

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian dengan desain Pra Eksperimental. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian Pra Experimental design dengan desain penelitian *Posttest Only Control Design*. *Posttest-only control group design* adalah desain penelitian eksperimen yang digunakan untuk menguji efek perlakuan atau intervensi terhadap kelompok yang diberi perlakuan (kelompok eksperimen) dibandingkan dengan kelompok yang tidak menerima perlakuan (kelompok control) (Sugiyono, 2023).

Pada penelitian ini kelompok eksperimen (O_2) adalah pengukuran yang dilakukan pada kelompok eksperimen setelah diberikan perlakuan pengecatan menggunakan *Chamber stain* dengan pewarnaan Giemsa 15%. Pengukuran ini mencakup dua aspek yaitu efektivitas dan efisiensi. Kelompok kontrol (O_1) adalah pengukuran yang dilakukan pada kelompok kontrol setelah diberi perlakuan pengecatan menggunakan metode konvensional. Pengukuran ini dilakukan dengan cara yang sama seperti kelompok eksperimen untuk memungkinkan perbandingan sebelum dan sesudah perlakuan. *Post test* adalah kondisi setelah O_1 dan O_2 dilakukan, peneliti akan membandingkan hasil pengukuran antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol untuk melihat perbedaan yang signifikan.

Perbandingan ini akan mengungkapkan apakah *Chamber stain* lebih efektif dan efisien dibandingkan metode konvensional.

Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan perbandingan efektivitas dan efisiensi pewarnaan Giemsa 15% dengan metode konvensional dan *Chamber stain*. Desain penelitian ditunjukkan pada Gambar 16.

R	X	O1
R		O2

Sumber : Sugiyono, 2023.

Gambar 16. Desain Penelitian

Keterangan Gambar 16 :

- R : Sampel Darah Vena
- X : Sediaan Apus Darah Tepi (SADT)
- O₁ : Kelompok kontrol, berupa pewarnaan Giemsa 15% teknik konvensional
- O₂ : Kelompok eksperimen, berupa pewarnaan Giemsa 15% dengan *Chamber stain*

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek penelitian

Subjek penelitian yang digunakan oleh peneliti adalah *Chamber stain* yang bertujuan untuk menganalisis pengaruh penggunaan Giemsa secara berulang dalam *Chamber stain* terhadap hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi.

2. Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 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 Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah model pewarnaan, yaitu menggunakan *Chamber stain* dan metode konvensional untuk pewarnaan Giemsa 15%.

Skala : Nominal

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kualitas hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi Giemsa 15% yang dipakai secara berulang menggunakan *Chamber stain*.

Skala : Nominal

3. Variabel Penagganggu

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

E. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional
1	Variabel Bebas	Model pewarnaan yaitu menggunakan <i>Chamber stain</i> dan teknik konvensional untuk sediaan apus darah tepi pewarnaan Giemsa 15%. Skala : Nominal
2	Variabel Terikat	Kualitas hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi Giemsa 15% secara berulang menggunakan <i>Chamber stain</i> . Skala : Nominal
3	Kelompok Kontrol	Sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 15% selama 10 menit dengan metode konvensional.
4	Kelompok Eksperimen	Sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 15% selama 10 menit dengan <i>Chamber stain</i> .

5	Hasil Pewarnaan	Hasil skor penilaian sediaan apusan darah tepi pada warna latar belakang, eritrosit dan leukosit secara mikroskop menggunakan <i>Chamber stain</i> .
6	<i>Chamber stain</i>	Alat yang digunakan untuk mengoptimalkan proses pewarnaan preparat.
7	Efektivitas dan Efisiensi	Efektivitas <i>Chamber stain</i> mengacu pada kemampuannya menghasilkan pewarnaan yang jelas dan akurat tanpa ketidakseimbangan pewarna pada sampel. Sementara itu, efisiensi <i>Chamber stain</i> terkait dengan penghematan waktu, bahan, dan pengurangan kesalahan teknis dalam pengecatan.
8	Kualitas Hasil Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi	Meliputi jenis dan komponen sel, seperti warna sitoplasma, granula, inti sel serta bebas pengendapan pada sediaan.
9	Mutu Sediaan Apus Darah Tepi	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. Data primer adalah data basis atau utama yang digunakan dalam penelitian. Data

primer adalah jenis data yang dikumpulkan secara langsung dari sumber utamanya seperti melalui wawancara, survey, eksperimen dan sebagainya. Data primer biasanya selalu bersifat spesifik karena disesuaikan oleh kebutuhan sendiri (Balaka, 2022). Perolehan data didapat dari skor hasil pewarnaan morfologi sel darah yang diwarnai menggunakan pewarnaan Giemsa dengan teknik konvensional dan *Chamber stain*.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah skor penilaian hasil sediaan apus darah tepi meliputi sel eritrosit, leukosit, trombosit dan latar belakang apusan menggunakan *Chamber stain* dalam pengecatan SADT dengan pewarnaan Giemsa konsentrasi 15% kemudian dibandingkan dengan hasil skor dari pengamatan hasil sediaan apus darah tepi meliputi sel eritrosit, leukosit, trombosit dan latar belakang apusan yang diwarnai menggunakan Giemsa konsentrasi 15% teknik konvensional. 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. Data dikumpulkan dan disajikan dalam bentuk tabel.

Tiap sampel diberi dua kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol menggunakan metode konvensional dan kelompok eksperimen menggunakan *Chamber stain* dengan sediaan apusan darah tepi

pewarnaan Giemsa 15%. 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.

G. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel darah vena non-patologis yang ditampung dalam tabung EDTA dan langsung digunakan setelah pengambilan. Sampel diperoleh dari 5 mahasiswa Semester 6 Program Studi D3 Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Pemilihan responden dilakukan secara sukarela, setelah jumlah responden mencapai 5 orang, proses pencarian responden dihentikan.

2. Alat

- a. *Chamber stain*
- b. Objek glass/slide
- c. Mikroskop
- d. Gelas kimia
- e. Pipet ukur

- f. Corong kaca
 - g. Pipet tetes
 - h. Jembatan pengecatan
 - i. Botol semprot
 - j. Stopwatch
 - k. pH meter stik
3. Bahan
- a. Darah vena EDTA
 - b. Reagen Giemsa stok
 - c. Buffer pH 6,8
 - d. Methanol 96%
 - e. Aquades
 - f. Kertas saring
 - g. Kertas Whatman No. 2
 - h. Kertas Whatman No. 1

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 dalam penelitian ini meliputi validitas alat, yaitu mikroskop yang telah menjalani kontrol kualitas rutin dan kalibrasi, serta larutan pewarnaan yang digunakan yang memenuhi standar setelah dilakukan uji mutu reagen.

I. Prosedur Penelitian

Penelitian ini adalah data primer yang didapatkan setelah melakukan penelitian oleh peneliti. Data diperoleh melalui tahap sebagai berikut :

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. Perizinan yang diperlukan adalah perizinan Laboratorium Hematologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes 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. Sampel
Darah vena EDTA yang diperoleh dari mahasiswa semester 6 DIII TLM Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- b. Alat
Menyiapkan alat yang dibutuhkan untuk penelitian
- c. Reagen
Menyiapkan reagen yang dibutuhkan untuk penelitian.
- d. Membuat larutan Giemsa

Giemsa konsentrasi 15% dibuat dengan pengenceran buffer fosfat pH 6,8 menggunakan rumus berikut :

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan :

M1 : Konsentrasi sebelum pengenceran

M2 : Konsentrasi setelah pengenceran

V1 : Volume sebelum pengenceran

V2 : Volume setelah pengenceran

Berdasarkan rumus di atas maka pengenceran Giemsa konsentrasi 15% adalah sebagai berikut :

