

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experimental* dilakukan pada variabel bebas dan terikat yang memengaruhi penelitian berupa pengelompokan anggota-anggota kelompok eksperimen dan kontrol dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control design*. Dalam rancangan ini, kelompok penelitian dibagi menjadi dua yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol yang masing-masing dipilih secara random (R). Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok yang lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol (Hardani.*et al* , 2020).

Tabel 2

Desain Penelitian *Posttest-Only Control Group*

Kelompok	Perlakuan	Post test
R1	X1	O1
R2	X2	O2
R3	X3	O3
R4	X4	O4
R5	X5	O5
R6	Kontrol	O6
R7	X7	O7

Keterangan :

R1 : Kelompok *green extraction* VCO *Euodia hortensis* dengan konsentrasi 5%

R2 : Kelompok *green extraction* VCO *Euodia hortensis* dengan konsentrasi 10%

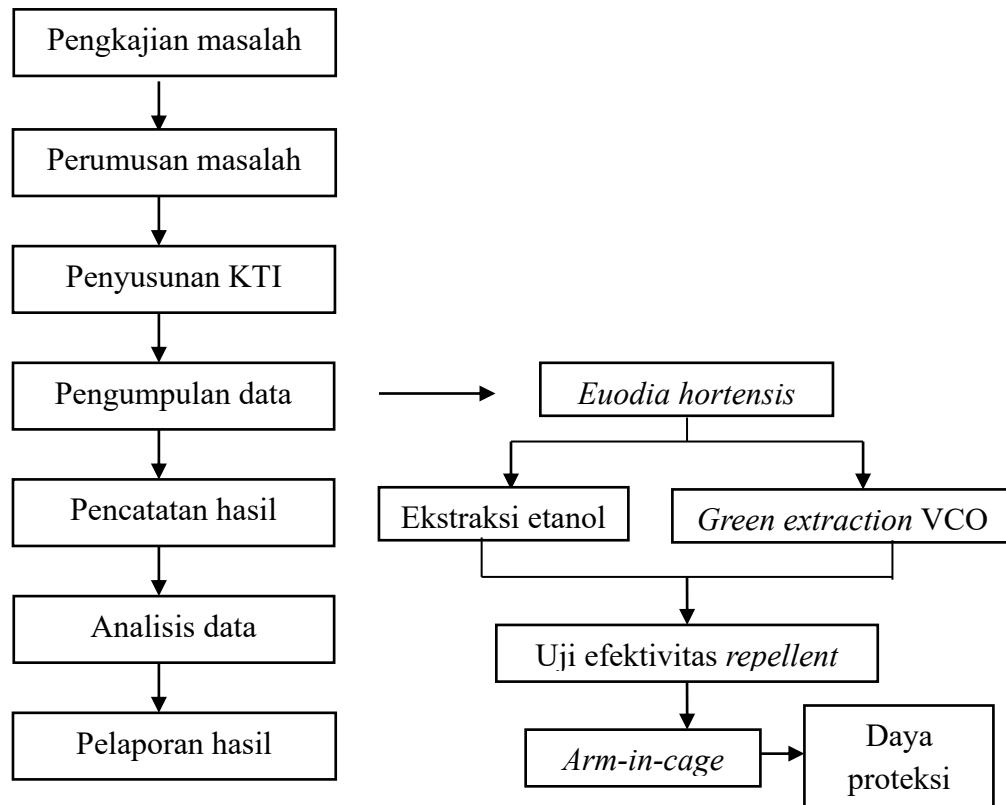
R3 : Kelompok ekstrak etanol *Euodia hortensis* dengan VCO pada konsentrasi 5%

- R4 : Kelompok ekstrak etanol *Euodia hortensis* dengan VCO pada konsentrasi 10%
- R5 : Kelompok kontrol VCO sebagai kontrol pelarut
- R6 : Kelompok kontrol negatif
- R7 : Kelompok kontrol positif
- X1 : Pemberian sediaan *green extraction* VCO *Euodia hortensis* konsentrasi 5% pada kulit subjek uji
- X2 : Pemberian sediaan *green extraction* VCO *Euodia hortensis* konsentrasi 10% pada kulit subjek uji
- X3 : Pemberian sediaan ekstrak etanol dengan VCO konsentrasi 5% pada kulit subjek uji
- X4 : Pemberian sediaan ekstrak etanol dengan VCO konsentrasi 10% pada kulit subjek uji
- X5 : Pemberian VCO murni (kontrol pelarut) pada kulit subjek uji
- X7 : Pemberian *repellent* komersial (DEET) sebagai kontrol positif
- O1 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok *green extraction* VCO konsentrasi 5%
- O2 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok *green extraction* VCO konsentrasi 10%
- O3 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok ekstrak etanol dengan VCO konsentrasi 5%
- O4 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok ekstrak etanol dengan VCO konsentrasi 10%
- O5 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok kontrol VCO

