

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *eksperimen* dengan rancangan *quasi-experiment*. Dalam penelitian eksperimental merupakan penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat dari suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja dalam kondisi yang dikendalikan oleh peneliti. Rancangan *quasi-experiment* adalah penelitian yang menempatkan unit eksperimen ke dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tanpa menggunakan pengacakan (*non-random assignment*) (Adiputra dkk., 2021).

Desain penelitian *Intact Group Comparison*. Desain penelitian ini membandingkan hasil antara dua kelompok yang sudah ada tanpa dilakukan pengacakan (*randomisasi*). Menurut Sugiyono (2013), desain ini termasuk dalam rancangan eksperimen sederhana di mana peneliti memberikan perlakuan pada satu kelompok (kelompok eksperimen) dan tidak memberikan perlakuan pada kelompok lainnya (kelompok kontrol). Setelah perlakuan diberikan, kedua kelompok langsung diukur hasilnya melalui *posttest*, tanpa dilakukan *pretest* sebelumnya. Tujuan penggunaan desain ini adalah untuk mengetahui pengaruh suatu perlakuan terhadap variabel terikat dengan membandingkan hasil akhir kedua kelompok.

Tabel 2. Desain Penelitian

Perlakuan	Post-test
X ₁	O ₁
X ₂	O ₂

Sumber : Sugiyono, 2013.

Keterangan :

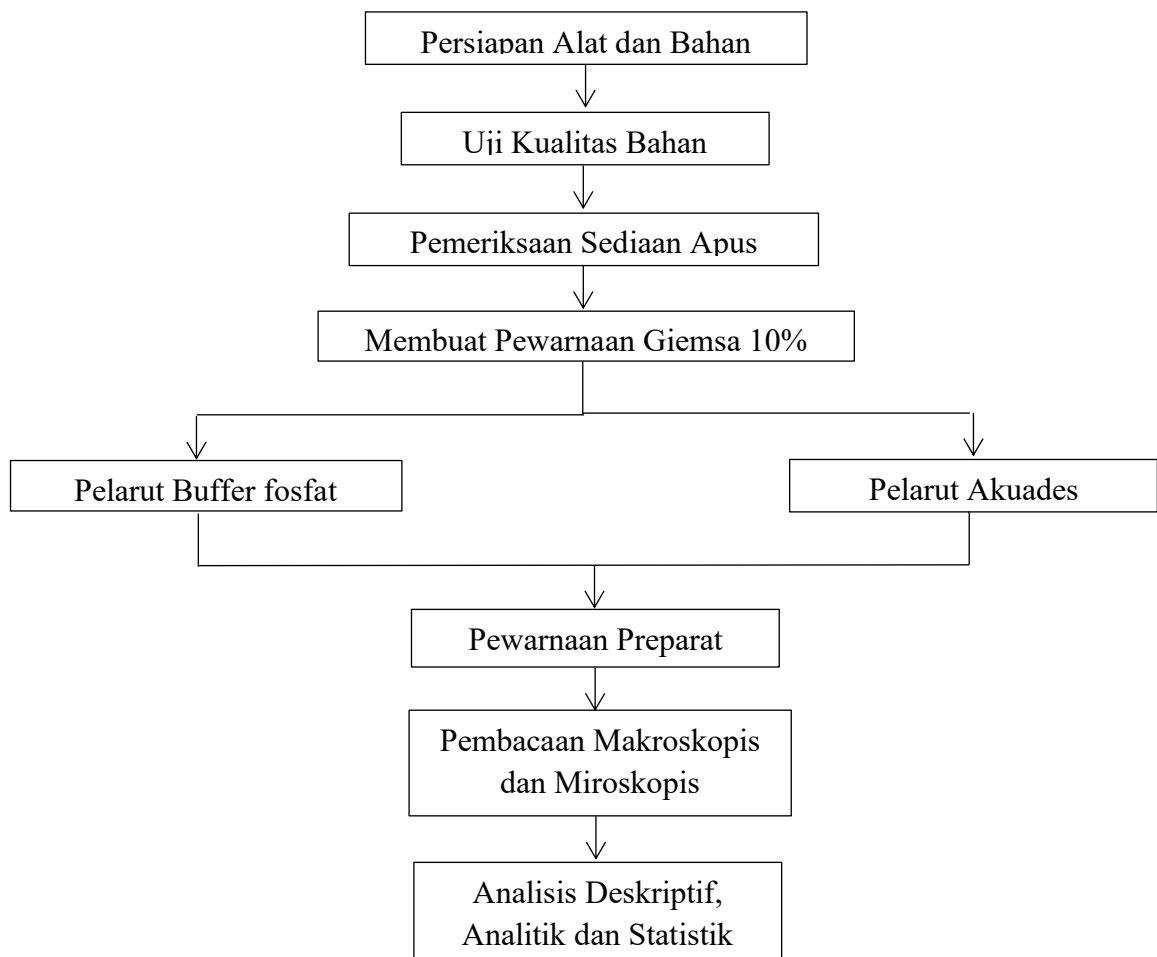
X₁ = Pewarnaan Giemsa 10% dengan akuades

X₂ = Pewarnaan Giemsa 10% dengan buffer fosfat pH 7,2

O₁ = Kualitas *Plasmodium* dan perhitungan jumlah *Plasmodium* pada sediaan darah yang diwarnai dengan akuades

O₂ = Kualitas *Plasmodium* dan perhitungan jumlah *Plasmodium* pada sediaan darah yang diwarnai dengan buffer fosfat pH 7,2

B. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah preparat dari darah positif malaria yang berasal dari daerah endemis malaria yaitu salah satu fasilitas kesehatan di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. Preparat darah ini didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

Sampel penelitian adalah sediaan darah malaria positif yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Metode pengambilan sampel menggunakan purposive sampling, adalah pemilihan sampel berdasarkan pertimbangan tertentu yang sesuai dengan tujuan penelitian (Notoadmojo, 2022).

Kriteria inklusi

- a. Sediaan darah positif malaria yang telah dikonfirmasi secara mikroskopis oleh analis berkompeten.
- b. Sediaan darah dengan kualitas baik (tebal dan/atau tipis), tidak rusak, dan tidak mengalami artefak berat
- c. Sediaan mengandung parasit *Plasmodium spp.* yang masih dapat dihitung (parasitemia terlihat jelas).

Kriteria Eksklusi

- a. Sediaan darah positif malaria dengan kerusakan fisik (retak, tergores, atau pecah).
- b. Sediaan dengan pewarnaan sebelumnya yang sangat buruk sehingga morfologi parasit tidak dapat diamati.
- c. Sediaan darah dengan kontaminasi kotoran, jamur, atau zat yang mengganggu proses pewarnaan.

Perhitungan besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah rumus Federer. Perhitungan sampel dengan rumus Federer dapat digunakan untuk menghitung jumlah sampel penelitian yang

menganalisis keterkaitan antar variabel melalui penelitian eksperimental di laboratorium (Kemenkes, 2017).

$$(t-1).(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t : Jumlah Kelompok

r : Jumlah sampel per kelompok

15 : Derajat kebebasan umum

Rumus menentukan besar sampel dalam penelitian :

$$(t-1).(r-1) \geq 15$$

$$(t-1).(2-1) \geq 15$$

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

$$t.1 \geq 15$$

$$t \geq 15 + 1$$

$$t \geq 16$$

Besar sampel pada penelitian ini adalah 16 sampel. Pada penelitian ini terdapat 2 kelompok perlakuan yaitu Pewarnaan giemsa dengan pelarut Akuades dan pewarnaan giemsa dengan pelarut buffer fosfat, sehingga total sampelnya adalah $2 \times 18 = 36$ sampel pasien positif malaria

2. Objek Penelitian

Objek penelitian adalah hasil pewarnaan giemsa konsentrasi 10% dengan pelarut buffer fosfat pH 7,2 dan pelarut *aquadest* dengan pH yang tidak stabil pada sediaan darah malaria mencakup morfologi parasit malaria (sitoplasma dan inti) dan jumlah *Plasmodium*.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari - Maret 2026

2. Tempat Penelitian

Penelitian di Laboratorium Puskesmas Gedongtengen, Kec Gedongtengen, Kota Yogyakarta.

3. Tempat Pembacaan Sampel

Pembacaan mikroskopis sampel dilaksanakan di Laboratorium Puskesmas Gedongtengen, Kec Gedongtengen, Kota Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah penggunaan pelarut aquades dan Pelarut buffer fosfat pH 7,2 untuk pewarnaan giemsa dengan konsentrasi 10%

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah plasmodium dan *Plasmodium* (inti dan sitoplasma).