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \times V1 = 15 \times 400$$

$$V1 = \frac{6000}{100}$$

$$= 60$$

Pembuatan pengenceran Giemsa 15% sebanyak 400 ml yaitu dengan melarutkan 60 ml Giemsa stok ditambah 340 ml buffer fosfat. Larutan buffer di cek dengan pH meter untuk memastikan pH buffer adalah 6,8 sebelum digunakan.

e. Pengujian Kualitas Giemsa

Pengujian dengan menggunakan kertas Whatman No. 2 dan metil alkohol dengan cara :

- 1) Kertas saring ditempatkan di atas gelas atau petri disk supaya bagian Tengah kertas tidak menyentuh sesuatu.
- 2) Giemsa stok ditempatkan 1-2 tetes di atas kertas saring. Tunggu sampai meresap dan melebar.
- 3) Metil alkohol 96% ditetaskan 3-4 tetes di pertengahan bulatan Giemsa satu persatu dengan jarak waktu beberapa detik sampai garis Tengah Giemsa menjadi 5-7 cm. kemudian akan terbentuk lingkaran biru (methylene blue) ditengah, lingkaran cincin ungu (azure B) diluarnya serta lingkaran tipis warna merah (eosin) di paling pinggir. Bila warna ungu atau merah tidak terbentuk, Giemsa sudah rusak dan tidak boleh dipakai lagi.

f. Pengujian Kualitas Buffer

- 1) Buat buffer pH 6,8 sesuai dengan prosedur
- 2) Cek fisik larutan pH, meliputi :
 - a) Tidak berbau
 - b) Tidak berwarna
 - c) Tidak terdapat endapan
- 3) Cek pH buffer menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan standar

g. Pengujian Kualitas Methanol 96%

Lakukan pemeriksaan stok methanol 96% dengan pengamatan langsung, meliputi :

- 1) Transparan, bening dan tidak berwarna
- 2) Mudah larut dalam air
- 3) Memiliki aroma yang khas
- 4) Mudah menguap (titik didih 64°C) dan higroskopis
- 5) Tidak ada endapan
- 6) Densitas : 0,791-0,793 g/cm³ pada 20°C

h. Pengujian Kualitas Minyak Imersi

1) Uji Kekentalan

Dilakukan dengan memasukkan batang pengaduk ke dalam wadah berisi minyak imersi. Angkat batang pengaduk dan amati. Jika minyak imersi masih menempel pada batang pengaduk dan menetes lambat maka kualitas minyak imersi masih baik.

2) Uji Kekeruhan

Amati ada tidaknya kekeruhan minyak imersi pada wadah transparan. Bila terlihat keruh maka kualitas minyak imersi sudah berkurang.

3) Perubahan Warna

Amati ada tidaknya perubahan minyak imersi pada wadah transparan. Bila terjadi perubahan warna (kekuningan) maka kualitas minyak imersi sudah berkurang.

3. Tahap Pelaksanaan

a. Pengambilan Darah Vena

- 1) Siapkan peralatan pengambilan sampel.

- 2) Lakukan hand hygiene sebelum melakukan tindakan.
 - 3) Lengan probandus diletakkan di atas meja sampling
 - 4) Pasang torniquet $\pm$ 10 cm di atas lipatan siku
 - 5) Lakukan pencarian vena
 - 6) Tusuk bagian vena untuk mengambil darah
 - 7) Setelah volume darah dianggap cukup, lepaskan torniquet
 - 8) Masukkan darah ke tabung EDTA
- b. Pewarnaan sediaan dengan pewarna Giemsa 15% metode konvensional
- 1) Sediaan apus darah tepi dibuat dengan darah vena EDTA
 - 2) Sediaan apus darah tepi difiksasi dengan methanol 96% selama 2-3 menit.
 - 3) Sediaan dikeringkan di udara.
 - 4) Sediaan diwarnai menggunakan larutan Giemsa 15% dengan cara meneteskan pewarna di atas apusan darah tepi.
 - 5) Sediaan didiamkan selama 10 menit.
 - 6) Sediaan dibilas dengan air mengalir secara perlahan.
 - 7) Sediaan dikeringkan kemudian diamati pada mikroskop.
- c. Pewarnaan sediaan dengan pewarna Giemsa 15% menggunakan *Chamber stain*
- 1) Sediaan apus darah tepi dibuat dengan darah vena EDTA
 - 2) Sediaan apus darah tepi difiksasi dengan methanol 96% selama 2-3 menit.

