

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat *True Eksperimental* yaitu pemanfaatan ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) sebagai pewarna alternatif pengganti giemsa pada pewarnaan sediaan apusan darah pemeriksaan malaria. Daun bayam merah segar yang diekstraksi untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% lalu dilarutkan dengan pelarut etanol 96%. Konsentrasi yang sudah jadi digunakan untuk mewarnai preparat sediaan tipis malaria. Pengamatan warna konsentrasi dilakukan secara mikroskopis dengan hasil dibandingkan dengan pewarnaan Giemsa 3%, karena pengecatan giemsa merupakan teknik pewarnaan standart dan sering digunakan untuk mengidentifikasi parasit yang ada di dalam darah. Pengamatan dilihat berdasarkan warna pada sitoplasma, inti *Plasmodium*, eritrosit, dan latar belakang sediaan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun bayam merah dilaksanakan di Laboratorium Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Pemeriksaan sediaan apusan darah malaria dengan pewarna ekstrak daun bayam merah dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang bulan Juni 2025.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi subjek penelitian ini adalah daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) dalam keadaan segar tidak layu, daun yang berwarna ungu, tidak terkena penyakit dan bebas dari serangga atau hama yang didapatkan dari Pasar Rakyat Way Halim Kota Bandar lampung. (Lampiran 9 gambar 1)

2. Sampel

Sampel penelitian ini adalah ekstrak daun bayam merah yang didapatkan dari Pasar Rakyat Way Halim Kota Bandar lampung dan

kemudian diencerkan dalam konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% yang kemudian digunakan untuk pewarnaan pada sediaan apus tipis malaria. Spesimen darah vena positif malaria dalam EDTA yang diperoleh di Puskesmas Hanura Kabupaten Pesawaran Bulan Juni 2025. Perlakuan pada penelitian ini adalah 4 konsentrasi ekstrak daun bayam merah dan giemsa 3% sebagai kontrol sehingga dilakukan 5 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer, yaitu :

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

Keterangan :
t : Perlakuan
n : Pengulangan

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

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

$$(4)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 5$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini pemeriksaan mikroskopis dengan daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) pengenceran 25%, 50%, 75%, dan 100% terhadap sediaan apusan darah tipis malaria.

2. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel bebas: a. Ekstrak Daun Bayam Merah (<i>Amaranthus tricolor L.</i>)	Hasil proses maserasi daun bayam merah (<i>Amaranthus tricolor L.</i>) menggunakan pelarut etanol 96%, yang kemudian diencerkan menjadi ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%	Pipet ukur dan pengenceran	Pipet ukur	Konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.	Rasio
	b. Giemsa	Pewarna dasar terbaik dan paling umum digunakan untuk mendeteksi parasit dalam darah. Dengan Mencampurkan 3 bagian Giemsa stock dengan 97 bagian buffer pH 7,2.	Pengenceran	Pipet ukur	Giemsa 3%	Rasio
2.	Variabel terikat Kualitas Pewarnaan Sediaan Apus Darah:	Kualitas sediaan apus darah yang diperiksa di mikroskop.	Identifikasi	Mikroskop	Baik skor 6-8 dan kurang baik skor 4-5 (Kusumawati, 2018)	Ordinal
	- Sitoplasma - Inti <i>Plasmodium</i> - Eritrosit - Latar Belakang Sediaan	Sitoplasma berwarna biru, inti <i>Plasmodium</i> berwarna merah, eritrosit memiliki kontras warna yang jelas dan latar				

belakang
sediaan bersih
tidak ada sisa
cat.

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian
 - a. Pembuatan surat izin penelitian dari Politeknik Kesehatan Kementerian Tanjungkarang dan pembuatan surat izin untuk pengambilan sampel darah positif malaria di Puskesmas Hanura Kabupaten Pesawaran.
 - b. Pembuatan simplisia dilakukan di tempat tinggal peneliti dengan menyiapkan daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) kemudian dicuci dan dikeringkan dengan oven lalu dihaluskan. Hasil penghalusan ini disebut simplisia (Guntarti dan Rulyani, 2020).
 - c. Pembuatan ekstrak daun bayam merah dilakukan di Laboratorium Organik FMIPA Universitas Lampung dengan proses pengekstraksian simplisia daun bayam merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
 - 1) Simplisia kering daun bayam merah diblender hingga halus.
 - 2) Dimasukkan ke dalam botol berwarna hitam. Ditambahkan larutan etanol sebagai pelarut hingga simplisia terendam etanol 96%, maserasi 3 hari.
 - 3) Hasil maserasi disaring hingga didapatkan maserat.
 - 4) Maserat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evoporator* hingga diperoleh ekstrak agak kental.
 - d. Pembuatan konsentrasi bahan uji
 - a. Larutan ekstrak 100% yang sudah dipanaskan lalu diencerkan menjadi konsentrasi 25%, 50%, dan 75%.
 - b. Rumus pengenceran ekstrak daun bayam merah yang digunakan adalah : $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$
 - e. Pengambilan sampel darah positif malaria di Puskesmas Hanura Kabupaten Pesawaran lalu sampel dibuat sediaan apus tipis kemudian dikeringkan.

- f. Ekstrak daun bayam merah konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% dilakukan pengecatan pada sediaan apus tipis dengan berbagai konsentrasi.

Cara kerja :

a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: labu ukur 1000 ml, gelas beaker 1000 ml, kertas saring, botol kaca 1000 ml, objek glass, mikroskop, gelas plastik, pipet tetes, gelas ukur, botol coklat, *rotary evaporator*, dan sendok plastik.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Giemsa stock*, *buffer*, etanol 96%, *aquadest*, daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*), sampel darah positif malaria.

b. Pembuatan simplisia

Daun bayam merah dicuci hingga bersih dan ditimbang 500 gram secara memanjang. Selanjutnya, potong kecil-kecil daun bayam merah dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40-45°C selama 6 jam. Daun bayam merah kering dihancurkan dalam blender, diayak menjadi bubuk dan disimpan dalam wadah kering dan kedap udara (Guntarti dan Rulyani, 2020) (Lampiran 9 Gambar 1 dan 2).

c. Pembuatan ekstrak daun bayam merah

Prosedur pembuatan ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) sebagai berikut : (Lampiran 9 Gambar 4-8)

- 1) Disiapkan 1 toples kaca ukuran 5000 ml.
- 2) Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) ditimbang sampai 500 gram dan dimasukkan ke dalam toples kaca.
- 3) Selanjutnya direndam serbuk dalam 5000ml pelarut etanol 96% sampai terendam seluruhnya.

- 4) Kemudian simplisia dimaserasi selama tiga hari agar komponen aktif dalam daun bayam merah dapat terlarut dengan maksimal.
- 5) Setelah dimaserasi, selanjutnya disaring sehingga didapatkan maserat.
- 6) Maserat yang diperoleh kemudian dipadatkan menggunakan rotary evaporator pada kecepatan 60 rpm dan suhu 50°C selama 4 jam hingga menghasilkan ekstrak yang lebih kental (Kurniawan *et al.*, 2024).
- 7) Kemudian dibuat pengenceran ekstrak menjadi beberapa konsentrasi menggunakan *aquadest* steril dengan menggunakan 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 dibuat dengan aquadest steril

$\%_2$ = konsentrasi yang akan dibuat (%) (Lampiran 9 Gambar 4 sampai 8).

d. Pewarnaan sediaan apusan tipis

Sampel darah malaria diperoleh di Puskesmas Hanura Kabupaten Pesawaran. Sampel dibuat apusan darah tipis lalu dikeringkan kemudian dilakukan pengecatan menggunakan ekstrak daun bayam merah dan Giemsa 3%.

1) Pewarnaan dengan ekstrak daun bayam merah

Prosedur pewarnaan menggunakan ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) sebagai berikut :

- a) Sediaan tipis yang telah dikeringkan difiksasi menggunakan metanol.
- b) Setelah itu, sediaan diletakkan pada rak pewarna dengan posisi darah berada di atas.

- c) Ekstrak daun bayam merah kemudian disiapkan dalam konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%. Dituangkan ekstrak daun bayam merah ke seluruh slide. Lalu didiamkan selama 45-60 menit.
- d) Kemudian dibilas pada air mengalir secara perlahan-lahan lalu sediaan diangkat dan dikeringkan (Lampiran 9 Gambar 10)

2) Pewarnaan dengan Giemsa 3%

Prosedur pewarnaan menggunakan Giemsa 3% sebagai berikut :

- a) Sediaan tipis yang telah dikeringkan difiksasi menggunakan metanol.
- b) Setelah itu diletakkan pada rak pewarna dengan posisi darah berada di atas.
- c) Cat Giemsa 3% yang telah diencerkan dengan perbandingan 4:1 antara Giemsa stock dan buffer 7,2 diteteskan pada objek kaca hingga menutupi permukaan. Lalu didiamkan 45-60 menit.
- d) Bilas SD tipis pada air mengalir lalu diangkat dan dikeringkan sediaan. Setelah kering, sediaan siap diperiksa di mikroskop (Wahyuni, 2019).

e. Pemeriksaan di bawah mikroskop

Setelah sediaan apusan darah tipis dilakukan pewarnaan dengan ekstrak daun bayam merah konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, dan pewarnaan Giemsa 3% selanjutnya dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop. Prosedur pemeriksaan sediaan apusan darah tipis di bawah mikroskop :

- 1) Sediaan tipis diletakkan pada meja sediaan mikroskop.
- 2) Selanjutnya, amati SD Tipis menggunakan lensa objektif dengan perbesaran 10x, kemudian disesuaikan fokus lapang pandang.
- 3) Sediaan darah tipis ditetesi Minyak Imersi.

- 4) Kemudian diganti lensa objektif menjadi perbesaran 100x.
- 5) Lapang pandang difokuskan dengan cara memutar mikrometer sampai eritrosit terlihat dengan jelas
- 6) Memeriksa SD tipis dengan menggerakkan meja sediaan dengan arah kekiri dan kekanan sesuai arah panah untuk menemukan parasit.
- 7) Setelah menemukan parasit dilakukan pengamatan jenis *Plasmodium*, warna sitoplasma, inti *Plasmodium* dan eritrosit (Lampiran 9 Gambar 11).
- 8) Kemudian dilanjut skoring penilaian kualitas pewarnaan sediaan apus darah berdasarkan tabel di bawah ini :

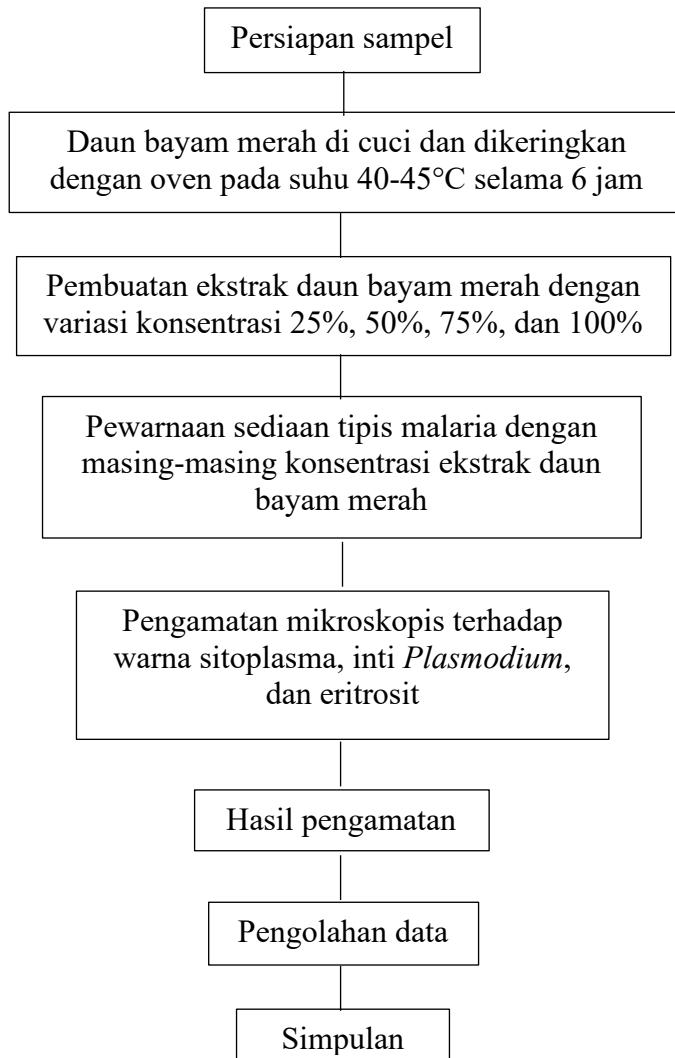
Tabel 3.2 skoring penilaian kualitas pewarnaan sediaan apus darah

No.	Objek yang diamati	Hasil	Skor
1.	Sitoplasma	Biru, morfologi utuh	2
		Pucat/tidak sesuai	1
2.	Inti <i>Plasmodium</i>	Merah keunguan	2
		Pucat/tidak sesuai	1
3.	Eritrosit	Kontras warna jelas	2
		Pucat/gelap/kontras warna tidak sesuai	1
4.	Latar Belakang Sediaan	Bersih tidak ada sisa cat	2
		Pucat/gelap/kontras warna tidak sesuai	1

Keterangan :

- Rentang skor : 4-8
 - Kategori skor :
 - 6-8 dikategorikan “Baik”
 - 4-5 dikategorikan “kurang Baik”
- (Kusumawati, 2018 yang dimodifikasi).

F. Alur Penelitian



G. Analisis Data

Data hasil skoring yang diperoleh dari hasil penilaian ditotal lalu dihitung rerata skoring. Nilai skor yang diberikan pada 4 parameter yaitu 1-2 dengan total skor dikategorikan baik apabila skor 6-8 dan tidak baik dengan skor 4-5 (Kusumawati, 2018 yang dimodifikasi). Hasil skoring dari penilaian parameter dianalisis secara *Bivariat* dengan *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikan $p<0,05$.