

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental. Sebagai alternatif pengganti eosin 2% untuk mewarnai telur *Ascaris lumbricoides* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua variabel utama yang digunakan pada penelitian ini adalah variabel bebas (independen) yaitu ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) konsentrasi 75%, 85%, 95% dan kontrol positif menggunakan eosin 2%. Sedangkan variabel terikat (dependen) yaitu kualitas sediaan telur cacing *Ascaris lumbricoides*. Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu $(t - 1) (n - 1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk uji evelktifitas sediaan telur cacing dengan pewarna ekstrak bunga rosella konsentrasi 75%, 85%, 95%. Selanjutnya proses pembuatan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung, pada bulan Maret – Mei 2025.

C. Subyek Penelitian

Subjek penelitian ini merupakan bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) yang diambil adalah dengan karakteristik yang masih segar berwarna merah. Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) dijadikan ekstrak menggunakan pelarut etanol 96%, lalu dibuat pengenceran dengan konsentrasi yaitu 75%, 85% dan 95% yang digunakan sebagai larutan pengganti eosin 2% dalam pemeriksaan telur cacing *Ascaris lumbricoides*. Telur cacing *Ascaris lumbricoides* yang digunakan dalam penelitian ini dibeli oleh peneliti di Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah siap dipakai oleh peneliti untuk keperluan penelitian. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan, jumlah pengulangan berdasarkan rumus Federer yaitu :

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

Keterangan :

t : Perlakuan

n : Pengulangan

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

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 18 / 3$$

$$n \geq 6$$

Jadi setiap sampel dilakukan 6 kali pengulangan.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel bebas: Efektivitas Ekstrak bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa l</i>)	Ekstrak bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa l</i>) yang digunakan sebagai pewarna sediaan telur cacing <i>Ascaris lumbricoides</i> dengan berbagai konsentrasi 75%, 85% dan 95%	Dengan Metode ekstraksi, kemudian ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$	Botol reagen, corong gelas, corong pisah, erlemeyer, kertas saring dan tabung reaksi dan timbangan analitik	Persen ekstrak bunga rosella (75%, 85% % dan 95%) Kontrol (+) Eosin 2%	Rasio
2.	Variabel Pembanding : Zat warna eosin 2%	Pewarna eosin 2% yang digunakan sebagai pembanding dalam pewarnaan sediaan telur cacing <i>Ascaris lumbricoides</i>	Digunakan langsung sebagai kontrol	Larutan eosin 2% siap pakai	Konsentrasi 2% sebagai pembanding	Rasio
3.	Variabel Terikat : kualitas sediaan telur cacing <i>Ascaris lumbricoides</i>	sediaan telur cacing <i>Ascaris lumbricoides</i> dinilai berdasarkan kontras lapang pandang, penyerapan warna, dan kejelasan bagian telur cacing dengan ekstrak bunga rosella (<i>Hibiscus sabdariffa l.</i>) konsentrasi 75%, 85% dan 95%	Melakukan pengamatan preparat	Mikroskop	Konsentrasi 75%, 85% dan 95%. terhadap eosin 2% 1. Tidak kontras 2. kurang kontras 3. kontras	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

Pada penelitian ini menggunakan tiga perlakuan dengan variasi konsentrasi yaitu konsentrasi bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) 75%, 85%, 95% dan eosin 2% sebagai kontrol positif.

1. Prosedur Penelitian

- a. Permohonan izin diajukan kepada Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk proses pembuatan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- b. Melakukan pengumpulan bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian yaitu bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*).
- c. Menyiapkan alat alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*).
- d. Pembuatan simplisia bunga rosella.
- e. Pembuatan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- f. Pembuatan pengenceran dengan konsentrasi 75%, 85%, 95% dengan 6 kali pengulangan.
- g. Melakukan pemeriksaan mikroskopis telur cacing dengan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) pada masing-masing konsentrasi menggunakan mikroskop perbesaran 10x dan 40x di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Metode pemeriksaan telur cacing

Pada penelitian ini menggunakan metode secara langsung yaitu *Direct slide*.

3. Prosedur Kerja

- a. Persiapan alat dan bahan

1) Persiapan alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : mikroskop, *beaker glass*, pipet tetes, rak tabung, neraca analitik, lidi, tabung reaksi, *objek glass*, *deck glass*, kertas lensa, pipet ukur, karet penghisap, pisau, spatula, neraca digital, corong, saringan, blender, gelas ukur, *rotary evaporator*, batang pengaduk, botol reagen.

2) Persiapan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), etanol 96%, Eosin 2%, aquadest steril dan sampel feses (+) telur cacing *Ascaris lumbricoides*.

3) Proses Determinasi

proses determinasi terhadap sampel bunga rosella yang dikumpulkan dari petani bunga rosella di Lampung Timur. Pertama, sampel dicuci bersih dan dikeringkan untuk menghilangkan debu dan kelembapan. Kemudian, dilakukan observasi morfologi pendetail, mencakup pengukuran panjang kelopak, diameter bunga, warna, tekstur permukaan, dan struktur benang sari serta kepala putik. Selanjutnya, ciri-ciri tersebut dicocokkan dengan kunci determinasi (*Dichotomous key*) yang disusun berdasarkan literatur taksonomi *Hibiscus*, termasuk panduan dari karya-karya klasik dan pustaka taksonomi regional. Setiap ciri diamati dan dipilih pada langkah kunci secara bertahap hingga mencapai identifikasi genus dan spesies. Setelah identifikasi awal sebagai *Hibiscus sabdariffa*, kemudian di verifikasi dengan membandingkan sampel herbarium dari Herbarium Universitas Lampung (HUL). Jika ditemukan perbedaan signifikan, dilakukan pemeriksaan anatomi dan mikroskopis lebih lanjut terhadap bagian daun dan tangkai. Proses determinasi ini menghasilkan validasi ilmiah bahwa sampel tersebut benar-benar *H. sabdariffa*. Hasil akhir dokumentasi disusun dalam format lembar pdf yang dikeluarkan dari Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

4) Proses pembuatan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

a) Pembuatan simplisia

Sampel bunga rosella \pm 4 kg dikumpulkan dengan karakteristik yang masih segar berwarna merah, lalu dicuci pada air bersih kemudian ditiriskan. Sampel dijemur menggunakan tutupan kain hitam dan diletakkan dibawah sinar matahari dengan tidak langsung. Simplisia setelah mengering selanjutnya dihaluskan menggunakan alat blender

kemudian disaring dengan ayakan simplisia ukuran 40 mesh, dan diletakkan di dalam wadah kering dan bersih.

b) Pembuatan ekstrak bunga rosella

Serbuk simplisia 250 gr direndam menggunakan etanol 96% sebanyak 5 liter dan diaduk menggunakan batang pengaduk lalu diamkan selama 3 x 24 jam di dalam wadah yang tertutup dan diaduk agar tidak jenuh setiap 24 jam disuhu ruang, kemudian setelah 3 x 24 jam disaring menggunakan kertas saring dan corong kaca sehingga diperoleh filtrat. Kemudian seluruh filtrat yang didapat lalu dipekatkan menggunakan vacum *rotary evaporator* selama 6 jam dengan suhu 40 °C hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh saat proses evaporasi dari air berubah kental seperti sirup, warna menjadi lebih pekat dan gelap, tidak ada lagi tetesan pelarut yang keluar pada tabung rotary evaporator, volume akhir hingga tersisa 1/8 dari volume awal filtrat. Setelah itu dilakukan pengenceran 75%, 85%, 95% menggunakan aquadest steril dan dilakukan perhitungan menggunakan rumus pengenceran.

$$V1 \times \%1 = V2 \times \%2$$

Keterangan :

V1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = konsentrasi larutan (%)

V2 = Volume larutan yang diinginkan (ml)

%2 = konsentrasi yang dibuat (%)

c. Pembuatan preparat telur cacing *Ascaris lumbricoides*

1. Pembuatan sediaan preparat menggunakan ekstrak bunga rosella dengan konsentrasi 75%, 85%, 95%. Ekstrak bunga rosella diaplikasikan pada kaca objek dengan tetesan sebanyak 1 tetes. Selanjutnya, sampel telur cacing diambil menggunakan lidi dan dicampurkan dengan ekstrak bunga rosella hingga homogen. Campuran tersebut kemudian ditutup menggunakan *deck glass* dan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 10x dan 40x.

2. Pembuatan preparat menggunakan eosin 2%

Eosin 2% diteteskan pada kaca objek sebanyak 1 tetes. Selanjutnya sampel telur cacing diambil menggunakan lidi dan dicampurkan hingga homogen. Campuran tersebut kemudian ditutup dengan menggunakan *deck glass* dan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 10x lalu diperjelas menggunakan lensa objektif 40x.

3. Interpretasi hasil pemeriksaan

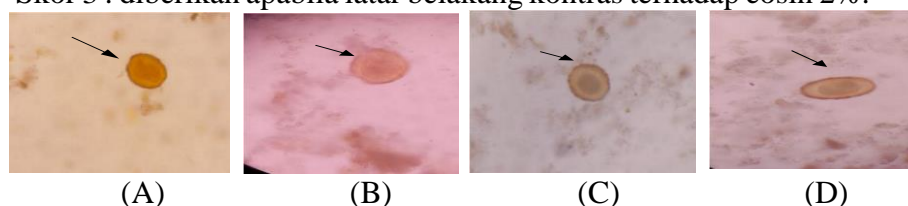
Interprestasi hasil pada pemeriksaan telur cacing dilihat berdasarkan penilaian skala *Likert scale* (skoring) 1, 2, dan 3.

Kriteria penilaian :

Skor 1 : diberikan apabila latar belakang tidak kontras terhadap eosin 2%.

Skor 2 : diberikan apabila latar belakang kurang kontras terhadap eosin 2%.

Skor 3 : diberikan apabila latar belakang kontras terhadap eosin 2%.



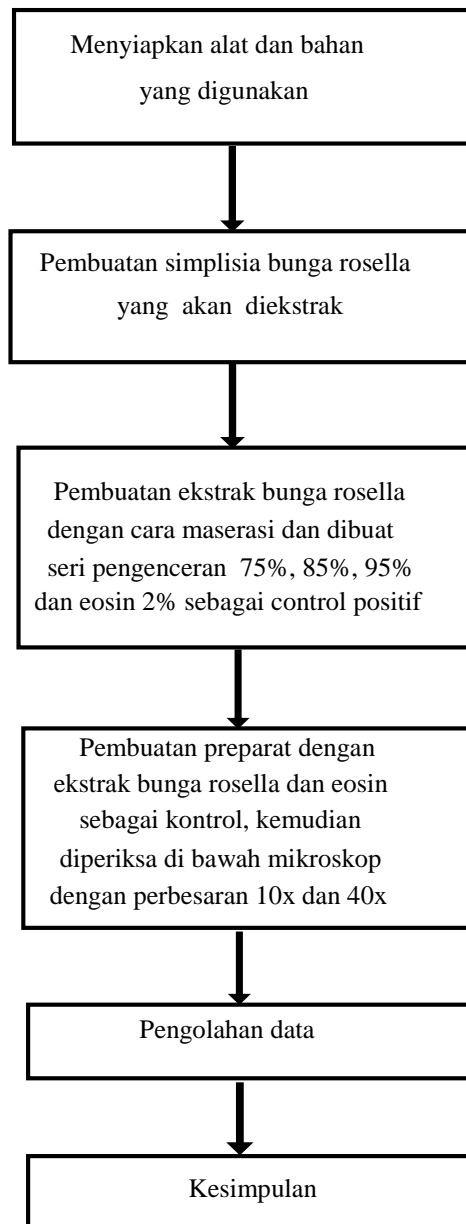
Sumber : (Nisa, K. (2024).

Gambar .3.1.) A). Telur Cacing *Ascaris lumbricoides* dengan Kontrol Eosin 2;
 B). Skor 1 pada pewarnaan Telur Cacing *Ascaris lumbricoides* dengan konsentrasi 50%;
 C). Skor 1 pada pewarnaan Telur Cacing *Ascaris Lumbricoides* dengan konsentrasi 60%;
 D). Skor 2 pada pewarnaan Telur Cacing *Ascaris lumbricoides* dengan konsentrasi 75%.

Keterangan :

- 1). Tidak baik : Hasil lapang pandang tidak kontras, telur cacing tidak menyerap warna, bagian telur cacing tidak terlihat jelas.
- 2). Kurang baik : Hasil lapang pandang kurang kontras, telur cacing kurang menyerap warna, bagian telur kurang jelas terlihat.
- 3). Baik : Hasil lapang pandangnya kontras, telur cacing menyerap pewarna, bagian telur cacing terlihat jelas.

F. Alur Penelitian



G. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Data didapatkan dari hasil pemeriksaan kualitas sediaan menggunakan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa l.*) sebagai alternatif pengganti zat warna eosin 2%. Hasil pewarnaan sediaan telur cacing *Ascaris lumbricoides* dilakukan 6 kali pengulangan dengan berbagai konsentrasi (75%, 85%, dan 95%) dibandingkan dengan zat warna eosin 2%. Setiap kelompok perlakuan diamati dengan menggunakan mikroskop dan dinilai berdasarkan beberapa parameter yaitu :

- a. Kejelasan warna
- b. Tingkat kontras warna
- c. Kejelasan bentuk morfologi telur *Ascaris lumbricoides*

Setiap parameter diamati oleh 2 orang pengamat (*Blind observer*) untuk menghindari bias. Data dari setiap pengamat dikumpulkan, lalu dihitung nilai rerata (*Mean*) dan simpangan bakunya.

2. Analisis Data

Pengolahan data hasil observasi dari masing-masing kelompok perlakuan diringkas menggunakan statistik deskriptif rata-rata (*Mean*), simpangan baku (*Standard deviation*), minimum dan maksimum skor pewarnaan deskripsi ini menggambarkan dari efektivitas setiap konsentrasi ekstrak rosella. Dalam penelitian ini hasil yang dianalisis bersifat ordinal hasil observasi scoring kontras, ketajaman warna dan kejelasan bentuk morfologi, Pengolahan dan maka dilakukan uji non-parametrik:

a. Uji Kruskal-Wallis

Digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan efektivitas pewarnaan yang signifikan antara keempat kelompok (rosella 75%, 85%, 95%, dan eosin 2%). Jika hasil signifikan

b. Uji Sensitivitas

Digunakan untuk menguji seberapa sensitif hasil penelitian terhadap perubahan asumsi, parameter, atau variabel input. Tujuannya adalah untuk melihat keandalan kesimpulan penelitian.

Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak statistik IBM SPSS versi *Statistics 25*.

H. Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)

Penelitian ini akan dilanjutkan setelah mendapat persetujuan dari komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan No.327/KEPK-TJK/V/2025 pada tanggal 19 Mei 2025 (*lampiran 2*). Penelitian ini tidak mengakibatkan risiko terhadap lingkungan. Limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini dikumpulkan lalu diolah dengan penanganan limbah sesuai standar yang diatur dalam peraturan Permenkes dan peraturan Lingkungan Hidup. Limbah sediaan preparat dikumpulkan kemudian dibuang ke kotak *safety box* lalu diolah dengan penanganan limbah. Sementara Limbah larutan uji ekstrak bunga rosella yang telah dilakukan pemeriksaan dibuang kedalam saluran pembuangan agar limbah tersebut tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan.