

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis yang digunakan pada penelitian ini adalah *pre-eksperiment* yang belum sepenuhnya sebagai eksperimen sungguh-sungguh. Hal ini disebabkan adanya pengaruh variabel luar atau variabel pengganggu terhadap variabel terikat. Jadi hasil penelitian yang menjadi variabel terikat tidak sepenuhnya dipengaruhi oleh variabel bebas, melainkan juga oleh variabel luar tanpa melibatkan adanya variabel kontrol. (Adiputra Sudarma & Trisnadewi, Ni Wayan, 2021; Sugiyono dan Puspandhani, 2020)

Perlakuan pada penelitian ini adalah melakukan pewarnaan pada sediaan apus darah tepi menggunakan alat *chamber stain*. Hasil pengamatan ini diperoleh skor morfologi sel eritrosit dan sel leukosit (neutrofil segmen, neutrofil batang, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit) pada pewarnaan Giemsa.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan yaitu *Posttest Only Control Design*. Dalam desain penelitian ini membandingkan dua kelompok yaitu antara kelompok kontrol dengan kelompok eksperimen, dimana kelompok eksperimen adalah kelompok yang diberikan perlakuan.

Pengaruh adanya perlakuan (*treatment*) adalah (O_1 ; O_2) (Sugiyono dan Puspandhani, 2020). Desain penelitian ini ditunjukkan pada tabel 1

Tabel 1. Desain Penelitian

R_1	X	O_1
R_2		O_2

Sumber: Sugiyono dan Puspandhani, 2020

Keterangan:

R_1 = Kelompok eksperimen

R_2 = Kelompok kontrol

X = Perlakuan, berupa pewarnaan sediaan apus darah tepi menggunakan alat *chamber stain*

O_1 = Penilaian hasil pewarnaan sel eritrosit dan leukosit menggunakan alat *chamber stain*

O_2 = Penilaian hasil pewarnaan sel eritrosit dan leukosit menggunakan metode konvensional

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek penelitian yaitu *chamber stain* yang bertujuan untuk menganalisis penggunaan Giemsa 3% secara berulang terhadap hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi

2. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah sel eritrosit, sel leukosit dan sel trombosit pada sediaan apus darah yang diberi perlakuan pewarnaan Giemsa konsentrasi 3% dengan menggunakan metode konvensional dan alat bantu *chamber stain*.

3. Data Penelitian

Menurut Sugiyono (2020), menyatakan bahwa ukuran sampel yang layak dalam penelitian adalah antara 30 sampai dengan 500. Dalam penelitian ini data penelitian yang digunakan adalah 46 preparat untuk kelompok eksperimen (*chamber stain*) dan 1 sampel preparat untuk kelompok kontrol (konvensional) setiap harinya. Peneliti merencanakan durasi penelitian selama 3 hari, dimana setiap harinya dilakukan 2 pengulangan, sehingga total sampel yang akan digunakan selama penelitian adalah 276 preparat untuk kelompok eksperimen dan 3 preparat untuk kelompok kontrol.

C. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada awal bulan 20 – 22 Februari 2025

2. Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pewarnaan sediaan apus darah tepi menggunakan alat *chamber stain* dan metode konvensional

Satuan: kali

Skala: Nominal

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pewarnaan sel eritrosit dan sel leukosit pada pemeriksaan sediaan apus darah tepi

Satuan: -

Skala: Nominal

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah kualitas sediaan

E. Definisi Operasional dan Variabel Penelitian

1. Kelompok kontrol adalah sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 3% selama 45 menit dengan metode konvensional.
2. Kelompok eksperimen adalah sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 3% selama 45 menit pada *chamber stain* dengan 6 kali pengulangan.
3. Hasil pewarnaan sediaan apusan darah tepi adalah hasil skor penilaian sediaan apusan darah tepi pada warna latar belakang, eritrosit dan leukosit secara mikroskopis menggunakan *chamber stain*.
4. *Chamber stain* adalah alat yang digunakan untuk mengoptimalkan proses pewarnaan preparat. Alat ini dapat menampung hingga 46 preparat dan 400 ml larutan pewarna. Posisi preparat yang tegak mencegah pengendapan cat, sementara kontrol terhadap volume dan durasi pewarnaan mempercepat proses dan menghasilkan hasil yang lebih akurat dan homogen.

5. Efisien *chamber stain* terkait dengan penghematan waktu, bahan, dan pengurangan kesalahan teknis dalam pengecatan. Sementara itu, efektivitas mengacu pada kemampuannya menghasilkan pewarnaan yang jelas dan akurat tanpa ketidakseimbangan pewarna pada sampel.
6. Kualitas Giemsa adalah Giemsa stock yang baru dan belum tercemar larutan apapun seperti air, serta cat warna Giemsa masih aktif. Kualitas mutu Giemsa yang tidak baik dapat mengganggu hasil pewarnaan pada sediaan darah, terutama dalam memberi warna sel eritrosit, leukosit dan parasite. Sehingga harus dilakukan uji kualitas Giemsa. Giemsa yang baik akan membentuk lingkaran biru (*methylene blue*) ditengah, lingkaran cincin ungu (*methylene azure*) di luarnya serta lingkaran tipis berwarna merah (eosin) di paling pinggir.
7. Kualitas alat adalah peralatan yang bebas dari kontaminasi, seperti objek glass yang berlemak, mikroskop yang kurang baik sehingga dapat mengganggu dalam pengamatan sediaan apusan darah tepi. Untuk melakukan pengamatan sediaan yang baik, yaitu objek glass harus bersih tidak berdebu, tidak berlemak, jernih dan tidak kusam. Kualitas mikroskop yang baik juga dibutuhkan dalam pengamatan.
8. Kualitas sediaan apus darah tepi meliputi warna sitoplasma, granula, inti sel dan bebas pengendapan pada sediaan.
9. Refraktil adalah kemampuan suatu area untuk mebiaskan cahaya, sehingga tampak terang di bawah mikroskop. Dalam konteks eritrosit, area refraktil yang tajam menandakan tepi sel yang utuh dan jelas

10. Kromia adalah intensitas warna sel eritrosit. Kromia yang baik menunjukkan bahwa eritrosit menyerap pewarnaan dengan tepat, yang mencerminkan kondisi hemoglobin dalam sel tersebut.
11. Kromis adalah pusat sel eritrosit yang terlihat lebih terang atau lebih pucat, karena kurangnya hemoglobin.
12. Palor sentral adalah area pucat di tengah eritrosit yang normalnya berukuran sekitar sepertiga diameter sel.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yaitu data yang dikumpulkan langsung oleh peneliti dari sumber datanya. Perolehan data ini dari skor hasil pewarnaan morfologi eritrosit dan leukosit yang diwarnai menggunakan pewarna Giemsa konsentrasi 3% dengan teknik konvensional dan menggunakan alat bantu *chamber stain* setelah pengulangan 6 kali.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang akan digunakan pada penelitian ini adalah penilaian skor kriteria dari pengamatan hasil pewarnaan sel eritrosit dan leukosit yang diwarnai menggunakan Giemsa konsentrasi 3% teknik konvensional dengan pembandingan berupa skor kriteria dari pengamatan hasil pewarnaan sel eritrosit dan leukosit yang diwarnai menggunakan Giemsa konsentrasi 3% teknik modifikasi menggunakan alat bantu *chamber stain* setelah pengulangan 6 kali. Proses skoring akan dilakukan oleh 2 (dua) orang Ahli Teknologi Laboratorium

Medis (ATLM) dan pada setiap sediaan dibaca sampai sel eritrosit dan masing-masing sel leukosit ditemukan.

G. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa darah *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) non patologis.

2. Alat

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| a. <i>Chamber stain</i> | k. Tabung <i>Vacutainer</i> |
| b. Pipet tetes | EDTA |
| c. Kaca objek | l. Spuit 3 cc |
| d. Gelas kimia | m. Mikroskop |
| e. Pipet ukur | n. <i>Alcohol swab</i> |
| f. Corong kaca | o. Batang pengaduk |
| g. Rak pengecetan | p. Mikropipet |
| h. Botol semprot | q. Yellow tip |
| i. <i>Stopwatch</i> | r. Kertas Whatman no.2 |
| j. <i>Tourniquet</i> | s. pH indikator atau pH meter |

3. Bahan

- a. Darah vena EDTA
- b. Pewarna Giemsa stock
- c. Larutan methanol 95%
- d. Larutan buffer pH 6,8
- e. Aquadest
- f. Minyak imersi

