

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis penelitian

Penelitian ini menggunakan *pre-experimen*, 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 (Sugiyono, 2023).

2. Desain penelitian

Desain penelitian yang diterapkan adalah *Posttest Only Design* yang masing-masing dipilih secara acak (R). Desain ini terdapat dua kelompok dan dipilih secara random. Kelompok pertama yang diberi perlakuan (X) disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Pengaruh adanya perlakuan (treatemen) adalah ($O_1:O_2$) (Sugiyono, 2023).

R	X	O₁
R		O₂

Gambar 15. Desain Penelitian.

Sumber: Sugiyono, 2023.

Keterangan Gambar 12. Desain Penelitian:

R : Sampel Darah Vena

X Sediaan Apus Darah Tepi (SADT)

O₁ : Kelompok kontrol, berupa pewarnaan giemsa 10%
SADT teknik konvensional

O₂ : Kelompok eksperimen, berupa pewarnaan giemsa 10%
SADT teknik *chamber stain*

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek penelitian yaitu *chamber stain* yang bertujuan untuk menganalisis penggunaan giemsa 10% secara berulang terhadap hasil pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi.

2. Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sediaan Apus Darah Tepi.

C. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari-Maret 2025

2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah model pewarnaan yaitu menggunakan *chamber stain* dan teknik konvensional untuk sediaan apus darah tepi pewarnaan giemsa 10%.

Skala: Nominal

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kualitas hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi giemsa 10% secara berulang menggunakan *chamber stain*.

Skala: Nominal

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu dari penelitian ini adalah mutu kualitas hasil sediaan apus darah tepi. Pembuatan setiap apusan oleh peneliti dapat memiliki kondisi yang berbeda sehingga mempengaruhi hasil secara variatif dan mengarah pada potensi perbedaan yang tidak dapat dihindari.

E. Definisi Operasional

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah model pewarnaan yaitu menggunakan *chamber stain* dan teknik konvensional untuk sediaan apus darah tepi pewarnaan giemsa 10%.

Skala: Nominal

2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kualitas hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi giemsa 10% secara berulang menggunakan *chamber stain*.

Skala: Nominal

3. Kelompok kontrol adalah sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 10% selama 20 menit dengan metode konvensional.
4. Kelompok eksperimen adalah sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 10% selama 20 menit dengan *chamber stain*.
5. *Chamber stain* adalah alat yang digunakan untuk mengoptimalkan proses pewarnaan preparat SADT. Alat ini dapat menampung 46 preparat dan 400 ml larutan pewarna. Posisi preparat yang tegak atau vertikal mencegah terjadinya pengendapan cat dan menghasilkan hasil yang lebih akurat dan konsisten.
6. Efisiensi *chamber stain* adalah penghematan waktu, bahan dan pengurangan kesalahan teknik dalam pewarnaan. dalam Sediaan Apus Darah Tepi (SADT)
7. Efektivitas *chamber stain* adalah pencapaian hasil yang sesuai dengan tujuan, seperti menghasilkan kualitas hasil sediaan apus darah tepi yang memenuhi kriteria pewarnaan, jelas dan akurat.
8. Kualitas hasil sediaan apus darah tepi meliputi jenis dan komponen sel, seperti wana sitoplasma, granula dan inti sel.

9. Mutu Sediaan Apus Darah Tepi adalah mutu pembuatan yang sesuai dengan kriteria SADT yang baik, meliputi: ketebalan, panjang dan bentuk ekor apusan.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer yang didapatkan setelah melakukan penelitian oleh peneliti. Menurut Sugiyono, 2023 mendefinisikan data primer sebagai informasi yang telah diperoleh atau dikumpulkan oleh peneliti langsung dari sumber datanya. Perolehan data ini dari skor hasil pewarnaan morfologi sel darah yang diwarnai menggunakan pewarnaan giemsa 10% dengan teknik konvensional dan *chamber stain* (Sugiyono, 2023).

