

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *pre-experimental design*, karena desain ini belum merupakan eksperimen sungguh-sungguh, masih terdapat variabel luar yang ikut berpengaruh terhadap terbentuknya variabel terikat. Jadi hasil eksperimen yang merupakan variabel terikat bukan semata-mata dipengaruhi oleh variabel bebas. Hal tersebut dapat terjadi karena tidak adanya variabel kontrol dan sampel tidak dipilih secara random (Sugiyono, 2023).

Desain penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Design*. Dalam design ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara random. Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok yang lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Pengaruh adanya perlakuan (treatment) adalah ($O_1 : O_2$) (Sugiyono, 2023).

Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan perbandingan hasil pewarnaan Giemsa pengenceran 5% dengan metode konvensional dan *chamber stain*.

Tabel 2. Desain Penelitian

Sampel	Perlakuan	Posttest
R	X	O ₂
R		O ₄

Sumber: Sugiyono, 2023.

Keterangan :

R : Darah Vena

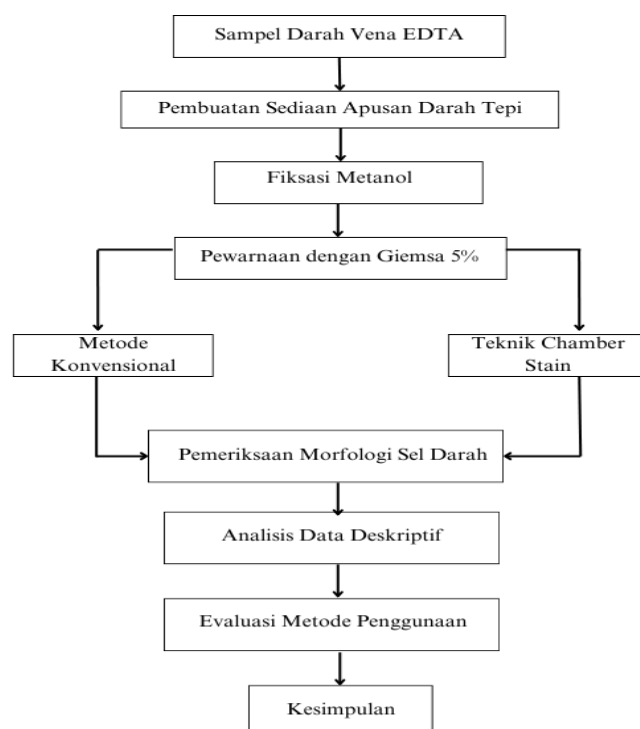
X : Sediaan Apusan Darah Tepi (SADT)

O₂ : Teknik Chamber Stain

O₄ : Metode Konvensional

B. Alur Penelitian

Alur penelitian ditunjukkan oleh Gambar 4.



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Subjek dan Objek

1. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah *chamber stain* untuk bertujuan mengamati hasil penggunaan Giemsa secara berulang pada sediaan apusan darah tepi.

2. Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan apusan darah tepi yang diberi perlakuan metode konvensional dan teknik *chamber stain*.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini secara keseluruhan akan dilaksanakan pada bulan Februari – Maret 2025. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan *chamber stain* pada pewarnaan Sediaan Apusan Darah Tepi dengan Giemsa 5%.

Skala : Nominal

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kualitas hasil pewarnaan dengan menggunakan *chamber stain* pada pewarnaan Sediaan Apusan Darah Tepi dengan Giemsa 5%.

Skala : Ordinal

F. Definisi Operasional Variabel

1. Kelompok kontrol adalah sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 5% selama 20 menit dengan metode konvensional.
2. Kelompok eksperimen adalah sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan Giemsa 5% selama 20 menit dengan *chamber stain*.
3. Hasil pewarnaan sediaan apusan darah tepi merupakan hasil skor penilaian sediaan apusan darah tepi pada warna latar belakang, eritrosit dan leukosit secara mikroskop 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. Efisiensi *chamber stain* terkait dengan penghematan waktu dan daya tahan pewarna yang digunakan berkali-kali tanpa mengurangi kualitas hasil pewarnaan.

6. Efektivitas mengacu pada kemampuannya menghasilkan pewarnaan yang jelas dan akurat tanpa ada pengendapan pewarna dipewarna. Efektivitas dinilai dari kualitas hasil pewarnaan sel darah yaitu eritrosit, leukosit dan trombosit.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis pengumpulan data yang digunakan adalah data primer yaitu data yang diperoleh secara langsung dari sumber ditanya dan bersifat *up to date*. Penelitian dilakukan secara langsung untuk mendapatkan data primer yaitu dari hasil penilaian pewarnaan morfologi eritrosit, leukosit dan trombosit yang diwarnai menggunakan pewarnaan Giemsa 5% dengan metode konvensional dan *chamber stain*.

2. Teknik Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, penilaian dilakukan pada 6 preparat dari kelompok eksperimen setiap harinya selama 5 hari, sehingga total 30 preparat dinilai. Data dikumpulkan dan disajikan dalam bentuk tabel. Proses penilaian dilakukan oleh dua orang Ahli Teknologi Laboratorium Medis (berpengalaman) pada setiap preparat dibaca dengan menilai morfologi sel eritrosit, leukosit dan trombosit ditemukan.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

Menurut Sugiyono (2023), instrument penelitian adalah alat yang digunakan untuk mengukur objek atau variable penelitian serta mengumpulkan data. Pada penelitian ini, instrument penelitian dan bahan yang akan dipakai yaitu :

1. Alat
 - a. Objek glass
 - b. Gelas ukur
 - c. Mikroskop
 - d. Pipet ukur dan pipet tetes
 - e. *Stopwatch*
 - f. Corong kaca
 - g. Rak pengecatan
 - h. Seperangkat alat sampling
 - i. Yellow tip
 - j. pH indikator atau pH meter
 - k. batang pengaduk
 - l. *Chamber stain*
2. Bahan
 - a. Darah vena EDTA
 - b. Reagen Giemsa stok
 - c. Buffer pH 6,8
 - d. Methanol

- e. Aquadest
- f. Kertas Whatman No. 1 dan No. 2
- g. Kertas saring
- h. Minyak imersi

I. Uji Validitas

Uji validasi adalah uji ketepatan antara data yang terjadi pada objek penelitian dengan data yang dilaporkan oleh peneliti (Sugiyono, 2023). Tujuan uji validitas pada penelitian ini untuk mengetahui bahwa alat yang digunakan dapat mengukur sesuatu sesuai dengan fungsinya. Uji validitas pada penelitian ini adalah validitas alat yang diuji dengan menjamin bahwa seluruh alat seperti mikroskop telah dilakukan *quality control* secara rutin dan telah dikalibrasi. Selain itu, reagen yang digunakan juga harus memenuhi standar laboratorium rumah sakit dengan melakukan uji mutu reagen. Menurut Kemenkes RI (Kementerian Kesehatan RI, 2020) uji mutu reagen dilakukan dengan cara:

1) Uji mutu Giemsa

- a) Kertas Whatman nomor 2 diletakkan diatas gelas atau petridisk agar bagian tengah kertas tidak menyentuh sesuatu.
- b) Giemsa stok ditempatkan 1 – 2 tetes di atas kertas saring. Tunggu sampai meresap dan melebar.
- c) Metil alkohol absolut 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 (metilen biru) ditengah, lingkaran cincin ungu (metilen azur) 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.

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

Melakukan pengamatan langsung. Hal-hal yang diamati seperti:

- a) Transparan, bening, tidak berwarna
- b) Mudah larut dalam air
- c) Memiliki aroma yang khas
- d) 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 imersih 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.

5) Kualitas Sediaan Apusan yang Baik

- a) Panjang apusan $\frac{2}{3}$ panjang kaca objek
- b) Tidak terputus-putus atau berlubang
- c) Bagian ekor membentuk oval
- d) Apusan tidak melebar menyentuh tepi kaca objek

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan sediaan apus darah tepi secara mikroskopis dan akan dinilai oleh jasa 2 orang penilai yang berpengalaman dan terlatih dibidangnya. Penilaian hasil pewarnaan sediaan apus darah dilakukan oleh *expert* Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) yang memiliki surat tanda registrasi aktif dan bekerja di pelayanan kesehatan, berpengalaman dan terlatih dalam membaca sediaan apus darah tepi untuk melakukan diagnosis.

J. Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan data primer yang didapatkan setelah melakukan penelitian oleh peneliti. Data diperoleh melalui beberapa tahap seperti:

1. Tahap Persiapan

- a. Peneliti mengajukan *Ethical Clearance* (EC) kepada Komisi Etik (KPEK) Penelitian Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta melalui website <http://sim-epk.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, keseluruhan data responden dijamin kerahasiaannya oleh peneliti.

2. Tahap Pelaksanaan

- 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
- d. Peneliti membuat reagen kerja Giemsa 5%
 - 1) Teknik pengenceran konsentrasi giemsa menjadi 5% larutan giemsa stok (100%) disiapkan dengan mencampur giemsa stok

dengan larutan buffer fosfat pH 6,8. Untuk 400 ml dilakukan pencampuran 20 ml giemsa stok dengan 380 ml larutan buffer pH 6,8. Berikut rumus pengenceran Giemsa 5%

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Keterangan:

C_1 = konsentrasi larutan stok (100%)

V_1 = volume larutan stok yang diperlukan

C_2 = konsentrasi larutan akhir yang diinginkan (5%)

V_2 = volume larutan akhir yang diinginkan (400 mL)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 5\% \times 400 \text{ mL}$$

$$100 \times V_1 = 5 \times 400$$

$$V_1 = \frac{2000}{100}$$

$$= 20$$

Pengenceran Giemsa 5% sebanyak 400 ml yaitu dengan melarutkan 20 ml giemsa stok ditambah 380 ml buffer fosfat.

e. Pengambilan Darah Vena

- 1) Mempersiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Memasang *tourniquet* pada lengan probandus dan meminta probandus untuk mengepalkan tangan
- 3) Bersihkan area yang akan dilakukan penusukan dengan arah dari dalam ke luar lalu biarkan kering

- 4) Siapkan jarum suntik, tusuk daerah yang telah ditentukan sebelumnya
 - 5) Isap darah dengan menarik *plunger*, pasang kasa steril diatas tusukan kemudian tarik jarum dari tusukan dan tempelkan plaster diarea bekas tusukan.
 - 6) Pindahkan darah kedalam tabung *vacutainer* EDTA.
- f. Pembuatan sediaan apus darah
- 1) Menyiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan
 - 2) Bersihkan dan keringkan kaca objek
 - 3) Teteskan sampel pada kira-kira 2 cm dari salah satu pinggirannya atau $\frac{1}{2}$ dari tempat menuliskan label identitas
 - 4) Perhatikan besar tetesan, ideal untuk apusan adalah 3 cm
 - 5) Terapkan spreader didepan tetesan dengan membentuk sudut 30-40° dengan kaca objek, kemudian geser spreader ke belakang sehingga menyentuh tetesan
 - 6) Tetesan akan melebar disepanjang pinggir spreader
 - 7) Segera dorong spreader kedepan dengan cepat dan tekanan yang cukup (dibutuhkan banyak latihan).
- g. Pewarnaan sediaan dengan pewarna Giemsa 5%
- 1) Metode Konvensional
 - a) Sediaan darah tepi dibuat dengan darah vena EDTA.

- b) Sediaan darah tepi difiksasi dengan methanol selama 2-3 menit (meneteskan methanol ke preparat hingga menutupi seluruh bagian preprat).
 - c) Sediaan diwarnai dengan larutan Giemsa 5% (meneteskan larutan pada preparat hingga menutupi seluruh bagian preparat).
 - d) Sediaan didiamkan selama 20 menit.
 - e) Sediaan dibilas dengan air mengalir secara perlahan-lahan.
 - f) Sediaan dikeringkan kemudian diamati dibawah mikroskop.
- 2) Metode Chamber Stain
- a) Sediaan darah tepi dibuat dengan darah vena EDTA.
 - b) Setiap batch pewarnaan terdiri dari 20 preparat yang diwarnai dengan 5 kali pengulangan.
 - c) Sediaan darah tepi difiksasi dengan methanol selama 2-3 menit (merendam preparat pada *chamber stain*).
 - d) Sediaan diwarnai dengan larutan Giemsa 5% (merendam preparat pada *chamber stain*).
 - e) Sediaan didiamkan selama 20 menit.
 - f) Sediaan dibilas dengan air dengan cara dicelup secara perlahan-lahan
 - g) Sediaan dikeringkan kemudian diamati dibawah mikroskop.

h. Pengamatan

1. Sediaan yang telah kering diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dengan menambahkan minyak imersi
2. Skor hasil pewarnaan terhadap sel eritrosit dan leukosit dicatat
3. Dokumentasi pada beberapa lapang pandang.

3. Tahap akhir

- a. Membuat laporan tertulis tentang hasil penelitian yang telah dilakukan.
- b. Konsultasi hasil penelitian dengan dosen pembimbing dan revisi hasil penelitian.
- c. Melakukan sidang hasil penelitian, revisi hasil penelitian dan pengesahan hasil

Tabel 3. Kriteria Hasil Pewarnaan yang Baik

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

Sumber : (Kiswari, 2014)(Riswanto, 2013).

Tabel 4. Skor Penilaian Pewarnaan Eritrosit, Leukosit dan Trombosit

Skor	Latar Belakang	Sitoplasma	Inti	Granula
1	Jernih dan biru atau kemerahan	Biru	Merah	Ungu atau merah oranye
0	Tidak jernih dan biru atau kemerahan	Tidak berwarna (tidak biru)	Tidak berwarna (tidak merah)	Tidak berwarna

Sumber: (Hassor *et al.*, 2023).

K. Manajemen Data

Data yang didapatkan dalam penelitian ini akan dilakukan analisis menggunakan analisis deskriptif.

1. Penyajian Data

Data yang diperoleh merupakan data hasil skor penilaian pewarnaan sediaan darah tepi menggunakan teknik *chamber stain*. Diukur berdasarkan kualitas pewarnaan dengan

Skor 0 = Tidak baik (pewarnaan gagal/ tidak dapat dinilai)

Skor 1 = Cukup (pewarnaan dapat diidentifikasi, tapi pewarnaan kurang jelas)

Skor 2 = Baik (pewarnaan jelas, merata dan tanpa endapan)

Total skor ditentukan berdasarkan rerata total skor dengan rentang sebagai berikut:

1,70 – 2,00 = Baik

1,20 - <1,70 = Cukup

<1,20 = Kurang

Menurut Subagyo (2000) dalam (Zahrah and Arifin, 2021) menjelaskan tingkat efektifitas dapat dihitung menggunakan rumus efektivitas sebagai berikut:

$$Efektivitas = \frac{Skor\ Rata-rata\ Chamber\ Stain}{Skor\ Rata-rata\ Metode\ Konvensional} \times 100\%$$

Jika dihitung efisiensinya, maka:

$$Efisiensi\ Penggunaan\ Giemsa = \left(\frac{50}{400} \right) \times 100\% = 12,5\%$$

Keterangan:

- a. 50 merupakan hasil dari pemakaian volume giemsa dari 400ml

Tabel 5. Kriteria Penilaian Rasio Efektivitas

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

Sumber : Kemendagri 1996 dalam Qolbuniah dan Setiawan (2022).

Tabel 6. Kriteria Penilaian Rasio Efisiensi

Presentase Nilai	Kriteria
< 100	Tidak Efisien
90 - 100	Kurang Efisien
80 - 90	Cukup Efisien
60 – 80	Efisien
< 60	Sangat Efisien

Sumber : Kemendagri 1996 dalam Qolbuniah dan Setiawan (2022).

2. Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif yang dilakukan berupa gambar mikroskopis yang telah terdokumentasi dianalisis secara deskriptif tentang perbedaan kualitas hasil pewarnaan morfologi eritrosit, leukosit dan trombosit pada sediaan apus darah tepi yang diwarnai menggunakan giemsa 5% metode konvensional dan teknik *chamber stain* dilihat dari warna eritrosit dan leukosit lebih pucat atau lebih terwarnai dengan baik setelah dilakukan pengulangan 5 kali.

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. Etika penelitian dalam penelitian ini adalah:

1. Persetujuan (*Informed Consent*)

Informed Consent merupakan bentuk persetujuan antara peneliti dengan pihak responden dengan memberikan lembaran persetujuan. Jika bersedia, maka responden akan menandatangani lembar persetujuan.

2. Menghormati privasi dan kerahasiaan subjek penelitian (*respect for privacy and confidentiality*)

- a. Tanpa nama (*Anonymity*)

Merupakan pemberian jaminan dalam penggunaan subyek penelitian dengan tidak memberikan atau mencantumkan nama responden pada hasil dan akan hanya menuliskan nama inisial pada lembar pengumpulan data atau hasil penelitian yang akan disajikan.

- b. Kerahasiaan (*Confidentiality*)

Merupakan etika pemberian jaminan kerahasiaan hasil penelitian, baik informasi masalah lainnya. Semua informasi yang akan didapatkan dijamin kerahasiaanya oleh peneliti.

3. Memperhitungkan manfaat dan kerugian (*Balancing harms and benefit*). Penelitian harus dapat memunculkan manfaat semaksimal mungkin bagi subjek penelitian.