

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat eksperimen yaitu apakah pemanfaatan ekstrak bunga telang (*Clitorea ternatea*) sebagai alternatif giemsa pada pemeriksaan malaria dapat digunakan. Bunga telang segar yang diekstraksi untuk mendapatkan konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45% lalu dilarutkan dengan pelarut aquades. Konsentrasi yang sudah jadi digunakan untuk mewarnai preparat sediaan tipis malaria. Pengamatan warna konsentrasi dilakukan secara mikroskopis dengan hasil dibandingkan dengan pewarnaan giemsa, karena pengecatan giemsa merupakan teknik pengecatan yang paling bagus dan sering digunakan untuk mengidentifikasi parasit yang ada di dalam darah. Pengamatan dilihat berdasarkan warna pada sitoplasma, inti *Plasmodium*, dan eritrosit.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang bulan Januari-Mei 2024.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah bunga telang yang segar dan mekar karena senyawa kimia dapat ditemukan pada mahkota bunga telang dengan antosianin ditemukan di vakuola sel tanaman. Bunga telang segar memiliki kadar antosianin yang lebih baik karena belum mengalami pemanasan ataupun pengawatan (Purwaniati, 2020).

2. Sampel

Sampel penelitian ini adalah ekstrak bunga telang lalu diencerkan dalam konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45% yang akan digunakan untuk pengecatan pada sediaan apus tipis malaria. Spesimen darah vena positif malaria dalam EDTA yang diperoleh di Puskesmas Sukamaju Teluk Betung Kota Bandar Lampung bulan Januari-Mei 2024.

Besar sampel pada penelitian ini adalah 5 konsentrasi ekstrak bunga telang dan giemsa 3% sebagai kontrol sehingga dilakukan 4 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t : Perlakuan

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5) (n-1) \geq 15$$

$$5n \geq 15+5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini pemeriksaan mikroskopis dengan ekstrak bunga telang (*Clitorea ternatea*) pengenceran 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45% terhadap sediaan tipis malaria.

2. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1. Variabel bebas:						
	a. Ekstrak Bunga Telang (<i>Clitorea ternatea</i>)	Proses pemisahan komponen suatu sampel menggunakan pelarut tertentu.	Pipet ukur dan pengenceran	Pipet ukur	konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45%	Rasio
	b. Giemsa	Pewarna dasar yang paling bagus dan sering digunakan untuk mengidentifikasi parasit yang ada di dalam darah. Mencampur 3 bagian giemsa stock dan 97 bagian larutan <i>buffer</i> .	Pengenceran	Pipet ukur	Giemsa 3%	Rasio

2. Variabel terikat:

Kualitas Pewarnaan Sediaan Apus Darah:	Kualitas sediaan apus darah yang diperiksa di mikroskop. Sitoplasma berwarna biru, inti <i>Plasmodium</i> berwarna merah, dan eritrosit memiliki kontras warna yang jelas	Identifikasi	Mikroskop	Baik skor 5-6 dan kurang baik skor 3-4 (Kusumawati yang idmodifikasi, 2018)	Ordinal
- Sitoplasma					
- Inti <i>Plasmodium</i>					
- Eritrosit					

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Peneliti melakukan penelusuran pustaka.
- b. Peneliti melakukan pra-survei pada lokasi pengambilan spesimen malaria di Puskesmas Sukamaju Teluk Betung Kota Bandar Lampung.
- c. Pembuatan surat izin penelitian dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.
- d. Peneliti mengurus surat perizinan penelitian ke Laboratorium Parasitologi Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- e. Pembuatan simplisa dengan mengumpulkan bunga telang mekar dan segar kemudian disortasi basah dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40-45°C selama 24 jam. Hasil pengeringan ini disebut simplisa.
- f. Pembuatan ekstrak bunga telang di laboratorium teknologi laboratorium medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan proses pengekstraksian simplisa bunga telang dengan metode infusa menggunakan pelarut aquades. Simplisa kering bunga telang ditimbang sebanyak 150 gram kemudian dimasukkan ke dalam beaker *glass* ditambahkan 150 ml aquadest steril. Masukkan beaker *glass* berisi simplisa dan aquadest steril ke dalam panci kukus bersuhu 90°C selama 15 menit untuk proses ekstraksi. Matikan kompor dan serkai ekstrak menggunakan kain flannel.
- g. Pembuatan konsentrasi bahan uji
 Diekstraksi 150 gram simplisa kering bunga telang dalam 150 ml aquades steril maka diperoleh konsentrasi 100%.
 - 1) Kemudian dibuat berbagai macam konsentrasi meliputi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45% melalui pengenceran dengan aquades steril.

2) Rumus pengenceran ekstrak bunga telang yang digunakan adalah

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

- h. Pembuatan preparat sediaan tipis malaria.
- i. Pewarnaan sediaan tipis malaria menggunakan 5 variasi konsentrasi.
- j. Pengamatan mikroskopis terhadap warna sitoplasma dan inti *Plasmodium* pada eritrosit yang dibandingkan dengan pewarnaan giemsa pada sediaan tipis malaria.