- O6 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok kontrol negatif
- O7 : Perhitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok kontrol positif

B. Alur Penelitian

Berikut merupakan bagan alur penelitian pada penelitian ini :



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu pengambilan bahan daun *Euodia hortensis* di Kebun Pertanian Yayasan Taksu Tridatu, Nusa Penida. Pembuatan ekstrak etanol dan *green extraction* VCO daun *Euodia hortensis* dilakukan di Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis

Poltekkes Kemenkes Denpasar serta pengujian *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Surabaya.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober tahun 2025 hingga April tahun 2026.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah daya proteksi pada tangan yang telah diolesi *repellent* hasil ekstraksi pada variasi konsentrasi *green extraction* VCO dan ekstrak etanol *Euodia hortensis* dengan masing-masing dua jenis perlakuan konsentrasi yaitu 5% dan 10%.

Untuk menilai efektivitas *repellent* dari daun *Euodia hortensis* diperlukan ekstrak pekat dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai stok sampel dan hasil perendaman simplisia dan VCO pada konsentrasi 5% dan 10%. Ekstrak etanol daun *Euodia hortensis* konsentrasi 5% dan 10% dibuat dengan melarutkan ekstrak pekat daun *Euodia hortensis* menggunakan VCO. Penelitian ini menggunakan kontrol negatif tangan tanpa diberi perlakuan, kontrol VCO sebagai kontrol pelarut dan pengaplikasian *repellent* komersial (DEET) sebagai kontrol positif. Total perlakuan yang digunakan dalam konsentrasi penelitian ini adalah 4 perlakuan konsentrasi dan 3 perlakuan kontrol sehingga total perlakuan dalam penelitian ini adalah 7 perlakuan, dengan replikasi sebanyak 4 kali. Dengan melakukan replikasi, variasi acak (*random error*) atau fluktuasi yang mungkin muncul pada satu percobaan bisa dikurangi. Hal ini karena hasil dari beberapa ulangan dapat dirata-ratakan sehingga estimasi efeknya menjadi lebih stabil.

1. Alat

Blender, neraca analitik, beaker glass, gelas ukur, tabung kaca berpenutup, spatula, batang pengaduk, corong, erlenmeyer, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, hotplate, refrigerator, pipet ukur, ball pipet, dan kandang nyamuk ukuran 30 cm x 30 cm x 30 cm.

2. Bahan

Daun *Euodia hortensis*, VCO, etanol 96%, aluminium foil, kertas saring, Dragendroff's, FeCl_3 10%, Kloroform, H_2SO_4 , aquadest, nyamuk betina umur minimal 12 hari sejak fase telur.

3. Prosedur kerja

a. Tahap persiapan (pra-analitik)

1) Pelaksanaan protokol kesehatan

Sebelum melakukan preparasi sampel, digunakan alat pelindung diri (APD) terlebih dahulu. Adapun APD yang digunakan yaitu masker, *handscoon*, dan jas laboratorium. Setelah menggunakan APD dan melakukan disinfeksi pada area kerja dengan menggunakan alkohol 70%.

2) Pembuatan simplisia daun *Euodia hortensis* (Zodia)

Proses pembuatan simplisia daun *Euodia hortensis* yang diadaptasi dari penelitian Yasi, Harsanti and Larasati. (2022) dengan beberapa modifikasi. Pada umumnya pembuatan simplisia melalui tahapan seperti berikut: pengumpulan simplisia, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan.

a) Tahap pengumpulan daun Zodia (*Euodia hortensis*) diambil dengan memetik bagian daunnya.

- b) Daun Zodia kemudian dicuci sebelum dikeringkan. Tahap pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada tanaman.
- c) Kemudian daun Zodia dikeringkan di tempat yang tidak langsung terkena sinar matahari, pengeringan dilakukan selama rentang 5-8 hari.
- d) Setelah kering, daun Zodia dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak untuk memperoleh serbuk halus.
- e) Tahap akhir adalah penyimpanan, supaya mempertahankan kualitas ekstrak kering daun Zodia.

3) Pembuatan ekstrak daun zodia (*Euodia hortensis*)

Pembuatan ekstrak etanolik daun zodia dilakukan secara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 20 gram serbuk daun zodia direndam dalam pelarut etanol 96% selama 2 hari dan dilakukan pengadukan setiap harinya. Hasil dari maserasi ini kemudian di lanjutkan dengan menggunakan *evaporator* sehingga didapatkan ekstrak etanolik daun zodia (Rahmawati., *et al*, 2015).

4) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun *Euodia hortensis*

Ekstrak etanol daun *Euodia hortensis* yang diuji dibuat dalam dua konsentrasi (5% dan 10%), dilakukan dengan melarutkan ekstrak pekat menggunakan VCO sebagai pelarutnya. Untuk konsentrasi 5% dibuat dengan mengambil 0,5 gram ekstrak pekat yang dilarutkan dalam 10 mL VCO dengan kode EV5, sedangkan konsentrasi 10% diambil 0,5 gram ekstrak pekat dan dilarutkan dalam 5 mL VCO dengan kode EV10.

5) Pembuatan variasi konsentrasi *green extraction* VCO daun *Euodia hortensis*

Serbuk simplisia daun *Euodia hortensis* diekstrak dengan metode maserasi

dan menggunakan VCO. Untuk konsentrasi 5% diambil sebanyak 2,5 gram serbuk simplisia yang dilarutkan dalam 100 mL VCO, sedangkan konsentrasi 10% diambil 5 gram serbuk simplisia dan dilarutkan dalam 50 mL VCO. Homogenkan hingga rata dan diamkan selama 2-3 hari, dengan perlindungan dari paparan sinar matahari langsung dan dilakukan pengadukan setiap harinya. Setelah maserasi selesai, saring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu.

6) Persiapan hewan dan kandang uji

Persiapan nyamuk, kandang uji hingga pengujian *repellent* dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat (BBLABKESMAS) Surabaya. Umur nyamuk yang digunakan kira-kira 12 hari setelah fase telur. Nyamuk dipuasakan 1 hari sebelum digunakan untuk penelitian. Kandang uji yang digunakan berukuran 30 x 30 x 30 cm.

b. Tahap pelaksanaan (analitik)

1) Skrining fitokimia ekstrak etanol daun *Euodia hortensis*

Fitokimia adalah senyawa kimia yang secara alami terdapat dalam tanaman dan berkontribusi terhadap efek kesehatan positif atau negatif. Sifat obat dari tanaman ditentukan oleh kandungan fitokimianya. Menurut Shaikh et al., (2020) dengan sedikit modifikasi, prosedur skrining fitokimia untuk beberapa senyawa aktif berikut:

a) Uji alkaloid

Masukkan sedikit mL filtrat ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 1-2 mL reagen Dragendroff's ke dalam tabung. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan coklat kemerahan.

b) Uji flavonoid

Masukkan sedikit ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan beberapa tetes FeCl_3 10%. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan hijau.

c) Uji terpenoid

Tambahkan 2 mL kloroform ke dalam tabung reaksi, kemudian masukkan 5 mL ekstrak ke dalam tabung, tambahkan 3 mL H_2SO_4 dan dipanaskan dalam waterbath. Hasil positif ditandai dengan larutan berwarna abu-abu.

d) Uji tanin

Masukkan 1 mL filtrat ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 3 mL aquadest ke dalam tabung dan tambahkan 3 tetes FeCl_3 10%. Hasil positif ditandai dengan warna biru-hijau.

e) Uji saponin

Panaskan aquadest pada hotplate, kemudian masukkan 1 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi, tambahkan 5 mL aquadest panas ke dalam tabung dan tutup mulut tabung dengan jari, lalu kocok tabung selama ± 5 menit. Lihat busa yang terbentuk, hasil positif ditandai dengan adanya lapisan busa yang stabil selama 10 menit.

2) Uji efektivitas *repellent*

Uji efektivitas *repellent* dilaksanakan mengikuti prosedur yang direkomendasikan oleh WHOPES. Uji efektivitas *repellent* menggunakan subjek manusia, metode ini dipilih karena sesuai dengan kondisi pengguna yang sebenarnya (WHOPES, 2009). Ekstrak daun *Euodia hortensis* akan dioleskan pada lengan bawah peserta, sebelum dan setelah percobaan setiap area tes (lengan bawah) dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air, kemudian dikeringkan.