- 3) Sediaan dikeringkan di udara.
- 4) Sediaan diwarnai menggunakan larutan Giemsa 15% dengan cara memasukkannya ke dalam slot pada *Chamber stain*.
- 5) Sediaan didiamkan selama 10 menit.
- 6) Sediaan dibilas dengan air mengalir secara perlahan.
- 7) Sediaan dikeringkan kemudian diamati pada mikroskop.

4. Tahap Penilaian Hasil

Tabel 2. Hasil Pewarnaan Giemsa

No	Yang Diamati		Warna
1	Inti sel	Eritrosit	-
		Leukosit	Neutrofil
			Eosinofil
			Basofil
			Monosit
			Limfosit
		Trombosit	-
2	Sitoplasma	Eritrosit	Ungu Keabuan
		Leukosit	Neutrofil
			Eosinofil
			Basofil
			Monosit
			Limfosit
		Trombosit	-
3	Granula	Eritrosit	-
		Leukosit	Neutrofil
			Eosinofil
			Basofil
			Monosit
			Limfosit
		Trombosit	Ungu

Sumber : Kiswari, 2014 dan Riswanto, 2013.

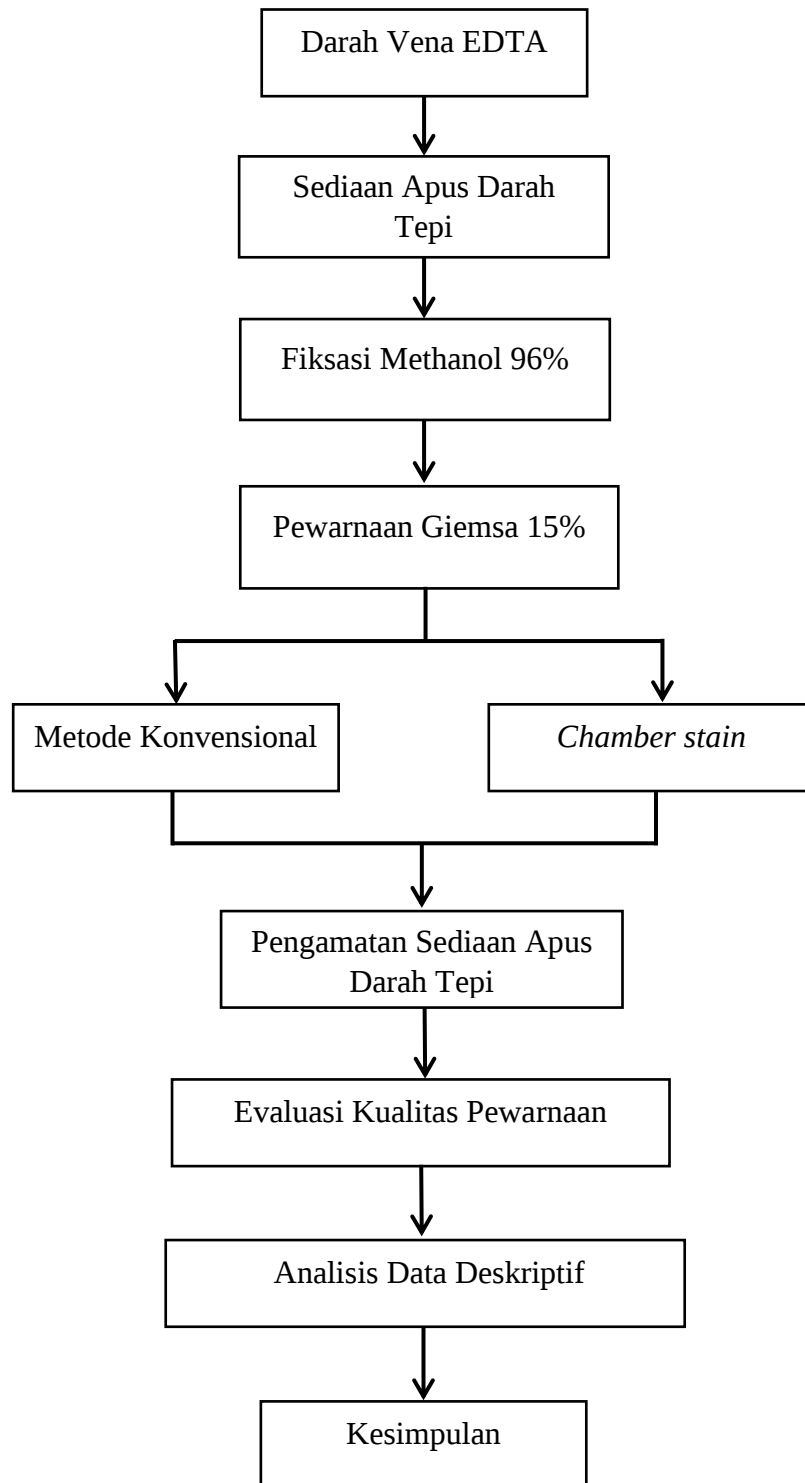
Tabel 3. Kriteria Skor Pewarnaan

Skor	Eritrosit	Sitoplasma	Granula	Inti	Trombosit
0	Tidak berwarna	Tidak Berwarna (tidak biru atau kemerahan)	Tidak berwarna	Tidak berwarna (tidak merah)	Tidak berwarna
1	Ungu keabuan	Leukosit (merah muda pucat atau biru)	Ungu atau merah-oranye	Ungu	Ungu

Sumber : Hassor, dkk., 2023.

J. Alur Penelitian

Alur penelitian ini ditunjukkan oleh Gambar 14.



Gambar 17. Alur Penelitian

K. Manajemen Data

1. Teknik Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah data hasil skor nilai pewarnaan sediaan apus darah tepi menggunakan *Chamber stain*.

Tabel 4. Hasil Skor Penilaian Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi

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 yang dilakukan meliputi penjabaran hasil skoring penilaian terhadap hasil pewarnaan sediaan apus darah tepi dengan Giemsa konsentrasi 15% menggunakan *Chamber stain* dan perhitungan perbandingan penggunaan reagen dan waktu saat dilakukan pewarnaan Giemsa 15% dengan metode konvensional setelah pengulangan 5 kali. Skoring penilaian terhadap kualitas pewarnaan, yang mencakup warna latar belakang, sitoplasma, granula, inti sel dan distribusi pewarnaan yang merata, menunjukkan efektivitas *Chamber stain* dalam menghasilkan hasil pewarnaan yang jelas dan konsisten. Jumlah cat yang digunakan lebih terkontrol dan mengurangi

penggunaan reagen secara berlebihan yang sering terjadi dalam metode konvensional menunjukkan hasil efisiensi.

L. Etika Penelitian

Etika penelitian diajukan kepada Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta sebelum penelitian dilaksanakan. Subjek penelitian ini adalah darah vena EDTA mahasiswa semester 6 DIII TLM B Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Peneliti menjamin kerahasiaan hasil penelitian dengan tidak mencantumkan identitas probandus.