Dalam penelitian ini, jumlah sampel yang digunakan terdiri dari 20 sampel preparat untuk kelompok perlakuan eksperimen (*chamber stain*) dan 1 sampel preparat untuk kelompok kontrol (konvensional) setiap harinya. Peneliti merencanakan durasi penelitian selama 5 hari, sehingga total sampel yang akan digunakan selama penelitian adalah 100 preparat untuk kelompok eksperimen dan 5 preparat untuk kelompok kontrol.

2. Teknik Pengumpulan Data

Jumlah sampel yang digunakan terdiri dari 20 sampel preparat untuk kelompok perlakuan eksperimen (*chamber stain*) dan 1 sampel preparat untuk kelompok kontrol (konvensional) setiap harinya. Peneliti

merencanakan durasi penelitian selama 5 hari, sehingga total sampel yang akan digunakan selama penelitian adalah 100 preparat untuk kelompok eksperimen dan 5 preparat untuk kelompok kontrol.

Teknik pengumpulan data yang akan digunakan pada penelitian ini adalah penilaian skor kriteria dari pengamatan hasil pewarnaan sel eritrosit, leukosit dan trombosit yang diwarnai menggunakan Giemsa konsentrasi 10% teknik konvensional dengan pembanding berupa skor kriteria dari pengamatan hasil pewarnaan sel eritrosit, leukosit dan trombosit yang diwarnai menggunakan Giemsa konsentrasi 10% teknik modifikasi menggunakan alat bantu *chamber stain* setelah pengulangan 5 kali. Proses skoring akan dilakukan oleh 2 (dua) orang Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) dan pada setiap sediaan dibaca sel sel darah.

G. Instrumentasi dan Bahan Penelitian

1. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa darah *Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) non patologis yang segera digunakan setelah pengambilan untuk menjaga kesegarannya.

2. Alat

- a. *Chamber stain*
- b. Objek glass atau slide
- c. Mikroskop
- d. Gelas kimia

- e. Pipet ukur
 - f. Pipet tetes
 - g. Corong kaca
 - h. Jembatan pengecatan
 - i. Botol semprot
 - j. *Stopwatch*
 - k. pH meter stik
3. Bahan
- a. Reagen Giemsa stok 100%
 - b. Buffer pH 6,8
 - c. Metanol 95%
 - d. Aquades
 - e. Kertas saring
 - f. Kertas Whatman

H. Uji Validitas

Uji validitas adalah hasil penelitian yang valid jika terjadi kesamaan antara data yang sesungguhnya terjadi pada objek yang akan diteliti (Sugiyono, 2023). Uji validitas pada penelitian ini, yaitu validitas alat yaitu mikroskop diuji dengan menjamin bahwa seluruh alat telah melalui *quality control* rutin dan telah dikalibrasi. Kemudian, larutan pewarnaan yang digunakan memenuhi standar dengan melakukan uji mutu reagen.

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap perizinan

- a. Peneliti mengajukan *Ethical Clearance* (EC) kepada Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta (KPEK) Penelitian Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta melalui website <http://simepk.poltekkesjogja.ac.id>.
- b. Peneliti mengajukan permohonan izin peminjaman tempat untuk melakukan penelitian kepada penanggung jawab Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.
- c. Lembar Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP) dan *informed consent* diberikan sebelum pengambilan sampel darah, seluruh data responden dijamin kerahasiaannya oleh peneliti.

2. Tahap persiapan

- a. Peneliti menyiapkan lembar penilaian hasil pemeriksaan.
- b. Peneliti melakukan pengadaan alat dan bahan yang akan digunakan
- c. Peneliti melakukan uji mutu reagen sebelum digunakan untuk penelitian:
 - 1) Uji mutu Giemsa
 - a) Kertas Whatman nomor 2 di letakkan di atas gelas atau petridisk agar bagian tengah kertas tidak menyentuh sesuatu.
 - b) Larutan Giemsa stock diteteskan 1 – 2 tetes pada kertas saring. Tunggu sampai meresap dan melebar.