2. Cara kerja

a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, neraca analitik, gelas ukur, beaker *glass*, objek *glass*, wadah botol kaca coklat, mikroskop, panci kukus, batang pengaduk, kompor, rak pewarnaan, pipet tetes, pipet ukur, vakum pump, blender, wadah plastik, spatula, corong kaca, cawan arloji, kain flannel, aluminium foil, dan termometer.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang, spesimen darah penderita malaria, methanol absolut, aquadest steril, dan minyak imersi.

b. Pembuatan Simplisa

Menurut Departemen Kesehatan RI tahun 1995, cara pembuatan simplisa:

- 1) Dikumpulkan bunga telang yang telah mekar atau bunga yang telah siap dipetik pada pagi hari dan segar.
- 2) Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun dan batang.
- 3) Dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C– 45°C selama 24 jam.
- 4) Dihaluskan bunga telang kering dengan menggunakan blender, masukkan ke dalam wadah.

Pembuatan simplisa dilakukan pada Rabu, 15 Mei 2024.

c. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

Pembuatan ekstrak ini menggunakan pendekatan metode yang telah dilakukan oleh Wahyuni (2022).

- 1) Disiapkan panci kukus yang digunakan untuk infudasi.
- 2) Ditimbang simplisa kering bunga telang sebanyak 150 gram pada neraca analitik, dimasukkan ke dalam beaker *glass*.
- 3) Ditambahkan aquades steril sebanyak 150 ml sehingga semua bunga telang terendam larutan tersebut dan panaskan dengan panci kukus setelah bersuhu 90°C selama 15 menit dan sesekali diaduk.
- 4) Matikan kompor dan serkai ekstrak menggunakan kain flannel.
- 5) Kemudian infusa ini ditampung dalam botol kaca coklat. Standar penggunaan infusa adalah 24 jam.

Pembuatan ekstrak dilakukan pada Kamis, 16 Mei 2024.

d. Prmbuatan Konsentrasi ekstrak Bunga Telang

Diekstraksi 150 gram simplisa kering bunga telang dalam 150 ml aquadest steril maka diperoleh konsentrasi 100%, kemudian dibuat berbagai macam konsentrasi meliputi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45% melalui pengenceran dengan aquadest steril (Rahayu, 2020). Ekstrak diencerkan dengan variasi konsentrasi dengan rumus pengenceran : (Manu, 2013)

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2.$$

keterangan :

V_1 = volume larutan uji yang di pipet (ml)

$\%_1$ = konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquadest steril

$\%_2$ = konsentrasi yang akan dibuat (%)

Pembuatan konsentrasi pada Jumat 17 Mei 2024.

e. Pembuatan Sediaan Tipis Malaria

Spesimen darah yang dinyatakan positif malaria diperoleh dari Puskesmas Sukamaju Teluk Betung Kota Bandar Lampung. Pada sediaan tipis terdiri dari satu lapisan sel darah merah yang tersebar dan digunakan untuk membantu identifikasi parasit malaria setelah

ditemukan dalam SD tebal. Pembuatan sediaan tipis malaria sebagai berikut:

- 1) Teteskan 1 tetes darah kecil darah ($\pm 2\mu\text{l}$) di bagian tengah objek *glass* untuk sediaan tipis.
- 2) Letakkan objek *glass* yang berisi tetesan darah di atas meja atau permukaan yang rata.
- 3) Untuk membuat SD tipis, ambil objek *glass* baru (objek *glass* kedua). Tempelkan ujungnya pada tetes darah kecil sampai darah tersebut menyebar sepanjang objek *glass*.
- 4) Dengan sudut 45° geser objek *glass* tersebut dengan cepat, sehingga didapatkan sediaan hapus (seperti bentuk lidah).
- 5) Pemberian label/etiket pada bagian ujung objek *glass* bisa menggunakan kertas label atau *object glass frosted*.
- 6) Pengeringan SD dilakukan secara perlahan-lahan di tempat yang datar.
- 7) Setelah kering, dilakukan pewarnaan. Pada keadaan tidak memungkinkan selambat-lambatnya dalam waktu 24 jam SD harus sudah diwarnai. (Kemenkes RI, 2020)

Pembuatan sediaan pada hari Senin, 20 Mei 2024.

f. Pemantapan Mutu Internal Giemsa

Melakukan dengan kertas whatman dan methanol (metil alkohol) :

- 1) Letakkan kertas saring pada disk
- 2) Teteskan 1-2 tetes giemsa stock, tunggu menyebar
- 3) Teteskan 3-4 tetes methanol absolut ditengah lingkaran giemsa secara perlahan. (Kemenkes RI, 2020)

Pemantapan dilakukan pada hari Senin, 20 Mei 2024.

g. Pewarnaan Preparat

- 1) SD tipis yang sudah kering difiksasi dengan methanol.
- 2) Letakkan pada rak pewarna dengan posisi darah berada di atas.
- 3) Siapkan 5 variasi konsentrasi bunga telang yaitu 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45%.

- 4) Sediaan digenangi infusa bunga telang (*Clitorea ternatea*) dengan konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45%. Diamkan selama 20 menit kemudian dibilas dengan air mengalir.
- 5) Sediaan dikering anginkan tanpa bantuan pengering.
- 6) Lakukan juga pewarnaan pada sediaan yang menggunakan pewarna giemsa 3% sebagai pembanding. Digenangi selama 45-60 menit. Bilas dengan air mengalir lalu kering anginkan.
- 7) Sediaan diamati menggunakan mikroskop.
Pewarnaan preparat pada hari Senin, 20 Mei 2024.

h. Pengamatan Mikroskopis

Sediaan yang sudah melalui pengecatan diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x menggunakan minyak imersi.

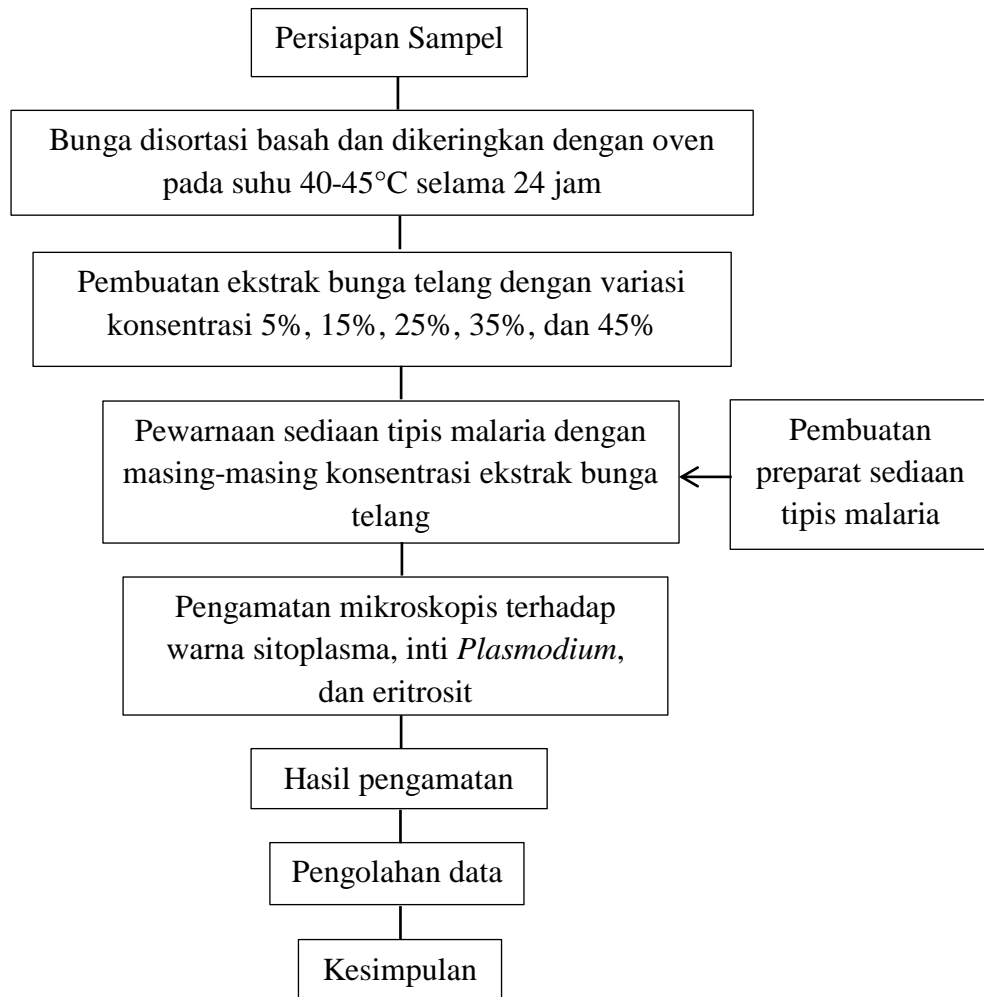
Parasit malaria terdiri dari :

- 1) Inti/kromatin; bentuknya bulat dan berwarna merah.
- 2) Sitoplasma; bentuknya seperti cincin sampai bentuk yang tidak beraturan, umumnya berwarna biru.

Pengamatan dilakukan pada hari Selasa, 21 Mei 2024.

Petunjuk paling sederhana untuk membedakan keempat spesies malaria adalah perubahan yang terlihat pada sel darah merah yang terinfeksi. Ukuran sel darah merah yang terinfeksi tampak membesar atau normal. Titik Schuffner atau Maurer dapat ditemukan di sitoplasma eritrosit yang terinfeksi (Kemenkes RI, 2020).

F. Alur Penelitian



G. Analisis Data

Data diperoleh dengan pengamatan secara mikroskopis. Dianalisis secara deskriptif, disajikan dalam bentuk tabel dengan membandingkan hasil pewarnaan ekstrak bunga telang pada konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, dan 45% yang kontras menghasilkan kualitas warna sama baik seperti cat giemsa sebagai pembandingnya.