

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true eksperimental* dengan desain *post-test only control group desain*. Sediaan sitologi dengan Pewarnaan *Diff-Quik* modifikasi, yaitu menggunakan ekstrak daun jati pada proses *staining*, dibandingkan dengan menggunakan eosin.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Nusa Cendana Kupang untuk pembuatan ekstrak daun jati dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang untuk melakukan pewarnaan modifikasi Eosin.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-April 2026.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent variabel*)

Variabel bebas adalah variasi waktu 10 menit, 12 menit, dan 15 menit.

2. Variabel Terikat (*Dependent variabel*)

Variabel terikat yaitu Gambaran hasil mikroskopis yang diamati pada preparat sitologi cairan pleura menggunakan ekstrak daun jati dengan Pewarnaan *Diff-Quik*.

D. Populasi, Sampel dan Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah kuncup daun jati yang berpotensi digunakan sebagai bahan pewarnaan alami dalam pewarnaan sitologi metode *Diff- quik*.

2. Sampel

Sampel yang digunakan merupakan cairan sitologik yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. Dr. W.Z. Johannes Kupang.

Penentuan jumlah pengulangan pada setiap perlakuan menggunakan **rumus Federer**. Rumus ini berfungsi untuk mengetahui jumlah minimal ulangan yang diperlukan agar data hasil penelitian memenuhi syarat analisis ragam dan memiliki tingkat keandalan yang baik. Menurut Hanafiah (2014) dalam Khansa (2019), rumus Federer dapat dituliskan sebagai berikut:

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

Keterangan :

r = banyaknya pengulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan jumlah perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebanyak tiga perlakuan ($t=3$), maka diperoleh perhitungan sebagai berikut:

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

$$(r-1)(3-1) \geq 15$$

$$(r-1)2 \geq 15$$

$$2r \geq 15 + 2$$

$$r \geq 8,5$$

$$r \geq 9$$

Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus Federer, jumlah ulangan minimal yang diperlukan adalah 9 kali.

3. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Total Sampling , yaitu Seluruh cairan pleura yang tersedia di laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof Dr W.Z johannes Kupang pada bulan Februari 2026.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Batasan istilah

Variabel	Definisi Operasional	Skor Pengukuran	Skala
Waktu	Waktu yang di gunakan dalam pewarnaan Diff-Quik pada sediaan control	Variasi waktu yang digunakan pada pewarnaan sediaan citologi yaitu 10 menit, 12 menit dan 15 menit	
Ekstrak Daun Jati (EDJ)	Pewarnaan alami yang diperoleh dari hasil ekstraksi daun jati (<i>Tectona grandis</i>) yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan telah di uapkan menggunakan evaporator hingga menjadi ekstrak kental yang dilarutkan dengan aquadest dengan konsentrasi 40% (10 menit, 12 menit, dan 15 menit.)		
Hasil mikroskopis sediaan sitologi dengan pewarnaan Diff-Quik	Pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop terhadap sediaan sitologi yang di warnai dengan ekstrak kuncup daun jati	Skor 1 (tidak baik) jika inti sel dan sitoplasma tidak terwarnai dengan jelas sehingga tidak dapat dibedakan antara inti sel dan sitoplasma Skor 2 (kurang baik) jika inti sel dan sitoplasma terwarnai kurang jelas namun masih dapat di bedakan antara inti dan sitoplasma Skor 3 (baik) jika inti sel dan sitoplasma terwarnai dengan jelas sehingga dapat di bedakan antara inti dan sitoplasma	ordinal

F. Prosedur Kerja

1. Tahap perencanaan

- a. Proposal penelitian disusun dan diajukan kepada pembimbing untuk mendapatkan persetujuan
- b. Proses pengurusan kode etik penelitian dilakukan sesuai dengan pedoman yang berlaku
- c. Permohonan izin penelitian diurus dan diselesaikan sebelum penelitian dimulai

2. Pembuatan ekstrak daun jati

a. Alat

Gelas kimia, gelas ukur, neraca analitik, rotary vacuum, evaporator, waterbath, oven, gunting, blender, saringan.

b. Bahan

Etanol, Aquadest, serbuk daun jati, dan ekstrak daun jati

c. Prosedur kerja

Prosedur pembuatan ekstrak kuncup daun jati menggunakan maserasi dengan modifikasi.

1. Kuncup daun jati di cuci dan digunting menjadi kecil – kecil.
2. Kemudian dikeringkan menggunakan selama 1 minggu.
3. Setelah daun jati oven suhu 40°C selama 18 jam hingga kering, daun jati di blender hingga halus, serbuk kuncup daun jati ditimbang sebanyak 200 gram
4. Bubuk daun jati dimasukan ke dalam toples kaca, dan di tambahkan 1000 ml pelarut etanol 96% kemudian homogenkan.