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah pH akuades yang tidak stabil.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 3. Definisi Operasional.

Variabel	Defenisi Operasional	Skala	Hasil pengukuran
Pelarut Aquades	Aquadest (air suling) merupakan pelarut yang sering digunakan dalam proses pewarnaan Giemsa karena mudah diperoleh dan tidak mengandung ion yang dapat mengganggu reaksi pewarnaan.	Nominal	Pewarnaan Giemsa 10% menggunakan aquades.
Pelarut Buffer fosfat pH 7,2	Campuran NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4 yang berfungsi sebagai penyangga pH agar tetap stabil (7,2) selama proses pewarnaan Giemsa.	Nominal	Pewarnaan Giemsa 10% menggunakan buffer fosfat pH 7,2
Jumlah plasmodium	banyaknya parasit Plasmodium yang terdeteksi dalam sampel darah, biasanya dinyatakan sebagai jumlah parasit per mikroliter darah dengan acuan 200 atau 500 leukosit	Rasio	Dihitung manual dengan mikroskop (1000x) dan dibandingkan antar pelarut.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh secara langsung dari hasil pemeriksaan laboratorium. Data dikumpulkan melalui menilai kualitas pewarnaan sediaan darah malaria, meliputi morfologi parasite (Sitoplasma dan inti Plasmodium) dan perhitungan jumlah Plasmodium pada setiap preparat untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut terhadap kejelasan dan keterbacaan parasit. Penilaian dilakukan dengan membandingkan dua perlakuan pewarnaan, yaitu metode gold standard (perlakuan kontrol menggunakan pelarut buffer fosfat pH 7,2) dan metode modifikasi (menggunakan pelarut aquades).

Data yang digunakan 16 sampel sediaan darah yang sama, sehingga total preparat yang dianalisis berjumlah 32 slide. Pemilihan jumlah 16 sampel didasarkan pada ketersediaan sediaan malaria positif yang memenuhi kriteria inklusi kualitas preparat serta untuk memastikan replikasi yang memadai dalam analisis morfologi dan jumlah Plasmodium, sesuai dengan praktik umum penelitian mikroskopi malaria. Jumlah sampel tersebut juga memungkinkan perbandingan yang lebih stabil.

Pengumpulan data dilakukan melalui pengamatan mikroskopis terhadap setiap sediaan yang telah diwarnai. Setiap preparat dinilai menggunakan sistem skor berdasarkan kriteria kualitas hasil pewarnaan, kemudian dihitung jumlah Plasmodium yang tampak pada lapangan pandang yang representatif. Seluruh hasil penilaian dicatat dalam lembar observasi dan

selanjutnya diolah untuk menentukan perbedaan kualitas pewarnaan serta perbedaan jumlah Plasmodium yang terdeteksi antara kedua perlakuan.

H. Instrument dan Bahan Penelitian

1. Instrumen Penelitian

- a. Jarum lancet
- b. *Objek glass*
- c. *Cover glass*
- d. Pipet tetes
- e. Mikroskop
- f. Timer atau *stopwatch*
- g. Labu erlenmeyer
- h. Rak pewarna
- i. Gelas kimia
- j. Corong
- k. Pipet ukur
- l. Ball pipet
- m. Rak pengering preparate
- n. pH meter
- o. Gelas Ukur
- p. Botol semprot

2. Bahan penelitian

- a. Larutan stok giemsa
- b. *Alkohol swab* 70%
- c. Perparat darah yang mengandung *Plasmodium*
- d. Alkohol 70%
- e. Kertas steril
- f. Tisu
- g. Methanol absolut
- h. *Aquadest*
- i. Buffer fosfat pH 7,2
- j. Minyak imersi
- k. Air mengalir
- l. Kertas *Whatman*

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Tahap Perizinan

Perizinan menggunakan Laboratorium Puskesmas Gedongtengen, Kota Yogyakarta.

b. Tahap persiapan alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan serta memastikan berada dalam kondisi baik untuk penelitian.

c. Penulis mencari ATLM yang kompeten dalam pemeriksaan malaria dengan memiliki sertifikat

