakan satu dengan lainnya tanpa penundaan dan dosis *repellent* pada setiap tes dihitung sebagai penjumlahan dosis untuk mendapatkan dosis kumulatif pada setiap tes.

Pada akhir pengujian dosis, 1 ml alkohol diolesi pada lengan kanan kemudian dikeringkan kurang lebih 1 menit. Lengan kanan relawan dimasukkan ke dalam kurungan yang sama untuk memastikan bahwa jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan tersebut  $\geq 10$  nyamuk dalam periode waktu 30 detik.

WHOPES merekomendasikan uji dilakukan minimal dengan 3 kali pengulangan. Pengujian kedua dan ketiga dilakukan pada hari yang berbeda, yaitu hari berikutnya pada waktu uji yang sama. Nyamuk yang digunakan pada setiap ulangan merupakan sampel yang berbeda dari sampel nyamuk yang digunakan pada pengujian sebelumnya (WHOPES, 2009).

Pada akhir pengujian persentase daya tolak dinilai sebagai proporsi jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan perlakuan dengan jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan kontrol, dengan formula sebagai berikut:

$$\text{Persentase Daya Tolak (\%)} = \left( \frac{\sum C - \sum T}{\sum C} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

C = nyamuk kontak pada lengan kontrol

T = nyamuk kontak pada lengan perlakuan

Persentase dayatolak dinilai untuk masing-masing konsentrasi dan dirata-ratakan dengan tiap pengulangannya. Setelah didapatkan persentase daya tolak pada masing-masing konsentrasi dinilai konsentrasi yang efektif untuk memperoleh persentase daya tolak 50% dan 99%.

## **F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

### **1. Identifikasi Variabel**

#### **a. Variabel independen**

Variabel independen adalah konsentrasi ekstrak ethanol daun Pandan wangi.

#### **b. Variabel dependen**

Variabel dependen adalah persentase daya tolak terhadap kontak nyamuk *Aedes aegypti* pada masing-masing konsentrasi ekstrak ethanol daun Pandan wangi.

### **2. Definisi Operasional Variabel**

Untuk memudahkan jalannya penelitian, dibuat definisi operasional yang digambarkan dengan Tabel 3 berikut.

**Tabel 3. Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Konsentrasi ekstrak ethanol daun Pandan wangi	Ekstrak ethanol daun Pandan wangi dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% kemudian dicari dosis untuk memperoleh persentase daya tolak 50% dan 99% terhadap kontak nyamuk <i>Aedes aegypti</i> .	Gelas ukur 5 ml dan pipet ukur 1 ml	Menggunakan pipet ukur ambil ekstrak ethanol daun Pandan wangi dan larutkan dalam pelarut yang diujikan. Dihitung secara manual menggunakan rumus: $V_1.M_1 = V_2.M_2$	Kadar (%)	Ordinal
2	Persentase daya tolak	Persentase proporsi jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan perlakuan dengan jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan kontrol berdasarkan rumus pada pedoman WHO (2009), yaitu: $= \left( \frac{\sum C - \sum T}{\sum C} \right) \times 100\%$ Keterangan: C = nyamuk kontak pada lengan kontrol T = nyamuk kontak pada lengan perlakuan Daya tolak dihitung untuk masing-masing konsentrasi, kemudian dihitung untuk mencari persentase daya tolak 50% dan 99% terhadap nyamuk <i>Aedes aegypti</i> .	Kaca pembesar	Dihitung secara manual kemudian dihitung dengan rumus persentase daya tolak WHO	Persentase daya tolak (%)	Numerik

## G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan diuji analisis statistik menggunakan *software* program uji analisis statistik. Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*). Jika distribusi data normal, dilanjutkan dengan metode *one way* ANOVA. Namun, apabila distribusi data tidak normal, akan diuji dengan uji *Kruskal Wallis*. Jika pada uji *one way* ANOVA menghasilkan nilai  $p < 0,05$  (hipotesis dianggap bermakna), dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih terinci. Analisis probit digunakan untuk mengetahui dosis yang efektif untuk memperoleh persentase daya tolak 50% dan 99%.