- 3) Metanol absolut diteteskan sebanyak 3 – 4 tetes di tengah bulatan Giemsa dengan jarak waktu beberapa detik sampai garis tengah Giemsa menjadi 5 – 7 cm. Maka akan terbentuk: lingkaran biru (*methylen blue*) di tengah, lingkaran cincin ungu (*methylen azur*) di luarnya serta lingkaran tipis warna merah (eosin) di bagian tepi (Hartati *et al.*, 2024).

Giemsa sudah rusak dan tidak boleh dipakai lagi, bila warna ungu atau merah tidak terbentuk dan perlu diperhatikan pula tanggal kadaluwarsa giemsa (Kementerian Kesehatan, 2020).

2) Uji Mutu Buffer

- a) Cek fisik larutan pH, yaitu tidak berbau, tidak berwarna dan tidak ada endapan.
- b) Cek pH buffer dengan menggunakan kertas pH indikator sesudah pH buffer pertama kali dibuat dan sesaat sebelum dilakukan pewarnaan.
- c) Cek pH dengan menggunakan pH meter. Pastikan pH meter yang dipakai adalah pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan standar.

3) Uji Mutu Metanol

- a) Melakukan pengamatan langsung. Hal-hal yang diamati seperti: Transparan, bening, tidak berwarna, Mudah larut dalam air, Memiliki aroma yang khas, Tidak ada endapan

4) Uji Mutu Imersi

- a) Melakukan uji kekentalan, dapat dilakukan dengan memasukkan batang pengaduk kedalam wadah berisi minyak imersi. Angkat barang pengaduk dan amati. Jika minyak imersi masih menempel pada batang pengaduk dan menetes lambat maka kualitas minyak imersi masih baik.
- b) Uji kekeruhan, mengamati ada tidaknya kekeruhan minyak imersi pada wadah transparan. Jika terlihat keruh maka kualitas minyak imersi sudah berkurang.
- c) Perubahan warna, mengamati ada tidaknya perubahan minyak imersi pada wadah transparan. Bila terjadi perubahan warna (kekuningan) maka kualitas minyak imersi sudah berkurang.

d. Peneliti membuat reagen kerja giemsa

Giemsa konsentrasi 10% dibuat dengan pengenceran buffer fosfat Ph 6,8 menggunakan rumus berikut:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$100 \times V1 = 10 \times 100$$

$$V1 = \frac{10\% \times 100}{100\%}$$

$$V1 = 10 \text{ ml}$$

Keterangan:

C1 : Konsentrasi sebelum pengenceran

C2 : Konsentrasi sesudah pengenceran

V1 : Volume sebelum Pengenceran

V2 : Volume sesudah pengenceran

Teknik pengenceran konsentrasi giemsa menjadi 10% Larutan giemsa stok (100%) disiapkan dengan mencampur giemsa stock dengan larutan buffer fosfat pH 6,8. Untuk 100 ml dilakukan pencampuran 10 ml giemsa stock dengan 90 ml larutan buffer fosfat pH 6,8. Oleh karena itu, untuk membuat 400 ml dilakukan pencampuran 40 ml giemsa stok dengan 360 ml larutan buffer fosfat. Larutan buffer di cek dengan pH meter untuk memastikan pH buffer sudah sesuai sebelum digunakan.

3. Tahap pelaksanaan

a. Pengambilan Darah Vena

- 1) Siapkan alat yang akan digunakan. Pastikan identitas sudah sesuai.
- 2) Vena dipilih untuk dilakukan penusukan
- 3) Pembendungan dilakukan dengan memasang torniquet 3 jari di atas penusukan, minta responden mengepalkan tangannya untuk membantu vena berdilatasi agar vena lebih menonjol.
- 4) Desinfeksi area penusukan dengan alcohol swab.
- 5) Penusukan dilakukan dengan sudut 20 – 30° antara jarum dan kulit.

