

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *post-test only control group design*. Pada penelitian ini, sediaan mukosa mulut diwarnai menggunakan ekstrak ubi jalar ungu pada berbagai konsentrasi dibandingkan dengan eosin sebagai kontrol metode diff quik.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Instrumen dengan bahan alam Farmasi Politeknik Kesehatan Kementrian Kesehatan Kupang untuk pembuatan ekstrak ubi jalar ungu dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang untuk melakukan pewarnaan.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada Bulan April-Mei 2026.

C. Variabel penelitian

1. Variabel bebas (*Independent variable*)

Dalam hal ini yang menjadi variabel bebas adalah ekstrak ubi jalar ungu pada berbagai konsentrasi 5%, 10%, 20%, dan 30 dengan variasi waktu 10 menit dan 15 menit sebagai pengganti eosin.

2. Variabel terikat (*Dependent variable*)

Dalam hal ini yang menjadi variabel terikat adalah gambaran hasil mikroskopis pada pewarnaan sitologi mukosa mulut, yang dinilai berdasarkan inti sel dan sitoplasma sel epitel mukosa mulut.

D. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.*) yang digunakan sebagai bahan pewarna pada pemeriksaan sitologi mukosa mulut. Ubi jalar ungu yang digunakan adalah ubi segar yang diambil pada daerah Lelogama Amfoang Selatan, kemudian diekstraksi menggunakan etanol 96% dan dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 5%, 10%, 20%, dan 30 denga.

Penentuan jumlah pengulangan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu:

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

Keterangan:

r = jumlah pengulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan rumus Federer, maka dapat dihitung banyaknya pengulangan yang dapat dilakukan yaitu :

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

$$(r-1)(8-1) \geq 15$$

$$(r-1) 7 \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15 + 7$$

$$7r \geq 22$$

$$r \geq 22/7$$

$$r = 3,14$$

$$r = 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus Federer di atas, jumlah pengulangan dibulatkan ke atas sehingga diperoleh 4 kali pengulangan untuk setiap perlakuan.

E. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skor pengukuran	Skala
Ekstrak ubi jalar ungu	Ekstrak ubi jalar ungu adalah hasil ekstraksi ubi jalar ungu metode maserasi, menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak kasar (<i>crude ekstrak</i>).		
Sediaan mukosa Mukut	Diambil pada responden sehat.		
Pewarnaan sitologi mukosa mulut metode Diff Quik	Pewarnaan menggunakan eosin sebagai kontrol dan pewarnaan menggunakan ekstrak ubi jalar ungu.		
Gambaran Hasil Mikroskopis Sediaan Sitologi	Hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap sediaan sitologi sel epitel mukosa mulut menggunakan mikroskop Perbesaran 400x. Penilaian dilakukan berdasarkan kejelasan warna inti dan sitoplasma.	(Skor 1) Skala tidak baik, jika warna pada inti sel dan sitoplasma tidak jelas serta tidak dapat dibedakan. (Skor 2) Skala kurang Baik, jika warna pada inti sel dan sitoplasma kurang jelas tetapi masih dapat dibedakan. (Skor 3) Skala baik, jika warna inti sel dan sitoplasma jelas dan dapat dibedakan dengan baik.	Ordinal

F. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Persiapan

- a. Peneliti mengajukan etik penelitian dan izin penelitian
- b. Persiapan alat dan bahan :
 1. Alat : Gelas kimia, gelas ukur, toples kaca, neraca analitik, pipet tetes, blender, kertas saring, mikroskop, objek glass, cover glass, Cytobrush, stopwatch, waterbath, botol kaca gelap, rotary evaporator atau waterbath.
 2. Bahan : Etanol 96%, metanol, eosin, methylen blue, dan ubi jalar ungu 2 kg.

2. Tahapan penelitian

- a. Pembuatan ekstrak ubi jalar ungu (Kiswaya & Pranowo, 2018) :

Tahap awal adalah mencuci ubi jalar sehingga bersih kemudian dikukus selama ± 5 menit dan didinginkan. Selanjutnya dilakukan pengirisan dengan ketebalan 3,0–5,0 mm dan dikeringkan pada oven. Kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk halus sebanyak 200 gram. Serbuk tersebut dimaserasi menggunakan etanol 96 % sebanyak 2 liter dan dimaserasi selama 72 jam dan dilakukan pengadukan setiap 6 jam. Setelah maserasi, larutan disaring dan filtrat dievaporasi pada suhu 50°C hingga larutan mengental dan didapatkan ekstrak kasar (*crude ekstrak*).

b. Pengenceran ekstrak ubi jalar ungu :

Rumus Pengenceran berat per volume (% b/v):

$$\% b/v = \frac{\text{berat zat (gram)}}{\text{volume larutan (mL)}} \times 100$$

Tabel 3. 2 Perhitungan Pengenceran

Pengenceran	Ekstrak Ubi Jalar Ungu (gr)	Etanol 90 % (mL)
30%	7,5 gr ekstrak ubi jalar ungu	Etanol 96% <i>add</i> 25 ml
20%	5gr ekstrak ubi jalar ungu	Etanol 96% <i>add</i> 25 ml
10%	2,5gr ekstrak ubi jalar ungu	Etanol 96% <i>add</i> 25 ml
5%	1,25 gr ekstrak ubi jalar ungu	Etanol 96% <i>add</i> 25 ml

c. Pembuatan sediaan sitologi

1. Pengambilan sel mukosa mulut dilakukan dengan mengerok permukaan mukosa bukal menggunakan spatula cytobrush secara perlahan.
2. Hasil kerokan sel mukosa mulut dioleskan secara tipis dan merata pada permukaan kaca objek yang bersih.
3. Preparat yang telah dibuat segera difiksasi dengan cara dicelupkan ke dalam larutan metanol sebanyak 10 kali. Setelah proses fiksasi selesai, sediaan diangkat dan dikeringkan pada suhu ruang.
4. Sediaan sitologi yang telah kering selanjutnya siap untuk dilakukan proses pewarnaan.

d. Prosedur pewarnaan :

1. Pewarnaan diff quik metode standar (menggunakan Eosin) :

Setelah sediaan difiksasi, diwarnai dengan cat eosin sebanyak 10 kali celupan untuk memberikan kontras pada sitoplasma, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan methylen blue 10 kali celupan untuk menonjolkan inti sel. Setelah proses pewarnaan selesai, sediaan dibilas dan dikeringkan slide dan lakukan pengamatan pada mikroskop.

2. Pewarnaan diff quik modifikasi (menggunakan ekstrak) :

Slide untuk perlakuan dibagi menjadi lima kelompok:

- a. Kelompok A : digenangi selama 10 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 5% dan methylene blue.
- b. Kelompok B : digenangi selama 15 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 5% dan methylene blue.
- c. Kelompok C : digenangi selama 10 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 10% dan methylene blue.
- d. Kelompok D : digenangi selama 15 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 10% dan methylene blue.
- e. Kelompok E : digenangi selama 10 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 20% dan methylene blue.
- f. Kelompok F : digenangi selama 15 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 20% dan methylene blue.

- g. Kelompok G : digenangi selama 10 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 30% dan methylene blue.
- h. Kelompok H : digenangi selama 15 menit menggunakan ekstrak ubi jalar ungu konsentrasi 30% dan methylene blue.

Setelah pengecatan, preparat dibilas dengan air mengalir, preparat kemudian dibiarkan mengering. Setelah kering, preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x untuk menilai kualitas pewarnaan inti sel dan sitoplasma.

G. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat ada tidaknya perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan mukosa mulut menggunakan ekstrak ubi jalar ungu pada konsentrasi (5%, 10%, 20% dan 30%) dengan variasi pewarnaan 10 menit dan 15 menit dan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diwarnai menggunakan eosin. Selanjutnya, untuk mengetahui kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*.

Pengamatan mikroskopis dilakukan pada sel-sel epitel mukosa mulut dengan perbesaran 400x pada setiap preparat. Hasil pewarnaan dinilai menggunakan skor penilaian (1 tidak baik), (2 kurang baik), (3 baik) berdasarkan yang dinilai berdasarkan inti sel dan sitoplasma sel epitel mukosa mulut.