5. Perendaman di lakukan selama 24 jam, di lanjutkan ke alat evaporator dengan suhu < 60 hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental.
6. Selanjutnya pembuatan ekstrak daun jati 40% menggunakan pengenceran dengan cara 40 ml ekstrak kuncup daun jati di tambahkan dengan 60 ml alkohol 96% (Nadifah et al., 2024).

3. Pengambilan Sampel Cairan Pleura

Pengambilan sampel cairan pleura dilakukan oleh dokter melalui prosedur torakosentesis (thoracentesis), yakni tindakan medis yang melibatkan pemasukan jarum berongga secara aseptik ke dalam rongga pleura untuk mengeluarkan cairan pleura. Prosedur ini bertujuan memperoleh sampel untuk analisis diagnostik maupun kepentingan terapeutik. Pelaksanaan torakosentesis umumnya dilakukan dengan bantuan ultrasonografi untuk menentukan lokasi cairan secara akurat dan meminimalkan risiko komplikasi. Tindakan ini dilakukan menggunakan anestesi lokal serta mengikuti standar sterilitas yang ketat demi menjamin keamanan dan efektivitas prosedur.

4. Pengambilan Sampel Sitologi

Spesimen yang digunakan dalam penelitian ini adalah cairan Efusi pleura yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang, yang pengambilannya dilakukan oleh dokter.

5. Pembuatan Sediaan Sitologi

Untuk membuat sediaan sitologi, spesimen diambil terlebih dahulu langsung dari sumbernya kemudian disiapkan untuk diproses lebih lanjut di laboratorium. Ada beberapa rangkaian proses dalam pembuatan sediaan citologi diantaranya adalah preparasi, fiksasi, dan pewarnaan.

a. Alat

Centrifuge, *Objek glass*, Tabung rekasi, Micropipet, White Tip 100 mikron, dan Hairdayer.

b. Bahan

Cairan Efusi Pleura

c. Prosedur kerja

Pembuatan sediaan sitologi terlebih dahulu harus di preparasi yaitu dengan cara di Centrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, untuk mendapatkan endapan pada dasar tabung yang nantinya akan di gunakan untuk pembuatan sediaan sitologi.

Cara Memisahkan sampel menggunakan Centrifuge yaitu :

1. Spesimen yang baru di keluarkan dari kulkas di letakan di suhu ruang terlebih dahulu sebelum di tuangkan ke tabung.
2. Pastikan Agar Tabung reaksi yang di gunakan untuk centrifuge bersih dan tidak pecah.
3. Spesimen yang sudah dilakukan pengambilan oleh dokter menggunakan spuit di tuangkan ke dalam tabung reaksi 2/3 dari tabung.
4. Setelah itu Centrifuge spesimen tersebut dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
5. Tabung yang berisi spesimen di keluarkan dari centrifuge, lalu lakukan pemipetan untuk mengambil endapan pada dasar tabung sebanyak 100 mikron
6. Sampel tersebut di letakan pada *objek glass* dan di buat apusan dan setelah itu lakukan pewarnaan.

6. Pewarnaan Diff- Quik

Pewarnaan dilakukan secara manual dengan menempatkan reagen pada wadah kecil kemudian sediaan di masukan ke dalam wadah tersebut dan di didiamkan sesuai dengan tahap pewarnaan. Prosedur pewarnaan di sajikan dalam tabel berikut :

- a. Prosedur pewarnaan Diff- quik menggunakan eosin

Tabel 3.2 Tahapan Pewarnaan Diff – Quik

No.	Nama Reagen	Waktu
1.	Alkohol 96 %	10 celup
2.	Eosin	10 celup
3.	Methylen Blue	10 celup

Sumber : SOP Pewarnaan Diff- Quik RSUD PROF.W.Z Yohannes Kupang

- b. Prosedur pewarnaan Diff- quik menggunakan ekstrak kuncun daun jati

Tabel 3.3 Tahapan Modifikasi Pewarnaan Diff – Quik

No.	Nama Reagen	Waktu
1.	Alkohol 96 %	10 celup
2.	Ekstrak daun jati 40%	10 menit, 12 menit dan 15 menit
3.	Methylen Blue	10 celup

7. Pembacaan Sediaan

Sediaan yang telah diwarnai kemudian dibaca di bawah mikroskop oleh analis atau dokter spesialis patologi anatomi. Pembacaan dilakukan dengan menilai kualitas sel, karakter morfologi, keberadaan sel inflamasi, sel atipik atau ganas, serta komponen lain yang mendukung interpretasi diagnostik. Prosedur penilaian ini mengikuti pedoman pemeriksaan sitologi yang berlaku.

G. Analisis Hasil

Penilaian kualitas hasil pewarnaan dilakukan menggunakan tiga kriteria

- a. Skor 1 (Tidak Baik):** inti dan sitoplasma tidak terwarnai dengan jelas, sehingga tidak dapat dibedakan.
- b. Skor 2 (kurang baik):** inti dan sitoplasma terwarnai namun kurang jelas, masih dapat dibedakan.
- c. Skor 3 (Baik):** inti dan sitoplasma terwarnai jelas dan mudah dibedakan.