

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah *non eksperimental analitik* dengan desain *cross sectional* untuk mengetahui hubungan resistensi *Aedes aegypti* terhadap malathion di Kecamatan Sleman, Kabupaten Sleman.

B. POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN

Populasi dalam penelitian ini adalah *Aedes aegypti* yang diambil dari Kecamatan Sleman, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Karena jumlah nyamuk *Aedes aegypti* di suatu tempat tidak dapat diketahui secara pasti maka pengambilan sampel dilakukan dengan pemasangan perangkap telur nyamuk (ovipositiontrap, yang disingkat ovitrap). Setiap kelurahan dipilih 6 pedukuhan atau lokasi dengan cara *random* untuk mengambil sampel telur *Aedes aegypti*.

Tabel 3.1 Pengambilan Sampel Pedukuhan Pada Setiap Kelurahan
Sebagai Unit Penelitian

No	Nama Kelurahan	Jumlah Pedukuhan di Kecamatan Sleman	Jumlah Pedukuhan yang digunakan untuk penelitian
1	Caturharjo	20	6
2	Pandowoharjo	22	6
3	Tridadi	15	6
4	Triharjo	12	6
5	Trimulyo	14	6
	TOTAL	83	30

Kriteria inklusi penelitian ini adalah larva *Aedes aegypti* instar III akhir atau instar IV awal yang masih hidup. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah larva *Aedes aegypti* instar III akhir atau instar IV awal yang rusak atau mati sebelum uji resistensi.

C. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) dan Universitas Islam Indonesia (UII) yang sebelumnya mengambil telur *Aedes aegypti* di lapangan. Waktu pelaksanaan penelitian ini pada bulan April 2016 sampai dengan selesai.

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas : Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* Terhadap Malathion
2. Variabel Terikat : Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD)

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Resistensi *Aedes aegypti*

Resistensi *Aedes aegypti* adalah tingkat resistensi larva *Aedes aegypti* yang dideteksi dengan uji biokimia aktivitas enzim esterase diukur dengan pembacaan *absorbance value* (AV) menggunakan alat ELISA *Reader*, dengan panjang gelombang 450 nm (Nusa, dkk., 2008), yaitu :

- a. Sensitif atau Rentan, apabila berwarna kuning atau *colorless*.
- b. Resistensi Ringan, apabila berwarna biru muda.
- c. Resistensi Sedang, apabila berwarna biru kehijauan.
- d. Resistensi Tinggi, apabila berwarna biru tua.

Skala : Ordinal

2. Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD)

Kejadian DBD adalah jumlah kejadian DBD pada tahun 2008 sampai 2014 di daerah Kecamatan Sleman, Yogyakarta. Kategori dibagi menjadi 3, yaitu tinggi, sedang dan rendah. Kategori ditentukan setelah diketahui jumlah kejadian DBD pada tahun 2008 sampai 2014.

- a. Rendah, jumlah kasus DBD 0 – 2 kasus.
- b. Sedang, jumlah kasus DBD 3-5 kasus.
- c. Tinggi, jumlah kasus DBD >5 kasus.

Skala : Ordinal

F. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

1. Pengumpulan telur nyamuk *Aedes aegypti* (Ovitrap)

- a. Ovitrap yang diisi air dari tempat pengambilan sampel sebanyak $\frac{1}{4}$ dari tinggi wadah sebagai tempat mengumpulkan telur nyamuk.
- b. Kertas atau cat hitam untuk membuat ovitrap terlihat gelap.
- c. Pelindung wadah agar air hujan tidak masuk ke dalam ovitrap.
- d. Balok kayu atau kain kasar sebagai daya tarik nyamuk agar nyamuk bertelur di tempat yang disiapkan.



Gambar 3.1 Ovitrap
(Sumber : <http://eaglemedicalservicesllc.com>)

2. Pemeliharaan dari menetasnya telur *Aedes aegypti* hingga menjadi larva instar III akhir atau instar IV awal
 - a. Wadah untuk tempat penetasan telur nyamuk hingga menjadi larva instar III akhir atau instar IV awal.
 - b. Pakan ikan sebagai pakan untuk larva nyamuk
3. Uji Resistensi Biokimia
 - a. Porcelin plate
 - b. Mikroskop
 - c. ELISA reader
 - d. Micropipet untuk mengambil larutan substrat dan reagen dalam jumlah mikroliter dan untuk memindahkan homogenat ke dalam sumuran microplates.
 - e. Microplate wells atau sumuran microplate sebagai tempat untuk mencampur homogenat nyamuk dengan bahan pereaksi lainnya.
 - f. Pipet tetes, pipet ukur, labu ukur, beker glass digunakan untuk membuat reagen.
 - g. Larva instar III akhir atau instar IV awal *Aedes aegypti*.
 - h. Larutan Phosphat Buffer Salin (PBS) 0,02 M, dengan pH = 7,
 - i. Larutan substrat berupa α dan β naphthyl acetat dalam acetone (6 gr/dl) dicampur dengan 50 ml PBS (0,02 M ; pH=7).
 - j. Coupling reagent atau bahan pewarna berupa 150 mg garam Fast Blue B dalam 15 ml akuades dan 35 ml *aquous* (5%;w/v) sodium duodecyl sulphate (Sigma).
 - k. Larutan asam asetat 10%.

G. JALANNYA PENELITIAN

1. Persiapan Penelitian

- a. Survey awal untuk melihat tempat penelitian.
- b. Koordinasi dengan BAPPEDA dan Dinas Kesehatan Kabupaten Sleman, Yogyakarta.
- c. Meminta izin kepada Kecamatan Sleman dan Kelurahan serta pedukuhan yang digunakan untuk penelitian.

2. Pengumpulan telur *Aedes aegypti*

- a. Ovitrap yang berisi air setinggi $\frac{1}{4}$ dari ovitrap disiapkan.
- b. Kertas berwarna gelap dimasukkan ke dalam ovitrap tersebut agar terlihat gelap atau ovitrap dapat dicat dengan cat berwarna gelap sebelum ovitrap tersebut diberi air.
- c. Balok kayu atau kain kasar dimasukkan ke dalam ovitrap yang berisi air sebagai daya tarik nyamuk untuk bertelur di ovitrap tersebut.
- d. Ovitrap diletakkan pada tempat yang disukai nyamuk.
- e. Ovitrap diberi atap atau pelindung jika ovitrap diletakkan diluar rumah agar tidak kemasukan air hujan.
- f. Ovitrap ditunggu hingga 5-7 hari sampai ditemukannya telur di dalam ovitrap tersebut.
- g. Kemudian telur dindahkan ke wadah yang tertutup rapat untuk pemeliharaan telur sampai menjadi pupa.
- h. Telur ditunggu hingga menetas menjadi larva instar III akhir atau instar IV awal.

3. Uji Kadar Enzim *Esterase* dengan Uji Biokemis

- a. Larva yang sesuai dengan persyaratan ditumbuk, dibuat homogenat dengan menambahkan 0,5 ml Buffer Phosphat.
- b. Kemudian 50 μ l homogenat dimasukkan ke dalam sumuran mikroplate.
- c. 50 μ l substrat (α *naphthylacetat*) ditambahkan ke dalam sumuran mikroplate, kemudian ditunggu selama 60 detik.
- d. 50 μ l coupling reagent dicampurkan ke dalam sumuran mikroplate dan di tunggu selama 10 menit.
- e. Reaksi dihentikan segera dengan mencampur 50 μ l asam acetat 10% (perubahan warna dari merah ke biru).
- f. Kemudian hasil reaksi tersebut dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang (λ) 450 nm.
- g. Peningkatan aktivitas enzim *esterase* terlihat dari perubahan warna menjadi biru. Hasil akhir uji biokemis ini akan dinilai secara kualitatif dengan mengamati perubahan warna yang terjadi pada sampel secara visual.
- h. Kriteria penentuan status resistensi, yaitu :
 - 1) Sensitif atau Rentan, apabila berwarna kuning atau *colorless*.
 - 2) Resistensi Ringan, apabila berwarna biru muda.
 - 3) Resistensi Sedang, apabila berwarna biru kehijauan.
 - 4) Resistensi Tinggi, apabila berwarna biru tua.

H. ANALISIS DATA

Data dianalisis menggunakan software *SPSS versi 15* untuk window sedangkan untuk mencari hubungan antara dua variabel menggunakan uji *Kendall's tau*.