H. Uji Validitas Penelitian

Uji validitas dilakukan untuk mengetahui bahwa reagen yang digunakan memenuhi standar laboratorium yaitu baru dan tidak expired, uji validitas dilakukan dengan melakukan uji mutu reagen sebelumnya. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan hasil pewarnaan Giemsa terhadap sel eritrosit dan sel leukosit pada sediaan apus darah tepi dan dinilai oleh orang yang berpengalaman dan terlatih dibidangnya. Pembacaan dilakukan oleh individu berpengalaman. Uji mutu yang dilakukan sebagai berikut;

1. Uji mutu Giemsa

- a. Kertas saring diletakkan diatas gelas atau petridish agar bagian tengah kertas tidak menyentuh sesuatu
- b. Kertas saring ditetesi 1-2 tetes Giemsa stok kemudian dibiarkan sampai meresap dan melebar
- c. Metil alcohol absolut ditetaskan 3-4 tetes di pertengahan bulatan Giemsa satu per satu dengan jarak waktu beberapa detik sampai garis tengah Giemsa menjadi 5-7 cm hingga terbentuk lingkaran

biru (metilen biru) di tengah, lingkaran cincin ungu (metilen azur) di luarnya dan lingkaran tipis warna merah (eosin) di paling pinggir.

- d. Giemsa sudah rusak atau tidak boleh digunakan lagi jika warna ungu atau merah tidak terbentuk (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

2. Uji mutu larutan buffer

Buffer pada penelitian ini digunakan untuk pengenceran Giemsa. Pembuatan larutan buffer dilakukan dengan mencampurkan satu tablet buffer pH 6,8) dalam 1 liter air/aquades. Pengujian pH larutan buffer dapat menggunakan pH indikator atau pH meter (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

3. Uji mutu larutan metanol

Metanol digunakan untuk fiksasi sediaan darah tipis yang bertujuan untuk melekatkan sediaan darah tipis pada kaca objek dan mempertahankan bentuk sel (tidak lisis) pada saat dilakukan pewarnaan sehingga bentuk dan morfologi sel (dinding eritrosit) tetap sempurna. Jenis metanol yang digunakan adalah metanol absolut (96%). Metanol dilakukan uji mutu dengan mengukur berat jenisnya, (BJ= 0,792 – 0,793) menggunakan densitometer (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

4. Uji mutu minyak imersi

Minyak imersi digunakan pada pemeriksaan sediaan darah malaria menggunakan mikroskop perbesaran kuat 100x. Minyak imersi digunakan untuk meningkatkan indeks bias objek yang dilihat. Uji kualitas minyak imersi dapat dilakukan sebagai berikut:

- a. Uji kekentalan: batang pengaduk dimasukkan kedalam wadah berisi minyak imersi kemudian diangkat batang pengaduk tersebut dan diamati. Apabila minyak imersi masih menempel pada batang pengaduk dan menetes lambat maka kualitas minyak imersi masih baik.
- b. Uji kekeruhan: kekeruhan minyak imersi dapat dilihat pada wadah transparan. Jika terlihat keruh maka kualitas minyak imersi sudah berkurang.
- c. Perubahan warna: perubahan warna minyak imersi dapat dilihat pada wadah transparan. Jika terjadi perubahan warna (kekuningan) maka kualitas minyak imersi sudah berkurang (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

5. Uji Mutu Sediaan Apus Darah Tepi

Sediaan apus darah tepi yang digunakan memenuhi syarat SADT yang baik, yaitu:

- a. Apusan memiliki ketebalan yang cukup (tidak terlalu tipis dan tidak terlalu tebal)
- b. Pada pengamatan mikroskopik, sel eritrosit tersebar secara merata dan tidak bertumpuk-tumpuk

- c. Panjang apusan $1/2 - 1/3$ panjang kaca objek
 - d. Tidak melebar sampai tepi kaca objek
 - e. Membentuk seperti lidah api dengan bagian ekor yang menipis
 - f. Bagian ekor tidak berbentuk “bendera robek”
 - g. Apusan tidak berlubang-lubang dan tidak bergerigi (terputus-putus)
 - h. Terwarnai secara merata di seluruh bagian apusan
- (Yayuningsih, D., 2018).

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap Perizinan

- a. *Ethical clearance* (EC) atau kelayakan etik diajukan kepada Dewan Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta
- b. Perizinan diajukan untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta
- c. *Link Google Formulir* berupa kuesioner dibagikan kepada responden kemudian dilakukan skrinning. Dari hasil skrinning diperoleh calon responden.

2. Tahap Persiapan

- a. Lembar Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP) dan *Informed Consent* diberikan sebelum pengambilan sampel darah, seluruh data responden dijamin kerahasiaannya oleh peneliti.
- b. Peneliti menyiapkan lembar penilaian hasil pemeriksaan
- c. Peneliti melakukan pengadaan alat dan bahan yang akan digunakan

d. Melakukan pengenceran reagen kerja Giemsa

Giemsa konsentrasi 3% dibuat dengan pengenceran buffer fosfat pH 6,8 dengan perbandingan 3 ml Giemsa : 97 ml buffer pH 6,8.

3. Tahap Pelaksanaan

a. Sampling Darah Vena

- 1) Responden diatur posisinya untuk dilakukan sampling
- 2) Vena dipilih untuk dilakukan penusukan
- 3) Pembendungan dilakukan dengan memasang tourniquet 3 jari di atas penusukan, minta responden mengepalkan tangannya untuk membantu vena berdilatasi.
- 4) Desinfeksi area penusukan dengan *alcohol swab*
- 5) Penusukan dilakukan dengan sudut 20°-30° dengan bevel menghadap ke atas
- 6) Aspirasi sampel darah sesuai kebutuhan dengan menarik *plunger*. Memasang kapas kering diatas tusukan. Menarik jarum dari tusukan
- 7) Area penusukan ditekan dengan kapas kering, menerapkan plester pada area penusukan jika darah telah berhenti
- 8) Darah dipindahkan dari spuit ke dalam tabung *vacutainer* EDTA. Tabung sampel darah diberi label
- 9) Jarum dibuang ke dalam *container* benda tajam (Kiswari, 2014).

b. Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi

- 1) Kaca objek disiapkan yang bersih dan kering
- 2) Kaca objek diberi label atau etiket pada ujung kaca sediaan
- 3) Sampel darah sebanyak $\pm 3 \mu\text{l}$ ditetaskan di atas kaca objek kira-kira 2 cm dari salah satu pinggirnya atau kira-kira $\frac{1}{2}$ cm dari tempat menuliskan label identitas
- 4) Kaca objek lain dipilih yang bertepi rata untuk digunakan sebagai 'kaca penghapus'. Kaca penghapus diletakkan di depan tetesan darah, dengan membentuk sudut 30° - 40° terhadap kaca objek
- 5) Kaca penghapus digeser ke belakang sehingga menyentuh tetesan. Tetesan akan melebar di sepanjang pinggir kaca penghapus
- 6) Kaca penghapus segera didorong ke depan dengan cepat dan tekanan yang cukup (dibutuhkan banyak Latihan)
- 7) Sediaan dibiarkan mengering di udara (kiswari, 2014).

c. Fiksasi

- 1) Sediaan yang telah kering diletakkan pada rak pewarnaan dengan posisi darah berada di atas.
- 2) Sediaan digenangi dengan larutan metanol hingga menutupi seluruh bagian yang terlapis darah
- 3) Timer dinyalakan selama 2 – 3 menit (kiswari, 2014).

d. Pewarnaan Giemsa

- 1) Sediaan yang telah difiksasi digenangi dengan pewarna Giemsa 3% hingga menutupi seluruh bagian yang terlapisi darah
- 2) Timer dinyalakan selama 45 menit
- 3) Sediaan dibilas dengan air mengalir
- 4) Sediaan diletakkan dalam posisi vertikal dan dibiarkan mengering di udara
- 5) Sediaan siap untuk diperiksa

e. Pengamatan

- 1) Sediaan yang telah kering diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran kuat 1000x dengan tambahan minyak imersi
- 2) Skor hasil pewarnaan terhadap sel eritrosit dan leukosit dicatat
- 3) Dokumentasi pada beberapa lapang pandang

Kualitas hasil pewarnaan didapatkan dari menilai warna inti sel, sitoplasma, dan granula menggunakan sistem skoring sesuai tabel berikut;

Tabel 2. Kriteria Hasil Pewarnaan yang Baik

Jenis sel		Warna		
		Inti sel	Sitoplasma	Granula
Eritrosit	Eritrosit	-	Ungu keabu-abuan	-
Leukosit	Neutrofil	Ungu	Merah muda	Ungu
	Eosinofil	Ungu	Merah muda	Merah-oranye
	Basofil	Ungu	Biru	Ungu kehitaman
	Limfosit	Ungu	Biru pucat	-
	Monosit	Ungu	Biru keabu-abuan	-