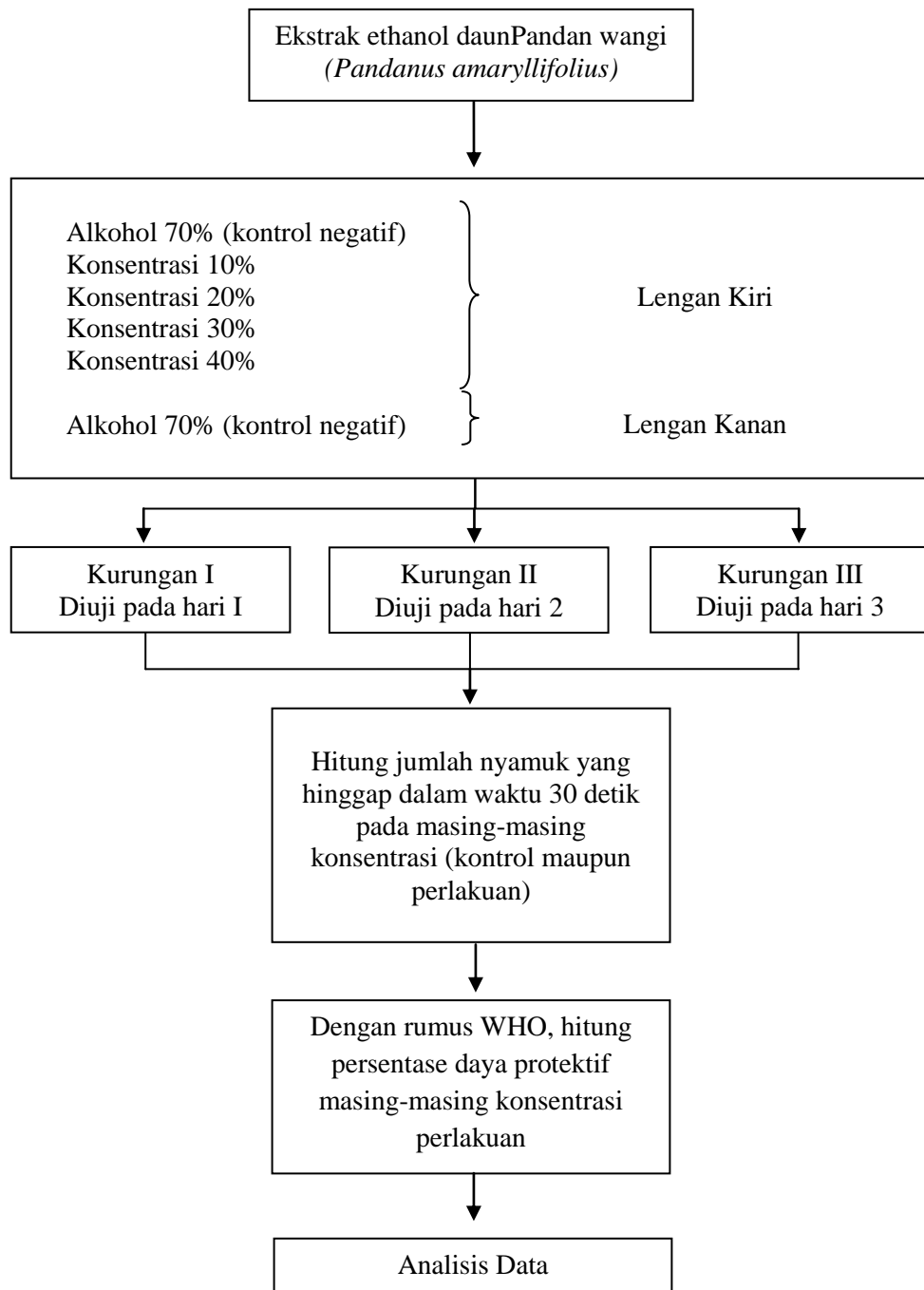
## H. Aspek Etik Penelitian

Menggunakan nyamuk *Aedes aegypti* pada awal telur didapat dari Instalasi Insektarium P2B2 Ciamis dengan keadaan telur yang steril non-infeksius dan dipastikan tidak adanya transmisi virus ke telur. Kemudian dilakukan *rearing* telur tersebut hingga menjadi nyamuk dewasa, *rearing* dilakukan di Laboratorium Zoologi Universitas Lampung sehingga nyamuk tidak terinfeksi oleh virus *Dengue*. Pengujian *repellent* dilakukan sesuai dengan metoda standar uji *repellent* di laboratorium yang dikeluarkan oleh WHOPEs (2009). 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 literature untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian tersebut 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. Penelitian ini telah diajukan dan memperoleh Keterangan Lolos Kaji Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran.

## **I. Alur Penelitian**

Untuk memudahkan peneliti dalam melakukan proses penelitian dibuat diagram alir (Gambar 3).



**Gambar 10.** Alur Penelitian (WHOPES, 2009)