2. Tahap Uji Kualitas Bahan

a. Uji Kualitas Giemsa

- 1) Kertas saring (kertas Whatman no. 2) diletakkan di atas cawan petri dengan bagian tengah kertas tidak menyentuh sesuatu.
- 2) Larutan stok Giemsa sebanyak 1–2 tetes ditetaskan pada kertas saring, kemudian dibiarkan hingga pewarna meresap dan menyebar.
- 3) Methanol absolut sebanyak 3–4 tetes ditetaskan di tengah bulatan Giemsa, sehingga terbentuk larutan pewarna yang meresap pada kertas saring :
 - a) Lingkaran biru (*methylene blue*) di tengah
 - b) Lingkaran cincin ungu (*methylene azur*) berada di luarnya
 - c) Lingkaran tipis warna merah (eosin) pada bagian tepi

(Kemenkes RI, 2020a)

b. Uji kualitas Buffer fosfat

- 1) Larutan pH yang tidak berbau, tidak berwarna, dan tidak ada endapan dicek secara fisik.
- 2) pH buffer dicek menggunakan pH meter dengan pH $7,2 \pm 0,1$

(Kemenkes RI, 2020a).

3. Pembuatan Sediaan Darah Tepi

- a. Setetes darah ditetaskan di bagian tengah objek glass untuk sediaan darah tipis, sedangkan 2–3 tetes darah ditetaskan untuk

sediaan darah tebal. Objek glass yang berisi tetesan darah diletakkan di permukaan yang rata.

- b. Sediaan darah tipis dibuat dengan *object glass* sebagai kaca penyeret kemudian menempelkan pada ujung tetes darah hingga darah menyebar
 - c. Objek glass ditarik perlahan dengan sudut 45° hingga darah membentuk lapisan tipis dengan ujung runcing menyerupai bentuk lidah.
 - d. Sediaan tebal dibuat dengan ujung *object glass* ditempelkan pada darah. Darah ratakan di area bundar kecil sehingga berbentuk bulatan dengan diameter sekitar 1 cm
 - e. Sediaan darah dibiarkan kering dengan suhu ruangan.
4. Membuat larutan Giemsa 10% dengan pelarut *aquadest* dan buffer fosfat
- a. Alat dan bahan disiapkan
 - b. Larutan Giemsa stok dengan pelarut buffer fosfat dibuat sebanyak 100 mL menggunakan pipet dengan menambahkan 10 mL larutan giemsa ke dalam 90 mL buffer fosfat, kemudian diaduk perlahan hingga homogen
 - c. Larutan Giemsa stok dengan pelarut *aquadest* dibuat sebanyak 100 mL menggunakan pipet dengan menambahkan 10 mL larutan giemsa ke dalam 90 mL *aquadest*, kemudian diaduk perlahan hingga homogen

5. Pewarnaan pada sediaan apusan darah

Sediaan darah yang sudah kering dilakukan fiksasi dengan ditetaskan beberapa tetes methanol absolut menggunakan pipet hanya pada bagian apusan tipis saja. Membiarkan terendam selama 2 menit, kemudian dibiarkan kering pada suhu ruang sebelum pewarnaan. Pewarnaan menggunakan giemsa 10%, dengan waktu yang digunakan 20 – 25 menit

6. Pembacaan Makroskopis

- a. Preparat diletakkan pada permukaan datar dengan *background* putih
- b. Warna sediaan diamati secara visual
 - 1) Warna ungu muda merata menunjukkan hasil pewarnaan baik.
 - 2) Warna terlalu pucat atau terlalu gelap menunjukkan waktu pewarnaan atau konsentrasi pewarna tidak sesuai.
- c. Kemerataan pewarnaan diamati dari bagian tepi hingga bagian tengah.
- d. Kebersihan permukaan kaca objek dari debu, minyak, atau sisa pewarna diperiksa.
- e. Kejernihan warna preparat diamati.
- f. Hasil dicatat berdasarkan tabel kriteria makroskopis

Tabel 4. Skor Penilaian Kualitas Makroskopis.

No	Aspek yang dinilai	Kriteria Penilaian	Skor	Kategori
1.	Warna	Ungu muda, tidak pucat/tidak terlalu pekat	3	Baik
		Sedikit pucat atau agak gelap	2	Cukup
		Warna tidak sesuai (pucat/gelap)	1	Buruk
2	Kemerataan pewarnaan	Warna merata dari tepi hingga tengah apusan	3	Baik
		Warna agak tidak merata pada bagian tertentu	2	Cukup
		Warna tidak merata (pekat di satu sisi)	1	Buruk
3	Kebersihan Permukaan	Permukaan kaca bersih, bebas noda/minyak/artefak	3	Baik
		Terdapat sedikit noda/minyak namun tidak mengganggu	2	Cukup
		Banyak noda/minyak mengganggu pengamatan	1	Buruk
4	Kejernihan Warna	Warna jernih, detail sel tampak jelas	3	Baik
		Agak keruh namun masih dapat diamati	2	Cukup
		Keruh, detail sel tidak tampak jelas	1	Buruk