Trombosit	Trombosit	-	-	Ungu
-----------	-----------	---	---	------

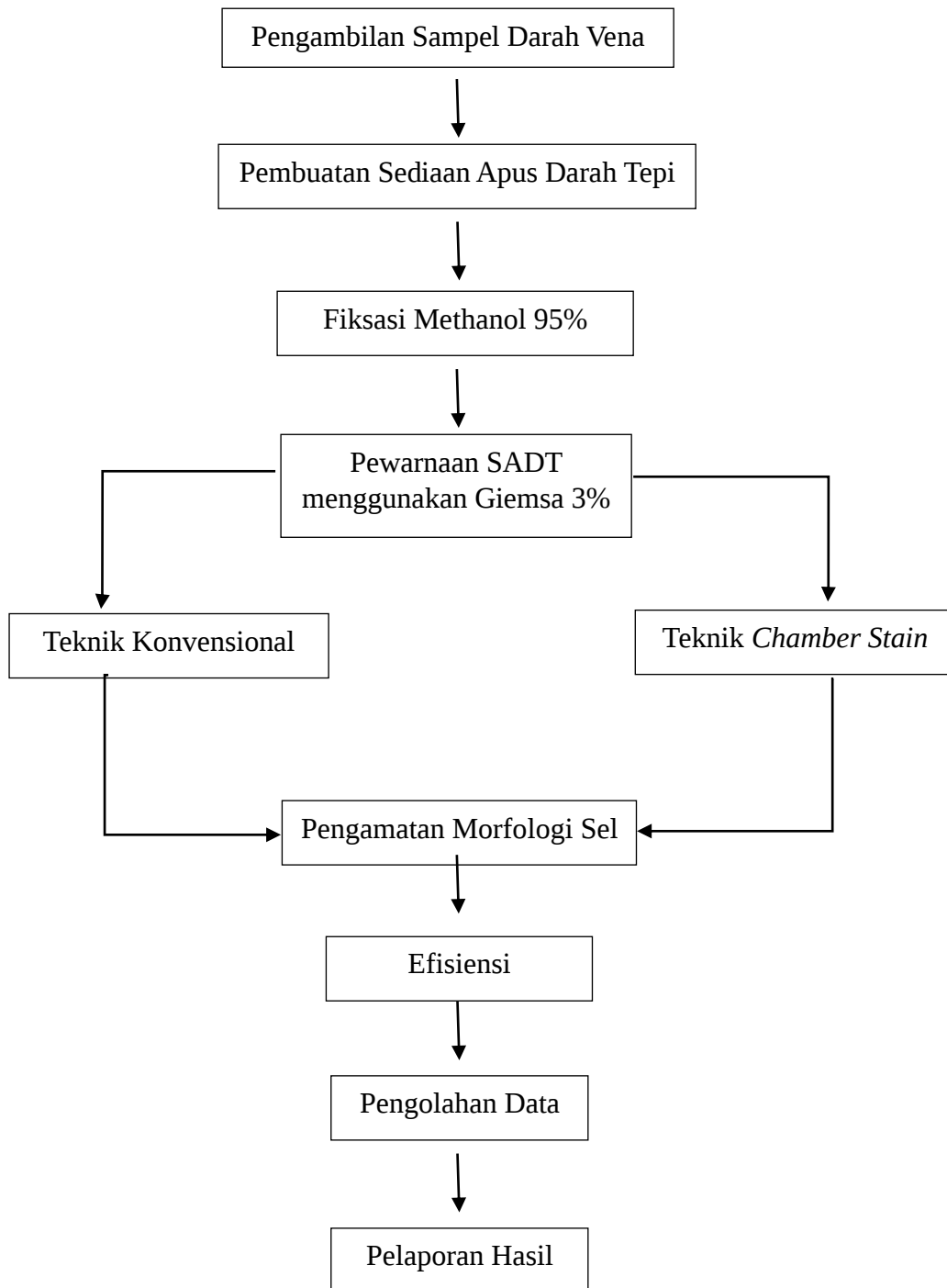
Sumber: Kiswari, 2014.

Tabel 3. Skor Penilaian Eritrosit dan Leukosit

Aspek penilaian	Kriteria		Skor	Keterangan
	Eritrosit	Leukosit		
Warna	Apusan Menunjukkan area refraktil yang tajam pada kromis (palor sentral)	Apusan yang menunjukkan garis samar pada sel leukosit atau sel tidak ditemukan	0	Tidak Baik
	Pewarnaan kurang baik dimana morfologi eritrosit dan kromia tidak terpelihara dengan baik meskipun area refraktil tidak tajam pada kromia	Pewarnaan kurang baik dimana sel leukosit menunjukkan batas sitoplasma dengan inti sel sudah terlihat jelas namun inti sel masih belum terwarnai dengan baik dan butiran masih kurang terlihat jelas	1	Kurang Baik
	Mencerminkan karakteristik pewarnaan yang sangat baik dimana morfologi eritrosit dan kromia yang terpelihara dengan baik	Mencerminkan karakteristik pewarnaan yang sangat baik dimana sel leukosit menunjukkan batas sitoplasma dengan inti sel jelas, inti sel terwarnai dengan baik dan butiran terlihat jelas	2	Baik

Sumber: Tata dan Mannem, 2022 (dimodifikasi)

J. Alur Penelitian



Gambar 12. Alur Penelitian

K. Manajemen Data

Perbedaan hasil pewarnaan Giemsa terhadap sel eritrosit dan leukosit dengan variasi teknik pewarnaan diketahui dengan melakukan analisis deskriptif dan analisis analitik.

1. Penyajian Data

Data yang diperoleh adalah data hasil skor penilaian pewarnaan Giemsa 3% pada sediaan apus darah tepi menggunakan teknik konvensional dan alat bantu *chamber stain* setelah pengulangan 6 kali.

2. Analisis Deskriptif

Analisis secara deskriptif memberikan gambaran terhadap objek yang diteliti yaitu mengenai perbedaan kualitas hasil pewarnaan morfologi eritrosit dan leukosit pada sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 3% dengan teknik konvensional dan teknik *chamber stain* setelah pengulangan 6 kali. Dilihat dari warna sel eritrosit dan sel leukosit lebih pucat atau lebih terwarnai dengan baik.

3. Analisis Analitik

Seluruh data yang terkumpul disajikan dalam bentuk tabel yang kemudian dianalisis secara analitik menggunakan hasil rata-rata total skor untuk mengetahui besar efisiensi alat hamber stain dan efektivitas kualitas pewarnaan sediaan apus darah tepi terhadap morfologi eritrosit dan leukosit yang diwarnai menggunakan Giemsa 3% metode konvensional dan metode *chamber stain*.

Hasil pewarnaan kedua perlakuan kemudian dianalisis untuk mengetahui presentase efektivitas yang dihitung menggunakan rumus efektivitas

$$\text{Presentase efektivitas} = \frac{\text{Rerata skor pewarnaan metode chamber stain}}{\text{Rerata skor pewarnaan metode konvensional}} \times 100\%$$

Presentase efektivitas yang didapatkan kemudian diinterpretasikan ke dalam kriteria efektivitas pada tabel 5

Tabel 4. Kriteria Efektivitas

Presentase	Kriteria
>100%	Sangat Efektif
90-100%	Efektif
80-90%	Cukup Efektif
60-80%	Kurang Efektif
<60%	Tidak Efektif

Sumber: Nabilah & Hernadi Moorcy, 2022

Jumlah volume pewarnaan yang digunakan antara metode *chamber stain* dan metode konvensional dihitung untuk mengetahui seberapa efisien alat tersebut menggunakan rumus efisiensi:

$$\frac{(\text{volume metode konvensional} - \text{Volume metode Chamber stain})}{\text{Volume metode konvensional}} \times 100\%$$

Presentase efisiensi yang didapatkan kemudian diinterpretasikan ke dalam kriteria efisiensi pada tabel 6

Tabel 5. Kriteria Efisiensi

Presentase	Kriteria
>100%	Sangat Efisien
90-100%	Efisien
80-90%	Cukup Efisien
60-80%	Kurang Efisien
<60%	Tidak Efisien

Sumber: Nabilah & Hernadi Moorcy, 2022

L. Etika Penelitian

Penelitian yang dilakukan dapat menimbulkan risiko bagi peneliti, sehingga perlu menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) yang lengkap sesuai dengan *Standard Operational Producer* (SOP) untuk menghindarinya. Penelitian ini menggunakan sampel darah vena yang berasal dari manusia sehingga sebelum dilakukan penelitian, peneliti mengajukan surat *Ethical clearance* (EC) atau kelayakan etik kepada Dewan Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Penelitian ini akan menggunakan sampel darah vena yang diambil dari mahasiswa. Oleh karena itu, para responden harus disosialisasikan dengan memberikan Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP) dan mendapatkan persetujuan mereka untuk berpartisipasi secara sukarela dalam penelitian dengan mengisi formulir *informed consent*.