- 6) Lepaskan tourniquet ketika darah mulai masuk kedalam spuit.
Arahkan responeden untuk membuka kepalan tangan secara perlahan.
 - 7) Jika darah sudah memenuhi, letakkan kapas kering di atas tusukan tanpa memberi tekanan.
 - 8) Lepaskan jarum dari lokasi penusukan dan berikan tekanan kapas kering agar darah berhenti mengalir.
 - 9) Tempelkan plaster pada area pengambilan darah.
 - f) Darah dipindahkan dari spuit ke dalam tabung vacutainer EDTA
Tabung sampel darah diberi label (Nurjanah, dkk, 2024)
- b. Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi
- 1) Membuat sediaan apusan dilakukan dengan cara meletakkan satu tetes darah di objek glass lalu didorong menggunakan objek glass lain yang membentuk sudut 45° hingga membentuk seperti lidah kucing.
 - 2) Sediaan apus yang sudah jadi ditunggu hingga kering di udara dan ditulis nama pasien dan tanggal pada pinggir objek glass (Resbiani dkk, 2022).
- c. Pewarnaan Sediaan Giemsa 10% Teknik Konvensional
- 1) Sediaan darah tipis yang sudah dibuat, difiksasi dengan metanol 3-4 tetes
 - 2) Larutan metanol ditiriskan dan dikeringkan udara
 - 3) Sediaan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% dengan 3-4 tetes

- 4) Sediaan didiamkan selama 20 menit
 - 5) Sediaan dibilas dengan air mengalir secara perlahan-lahan.
 - 6) Sediaan dikeringkan kemudian diamati pada mikroskop.
 - 7) Sediaan ini digunakan sebagai kontrol.
- d. Pewarnaan Sediaan Giemsa 10% Teknik *Chamber Stain*
- 1) Sediaan darah tipis dibuat sebanyak 20 preparat untuk 1 *batch*, kemudian ditunggu sampai sediaan kering
 - 2) Masukkan volume larutan metanol 95% sebanyak 400 ml kedalam *chamber stain*
 - 3) Sediaan dimasukan kedalam rak pengecatan dan difiksasi selama 2-3 menit
 - 4) Rak pengecatan diangkat dan ditiriskan sampai mengering di suhu ruang
 - 5) Masukkan volume pewarna giemsa 10% sebanyak 400 ml kedalam *chamber stain*
 - 6) Rak pengecatan dimasukkan kedalam *chamber stain* yang berisikan pewarna giemsa 10% selama 20 menit
 - 7) Rak pengecatan diangkat dan dibilas dengan air mengalir
 - 8) Sediaan dikeringkan kemudian diamati dibawah mikroskop
 - 9) Lakukan pengulangan pengecatan sebanyak 5x untuk dilakukan lima hari dengan pewarnaan yang sama masing-masing *batch* terdiri dari 20 preparat
 - 10) Sediaan dikeringkan kemudian diamati pada mikroskop.

11) Sediaan ini digunakan sebagai eksperimen.

4. Tahap Penilaian Hasil

Tabel 2. Kriteria Hasil Pewarnaan yang Baik.

Jenis Sel		Warna		
		Inti sel	Sitoplasma	Granula
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	-	Biru Keabu-abuan	-
Trombosit		-	-	Ungu

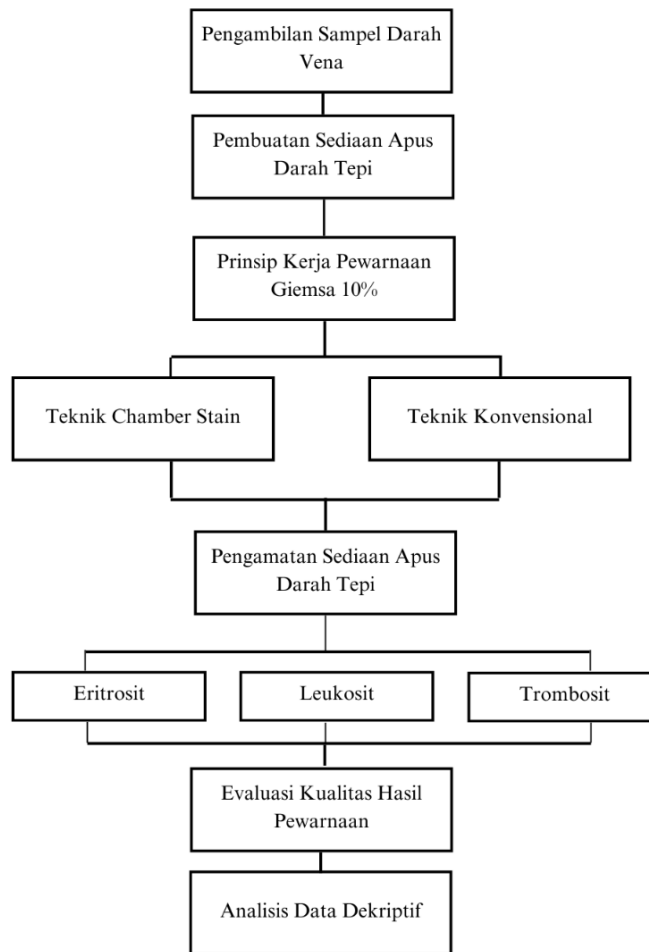
Sumber: Kiswari, 2014.

Tabel 3. Skor Penilaian Pewarnaan.

Skor	Eritrosit	Leukosit			Trombosit
		Sitoplasma	Inti	Granula	
1	Ungu keabuan	Biru	Merah	Ungu atau merah oranye	Ungu
0	Tidak bewarna (tidak ungu keabuan)	Tidak Bewarna (tidak bewarna biru)	Tidak bewarna (tidak merah)	Tidak bewarna	Tidak bewarna (tidak ungu)

Sumber: Hassor, dkk., 2023.

J. Alur Penelitian



Gambar 16. Alur Penelitian.

K. Manajemen Data

Perbedaan hasil pewarnaan giemsa terhadap sel eritrosit, leukosit dan trombosit dengan model teknik pewarnaan diketahui dengan melakukan analisis deskriptif:

1. Teknik Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah data hasil skor penilaian pewarnaan giemsa 10% pada sediaan apus darah tepi menggunakan teknik konvensional dan teknik *chamber stain* setelah pengulangan 5 kali.

Tabel 4. Hasil Skor Penilaian Pewarnaan SADT.

Hari	Perlakuan	Eritrosit	Leukosit			Trombosit
			Sitoplasma	Granula	Inti	
1	Kontrol					
	Eksperimen					
2	Kontrol					
	Eksperimen					
3	Kontrol					
	eksperimen					
4	Kontrol					
	eksperimen					
5	Kontrol					
	Eksperimen					

2. Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif memberikan gambaran terhadap objek yang diteliti yaitu mengenai perbedaan kualitas hasil pewarnaan morfologi eritrosit, leukosit dan trombosit pada sediaan apus darah tepi dengan pewarnaan giemsa 10% dengan teknik konvensional dan teknik *chamber stain* setelah pengulangan 5 kali. Dilihat dari warna sel darah lebih pucat atau lebih terwarnai dengan baik. penjabaran hasil scoring penilai terhadap hasil pewarna giemsa dengan teknik konvensional dan teknik *chamber stain* kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

3. Analisis Analitik

Seluruh data yang terkumpul disajikan dalam bentuk tabel yang kemudian dianalisis secara analitik menggunakan hasil rata-rata total skor untuk mengetahui efektivitas pewarnaan pada sediaan apus darah tepi menggunakan giemsa 10% antara *chamber stain* dibandingkan

teknik konvensional. Hasil pewarnaan kedua perlakuan kemudian dianalisis untuk mengetahui persentase efektivitas yang dihitung menggunakan rumus efektivitas.

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

Persentase efektivitas yang didapatkan kemudian diinterpretasikan pada tabel kriteria efektivitas.

Tabel 5. Kriteria efektivitas.

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

Sumber: Kemendagri 1996 dalam Nabilah dan Setiawan ,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 (KEPK). Penelitian ini akan menggunakan sampel darah vena yang diambil dari mahasiswa. Oleh karena itu, responden diberikan lembar Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP) dan mendapatkan persetujuan mereka untuk berpartisipasi secara sukarela dalam penelitian dengan mengisi formulir

informed consent. Subjek penelitian ini adalah sampel darah pasien. Peneliti menjamin kerahasiaan hasil pemeriksaan dengan tidak mencantumkan identitas pasien.