Pertama lengan kiri sebagai kontrol negatif tanpa perlakuan apapun 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. Setelah 30 detik lengan tersebut dikeluarkan dengan hati-hati dari kurungan nyamuk. Kemudian lengan yang sama di olesi dengan konsentrasi paling rendah yaitu 5% ekstrak daun *Euodia hortensis*. Masukkan kembali lengan ke dalam kurungan untuk diamati selama 30 detik. Lengan tidak boleh bergerak selama pengujian. Prosedur ini diulang untuk setiap kenaikan konsentrasi dan gunakan tangan yang berbeda untuk jenis pelarut yang berbeda. 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). Daya proteksi terhadap gangguan nyamuk dapat ditentukan dengan rumus (Akbar, Nyai Harifah Manurung, Imelda F.E Regaletha, 2022) :

$$P = \left(\frac{C-T}{C} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

P : Daya proteksi

C : Angka hinggap pada lengan kontrol (tanpa perlakuan apapun)

T : Angka hinggap pada lengan yang terolesi perlakuan

c. Tahap akhir (pasca analitik)

1) Dilihat dan dicatat jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan probandus.

- 2) Setelah pengujian, bersihkan alat-alat yang digunakan, cuci tangan dan bersihkan lengan pengujian hingga bersih dari sisa-sisa ekstrak.

E. Jenis, Teknik, dan Instrumen Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer. Data primer dalam penelitian ini berupa daya proteksi *repellent green extraction* VCO dan ekstrak etanol daun *Euodia hortensis* dengan berbagai konsentrasi serta uji kualitatif fitokimia dari ekstrak etanol daun *Euodia hortensis*.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan melalui eksperimen laboratorium dengan cara melihat jumlah nyamuk yang hinggap pada tangan probandus dan daya proteksi dari *repellent* ekstrak etanol dan *green extraction* VCO daun *Euodia hortensis* yang diuji menggunakan metode *arm in cage*, sedangkan fitokimia secara kualitatif.

3. Instrumen pengumpulan data

Pada penelitian ini, perangkat yang digunakan untuk pengumpulan data meliputi APD, alat tulis, serta kamera.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang terkumpul dari hasil uji efektivitas *repellent green extraction* VCO *Euodia hortensis* terhadap nyamuk *Aedes aegypti* yaitu berupa jumlah nyamuk yang hinggap yang dinyatakan dalam angka satuan. Kemudian data ditabulasikan ke dalam bentuk tabel dan narasi.

2. Analisis data

Data yang telah diperoleh lalu dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak. Data diuji dengan uji statistik yang menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk* yang bertujuan untuk menentukan apakah data berasal dari distribusi normal. Data yang ditemukan berdistribusi normal yaitu memiliki nilai ($p > 0,05$). Kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* dengan nilai signifikan ($p > 0,05$) dan didapatkan data bersifat homogen. Jika hasil data didapatkan berdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan uji beda dengan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Uji *Kruskal Wallis* adalah uji statistik nonparametrik yang digunakan untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara median dari tiga kelompok atau lebih yang independen. Uji ini digunakan ketika data tidak memenuhi asumsi normalitas yang diperlukan oleh uji parametrik seperti *One Way ANOVA*. Hipotesis statistik dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H_0 : Tidak terdapat perbedaan daya proteksi *repellent* antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

H_a : Terdapat perbedaan daya proteksi *repellent* pada minimal satu kelompok perlakuan terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

Berdasarkan hipotesis tersebut, H_0 ditolak jika $p\text{-value} \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan daya proteksi *repellent* pada minimal satu kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol terhadap nyamuk *Aedes aegypti*. Sebaliknya jika $p\text{-value} > 0,05$ maka H_0 diterima dan H_a ditolak, dengan

demikian tidak terdapat perbedaan daya proteksi *repellent* antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

G. Etika Penelitian

Pada penelitian ini, prinsip etika yang diterapkan meliputi:

1. *Respect for persons*

Prinsip ini bertujuan menghormati otonomi untuk mengambil keputusan mandiri (*self determination*) dan melindungi kelompok-kelompok dependent (tergantung) atau rentan (*vulnerable*) dari penyalahgunaan (*harm and abuse*).

2. *Beneficence*

Prinsip kebaikan yang bertujuan memberikan manfaat sekaligus meminimalkan potensi kerugian bagi pihak lain.

3. *Non maleficence*

Prinsip untuk tidak merugikan, yang memastikan subjek penelitian tidak diperlakukan sebagai alat semata serta mendapatkan perlindungan dari tindakan penyalahgunaan.

4. Integritas dan kejujuran ilmiah (*research integrity*)

Peneliti melaporkan data secara apa adanya, tanpa manipulasi untuk menyesuaikan dengan hipotesis. Peneliti harus menghindari plagiarisme dan menyampaikan sumber secara transparan.