- g. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100×, kemudian 1000× dengan bantuan imersi.
- h. Plasmodium diidentifikasi berdasarkan morfologi parasit pada preparat darah.
- 1) Amati stadium plasmodium
 - 2) Hitung jumlah parasit pada 100 lapang pandang

J. Manajemen Data

1. Analisis Deskriptif

Data diperoleh dari hasil penilaian kualitas sediaan apusan darah yang diwarnai menggunakan pewarna Giemsa konsentrasi 10% dengan dua jenis pelarut, yaitu buffer fosfat pH 7,2 dan aquades, meliputi penilaian kualitas hasil pewarnaan serta identifikasi keberadaan parasit *Plasmodium* pada masing-masing sediaan, kemudian data disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis analitik

Analisis analitik dilakukan untuk mengetahui perbedaan hasil perhitungan jumlah plamodium sediaan darah antara penggunaan pelarut aquades dan buffer fosfat pH 7,2. Tahapan analisis dilakukan setelah seluruh data hasil pengamatan dikumpulkan dan dicatat dalam lembar observasi.

Perhitungan jumlah *Plasmodium* pada sediaan dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Jumlah } Plasmodium \text{ per } \mu\text{L darah} = \frac{\text{Jumlah parasit yang ditemukan}}{\text{Jumlah leukosit yang dihitung}} \times 8000$$

Keterangan:

Jumlah parasit yang ditemukan → total parasit yang terlihat dalam 100 lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 1000×.

Jumlah leukosit yang dihitung → jumlah sel leukosit pada lapang pandang yang sama.

8000 → rata-rata jumlah leukosit normal per mikroliter darah pada manusia.

Hasil akhir menunjukkan kepadatan parasit (parasite density) per μL darah, digunakan untuk menilai tingkat infeksi malaria (WHO, 2023).

3. Analisis statistik

Pada penelitian ini, pengaruh perlakuan dianalisis dengan uji beda, pengolahan data dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan perbandingan antara metode *gold standard* dengan perlakuan modifikasi. Data dianalisis dengan menggunakan program SPSS 25.0 *for windows*. Analisis statistik yang digunakan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*, karena jumlah sampel kurang dari 50. Dengan kriteria pengambilan keputusan adalah:

- a. Data dinyatakan berdistribusi normal (H_0 diterima) apabila nilai signifikan ($\text{Sig} \geq 0,05$)
- b. Data dinyatakan tidak berdistribusi normal (H_0 ditolak) apabila nilai signifikan ($\text{Sig} \leq 0,05$)

Apabila data pengamatan berdistribusi normal, maka analisis perbandingan Jumlah *Plasmodium* antara dua kelompok pelarut akan dilakukan menggunakan uji statistik *Independent Sample T-Test*. Sebaliknya, apabila tidak berdistribusi normal maka analisis dilanjutkan menggunakan dengan uji *Mann Whitney U (2 Independent Samples)* dengan skala data nominal, dimana pada data SPSS yang dimasukkan adalah rerata skor hasil penilaian yang dilakukan oleh ATLM (*expert*)

yang sudah sesuai dengan ketentuan kriteria dari masing-masing unsur penilaian kualitas hasil pewarnaan.

Berikut adalah hipotesis yang digunakan:

H_0 : Tidak terdapat perbedaan jumlah *Plasmodium* maupun *Plasmodium* (inti dan sitoplasma) pada sediaan darah yang diwarnai Giemsa 10% menggunakan pelarut buffer fosfat dan *aquadest*.

H_a Ada perbedaan jumlah *Plasmodium* maupun *Plasmodium* (inti dan sitoplasma) pada sediaan darah yang diwarnai Giemsa 10% menggunakan pelarut buffer fosfat dan *aquadest*.

K. Etika Penelitian

Etika penelitian diajukan kepada Komite Etik Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta yaitu Surat Keterangan Layak Etik dengan No.DP.04.03/e-KEK.1/079/2026. Sampel penelitian menggunakan sisa darah pasien positif malaria. Penelitian ini tidak memerlukan *informed consent* dan Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP).