

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian true eksperimental dengan desain *post-test only control group design*, yang bertujuan untuk membandingkan kualitas hasil pewarnaan sediaan sitologi antara penggunaan ekstrak bunga kembang sepatu sebagai pewarna alami alternatif dan eosin sebagai pewarna sintetis pada metode *Diff-Quik*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi sebagai tempat pembuatan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L.*), serta di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang sebagai tempat pelaksanaan pewarnaan *Diff-Quik* pada sediaan sitologi mukosa mulut.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan april-mei 2026.

C. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L.*) yang digunakan sebagai pewarna alami pada sediaan sitologi, konsentrasi yang digunakan adalah 70%,60%,50%.

b. Variabel terikat (*Dependent Variable*)

Dalam hal ini variabel terikat adalah gambaran hasil mikroskopis sediaan sitologi mukosa mulut setelah pewarnaan, yang dinilai berdasarkan kejernihan warna, intensitas warna, dan kontras antara inti dan sitoplasma.

D. Sampel dan Populasi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Populasi pada penelitian ini adalah mahasiswa yang dilakukan pengambilan sampel mukosa mulut. Ekstrak bunga kembang sepatu dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 70%, 60%, dan 50%.

Penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini digunakan rumus Federer sebagai berikut

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

Keterangan:

r banyaknya pengulangan

t = kelompok jumlah perlakuan

Berdasarkan rumus Federer, dapat ditentukan jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini.

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

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

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

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

$$2r - 2 \geq 15 + 2$$

$$2r \geq 17$$

$$r \geq 17/2 \geq 8,5$$

$$r = 9$$

Jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 27 slide sediaan mukosa mulut yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak bunga kembang sepatu, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 9 slide.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skor Pengukuran	Skala
Eksrak bunga kembang sepatu	Ekstrak bunga kembang sepatu digunakan sebagai pewarna alami pada sediaan sitologi mukosa mulut dengan variasi konsentrasi. Ekstrak diperoleh melalui proses maserasi selama 1 minggu.	70% 60% 50%	Nominal
Gambaran hasil mikroskopis sediaan sitologi mukosa mulut setelah pewarnaan eosin	Hasil mikroskopis sediaan sitologi mukosa mulut setelah diwarnai dengan ekstrak bunga kembang sepatu dan eosin sintetis menggunakan teknik <i>Diff-Quik</i> .	Skor 3 (Baik): Pewarnaan sediaan terlihat jelas, inti sitoplasma sel mudah dibedakan, kontras warna optimal. Skor 2 (Cukup): Pewarnaan sediaan masih terlihat, namun kontras warna terlihat kurang jelas. Skor 1 (Tidak Baik): Pewarnaan samar atau tidak merata, sel sulit dibedakan, dan terdapat banyak noda atau artefak.	Ordinal

F. Prosedur Penelitian

1. Pengurusan Etik Penelitian

- a. Membuat surat etik penelitian
- b. Membuat surat izin penelitian
- c. Membuat lembar persetujuan (*informed consent*) untuk ditandatangani oleh responden

2. Pengumpulan Data

Pengumpulan data diawali dengan bertemu responden, memberikan penjelasan mengenai maksud dan tujuan penelitian, serta meminta persetujuan responden melalui penandatanganan lembar *informed consent*. Pengumpulan data dilakukan menggunakan data primer yang diperlukan dalam penelitian. Data primer tersebut diperoleh melalui pengisian kuesioner oleh responden, yang berisi informasi umum responden yang berkaitan dengan penelitian. Selain itu, dilakukan pengambilan sampel mukosa mulut sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan.

3. Metode Pengambilan Sampel

Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah sitologi eksfoliatif dimana pengambilan sampel dilakukan dengan teknik kerokan (scraping)

4. Alat dan Bahan

1. Alat : Gelas kimia 50 ml, spatula, pipet tetes, blender, kertas saring, neraca analitik, evaporator, mikroskop, stopwatch, objek glass, botol kaca gelap, botol kaca ukuran 3 liter, aluminium foil, dan stik es krim steril.

2. Bahan : Eosin, methylene blue, methanol absolut, ekstrak bunga kembang sepatu, etanol 96%, tisu, air mengalir.

5. Sampel Uji

Sampel uji yang digunakan adalah mukosa bukal dari rongga mulut para responden.

6. Prosedur Kerja

Pembuatan ekstrak bunga kembang sepatu dilakukan dengan cara memisahkan kelopak bunga dari tangkainya, kemudian kelopak bunga dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Setelah itu, kelopak bunga dikeringkan pada suhu ruang dan dihindarkan dari paparan sinar matahari langsung hingga benar-benar kering. Kelopak bunga yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk halus. Serbuk bunga kembang sepatu ditimbang sebanyak 350 gram, lalu dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 2,5 liter. Campuran tersebut diaduk hingga homogen dan direndam selama 1 minggu menggunakan metode maserasi sambil sesekali diaduk. Setelah proses perendaman selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh filtrat. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental bunga kembang sepatu. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dipanaskan menggunakan waterbath selama satu minggu untuk mengurangi sisa pelarut dan memperoleh ekstrak yang lebih kental. Setelah proses pemanasan selesai, ekstrak kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 70%, 60%, dan 50% menggunakan etanol 96%.

Pembuatan larutan ekstrak bunga kembang sepatu dilakukan dengan menggunakan rumus konsentrasi untuk memperoleh tiga variasi konsentrasi perlakuan yang digunakan dalam penelitian. Menggunakan rumus

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

7. Pengenceran ekstrak bunga kembang Sepatu:

- a. Pembuatan konsentrasi 70%

17,5 gr ekstrak bunga kembang sepatu di tambahkan etanol 96 % *ad* 25 ml

- b. Pembuatan konsentrasi 60 %

15 gr ekstrak bunga kembang sepatu di tambahkan etanol 96% *ad* 25 ml

- c. Pembuatan konsentrasi 50%

12,5 gr ekstrak bunga kembang sepatu di tambahkan etanol 96% *ad* 25 ml

8. Pembuatan sediaan sitologi

Sediaan sitologi dibuat dari sel epitel mukosa mulut yang diambil dari bagian pipi dalam. Pengambilan dilakukan dengan cara mengerok ringan permukaan mukosa menggunakan stik es krim steril yang diperoleh dalam kondisi sekali pakai dan steril dari apotek atau toko alat kesehatan biasanya tersedia dalam kemasan steril, ukuran standar sekitar panjang 11–15 cm dengan lebar ± 1 cm). yang telah disiapkan sebelumnya. Hasil kerokan dioleskan secara merata pada kaca objek hingga membentuk lapisan tipis agar sel mudah diamati di bawah mikroskop.

9. Pewarnaan eosin

Sediaan digunakan sebagai kontrol. Sediaan yang hampir kering difiksasi dengan metanol melalui 10 kali celupan untuk menjaga struktur sel. Selanjutnya, sediaan 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 dengan air dan diamati menggunakan mikroskopis.

G. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis karena berskala ordinal dan tidak berdistribusi normal. Hasil analisis menunjukkan nilai $p = 0,002$ ($p < 0,05$), yang menandakan adanya perbedaan bermakna kualitas pewarnaan mikroskopis antar kelompok. Uji lanjut Mann-Whitney U menunjukkan bahwa beberapa kelompok ekstrak bunga kembang sepatu tidak berbeda bermakna dengan eosin, sehingga ekstrak bunga kembang sepatu berpotensi sebagai pewarna alami pengganti eosin pada pengecatan Diff-Quik.

Hasil pengamatan secara mikroskopis dinilai berdasarkan skor pengukuran. Skor 3 (Baik): Pewarnaan sediaan terlihat jelas, inti sitoplasma sel mudah dibedakan, kontras warna optimal. Skor 2 (Cukup): Pewarnaan sediaan masih terlihat, namun kontras warna terlihat kurang jelas. Skor 1 (Tidak Baik): Pewarnaan samar atau tidak merata, sel sulit dibedakan, dan terdapat banyak noda atau artefak.