

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experiment* dengan desain *post-test only control group* yang digunakan untuk menilai efektivitas ekstrak buah naga merah sebagai pengganti eosin pada pewarnaan Papanicolaou terhadap sediaan apusan epitel mukosa mulut.

B. Waktu dan Tempat

1. Waktu

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret - Mei 2026.

2. Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di dua lokasi berbeda sesuai dengan tahapan penelitian. Proses pembuatan dan ekstraksi buah naga merah dilakukan di Laboratorium Instrumen Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang. Selanjutnya, proses pengamatan dan penilaian hasil pewarnaan Papanicolaou pada sediaan apusan epitel mukosa mulut dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. Dr. W. Z. Yohannes Kupang.

C. Variabel Penelitian

1) Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak buah naga merah dengan variasi 2%, 5%, 10%, dan 20%.

2) Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini, yaitu hasil mikroskopis (inti dan sitoplasma) sediaan sitologi apusan epitel mukosa mulut menggunakan ekstrak buah naga merah pada proses pewarnaan Papanicolaou.

D. Sampel dan Teknik Sampling

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan apusan sel epitel mukosa mulut yang diperoleh dari individu sehat. Sediaan tersebut kemudian diwarnai menggunakan ekstrak buah naga merah dengan konsentrasi 2%, 5%, 10%, dan 20% sebagai perlakuan serta eosin sebagai kontrol.

Penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini digunakan rumus federer sebagai berikut:

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

Ket:

r = banyaknya pengulangan

t = jumlah kelompok perlakuan (4 perlakuan)

Berdasarkan rumus federer, maka dapat dihitung banyaknya pengulangan yang dapat dilakukan:

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

$$(r-1)(4-1) \geq 15$$

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

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq 18/3$$

$$r = 6$$

Berdasarkan rumus Federer, jumlah minimum pengulangan yang diperlukan adalah enam kali pada masing-masing kelompok perlakuan ekstrak buah naga merah konsentrasi 2%, 5%, 10%, dan 20%.

2. Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah sampling acak sederhana (simple random sampling), yaitu pengambilan sampel tanpa menggunakan kriteria khusus karena seluruh apusan dianggap homogen dan memiliki kesempatan yang sama untuk dijadikan sampel penelitian.

E. Definisi Operasional

TABEL 3.1 DEFINISI OPERASIONAL

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Pengukuran	Skala
Konsentrasi ekstrak buah naga merah	Ekstrak buah naga merah yang telah dihaluskan kemudian dilakukan maserasi selama 72 jam dalam pelarut etanol 70%.	2% 5% 10% 20%	Nominal
Hasil pengamatan mikroskopis sediaan sitologi	Hasil mikroskopis sediaan epitel mukosa mulut yang diwarnai dengan metode Papanicolaou menggunakan ekstrak buah naga merah.	Skor 1 (tidak baik) jika warna pada inti sel dan sitoplasma tidak jelas serta tidak dapat dibedakan. Skor 2 (kurang baik) jika warna pada inti sel dan sitoplasma kurang jelas tetapi masih dapat dibedakan. Skor 3 (baik) jika warna pada inti sel dan sitoplasma jelas dan dapat dibedakan.	Ordinal

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Mengajukan etik penelitian
- b. Mengajukan surat izin penelitian
- c. Persiapan alat dan bahan :
 - 1) Alat : Gelas kimia, gelas ukur, spatula, blender, kertas saring, neraca analitik, mikroskop, stopwatch, objek glass, botol kaca gelap, aluminium foil, dan stik es krim.

2) Buah naga merah, etanol 70%, tisu, air mengalir.

2. Tahap Pelaksanaan

Buah naga merah dipilih sebagai sumber pigmen alami karena mengandung senyawa betasianin yang berpotensi digunakan sebagai pewarna alami. Buah naga merah segar terlebih dahulu dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan buah. Selanjutnya, buah naga dikupas untuk memisahkan kulit dari daging buahnya. Daging buah naga merah kemudian ditimbang sebanyak 750 gram, dipotong menjadi bagian yang lebih kecil, lalu dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh bubur buah yang homogen. Bubur daging buah naga merah tersebut kemudian direndam dalam 1,5 liter etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:2. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi selama 72 jam di dalam wadah tertutup. Selama proses maserasi berlangsung, campuran diaduk secara manual setiap 24 jam untuk membantu proses difusi pelarut ke dalam sampel sehingga senyawa pigmen dapat terekstraksi secara optimal. Setelah proses perendaman selesai, campuran disaring menggunakan kain saring dan kertas saring untuk memperoleh filtrat yang jernih. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu kurang dari 50°C hingga sebagian besar pelarut menguap dan diperoleh ekstrak kental daging buah naga merah. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dipanaskan menggunakan waterbath dengan suhu 50°C selama satu

minggu untuk mengurangi sisa pelarut dan memperoleh ekstrak yang lebih kental. Setelah proses pemanasan selesai, ekstrak kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 2%, 5%, 10% dan 20% menggunakan etanol 70% sebagai pelarut pengencer.

a. Pengenceran ekstrak buah naga merah

Pengenceran ekstrak buah naga merah dilakukan dengan menggunakan rumus konsentrasi untuk memperoleh empat variasi konsentrasi perlakuan yang digunakan dalam penelitian.

Menggunakan rumus % b/v (berat/volume)

$$\% = \frac{\text{berat zat}}{\text{volume larutan}} \times 100$$

1. Pembuatan konsentrasi 2%

Ekstrak buah naga merah konsentrasi 2% dibuat dengan menimbang 1 gram ekstrak buah naga merah 100%, kemudian ditambahkan etanol 70% hingga volume mencapai 50 mL, lalu dihomogenkan.

2. Pembuatan konsentrasi 5%

Ekstrak buah naga merah konsentrasi 5% dibuat dengan menimbang 2,5 gram ekstrak buah naga merah 100%, kemudian ditambahkan etanol 70% hingga volume mencapai 50 mL, lalu dihomogenkan.

3. Pembuatan konsentrasi 10%

Ekstrak buah naga merah konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang 5 gram ekstrak buah naga merah 100%, kemudian ditambahkan etanol 70% hingga volume mencapai 50 mL, lalu dihomogenkan.

4. Pembuatan konsentrasi 20%

Ekstrak buah naga merah konsentrasi 20% dibuat dengan menimbang 10 gram ekstrak buah naga merah 100%, kemudian ditambahkan etanol 70% hingga volume mencapai 50 mL, lalu dihomogenkan.

b. Pembuatan sediaan sitologi

Sediaan sitologi pada penelitian ini dibuat dari sel epitel mukosa mulut yang diperoleh melalui teknik eksfoliatif. Sampel diambil dengan menggunakan stik es krim steril yang digosokkan secara perlahan pada permukaan mukosa bukal. Pengambilan dilakukan dengan gerakan satu arah sebanyak beberapa kali hingga terlihat sedikit kemerahan pada mukosa sebagai tanda bahwa sel-sel permukaan telah terangkat. Selanjutnya, hasil kerokan segera dipindahkan ke kaca objek dengan cara dioleskan merata sehingga membentuk apusan tipis. Penyusunan apusan dilakukan dengan satu arah gerakan untuk mencegah sel menumpuk dan agar distribusi sel pada kaca objek lebih homogen. Setelah apusan terbentuk, kaca objek langsung

difiksasi untuk mempertahankan bentuk dan struktur sel sebelum masuk ke tahap pewarnaan.

c. Pewarnaan Papanicolaou

Pewarnaan Papanicolaou menggunakan eosin dan ekstrak buah naga merah sebagai berikut:

a) Pewarnaan Papanicolaou menggunakan eosin

Tabel 3.2 Prosedur Pewarnaan Papanicolaou

Langkah	Reagen	Waktu
1	Alkohol 95%	1 menit
2	Alkohol 95%	10 celup
3	Aquadest	10 celup
4	Gill 2 Haematoxylin	1 menit
5	Aquadest	10 celup
6	Reagen bluing	1 menit
7	Aquadest	10 celup
8	Alkohol 95%	10 celup
9	OG-6	1 menit
10	Alkohol 95%	10 celup
11	Alkohol 95%	10 celup
12	EA-50	1 menit
13	Alkohol 95%	10 celup
14	Alkohol 95%	10 celup
15	Alkohol 100%	10 celup
16	Alkohol 100%	10 celup
17	Xylol	10 celup
18	Xylol	1 menit

(SOP Pewarnaan Papanicolaou RSUD Prof. W. Z. Johannes Kupang)

b) Pewarnaan Papanicolaou menggunakan ekstrak buah naga merah pengganti eosin

Tabel 3.3 Prosedur Pewarnaan Papanicolaou menggunakan ekstrak buah naga merah

Langkah	Reagen	Waktu
1	Alkohol 95%	1 menit
2	Alkohol 95%	10 celup
3	Aquadest	10 celup
4	Gill 2 Haematoxylin	1 menit

5	Aquadest	10 celup
6	Reagen bluing	1 menit
7	Aquadest	10 celup
8	Alkohol 95%	10 celup
9	OG-6	1 menit
10	Alkohol 95%	10 celup
11	Alkohol 95%	10 celup
12	Ekstrak buah naga merah	1 menit
13	Alkohol 95%	10 celup
14	Alkohol 95%	10 celup
15	Alkohol 100%	10 celup
16	Alkohol 100%	10 celup
17	Xylol	10 celup
18	Xylol	1 menit

d. Pembacaan hasil

Pembacaan hasil dilakukan melalui pengamatan mikroskopis pada sedikitnya 10 lapang pandang menggunakan perbesaran 40 $\times$. Evaluasi difokuskan pada sel-sel epitel yang tampak terpisah dengan jelas pada setiap preparat. Hasil pengamatan dan penilaian preparat selanjutnya divalidasi oleh dokter Spesialis Patologi Anatomi di RSUD Prof. Dr. W. Z. Yohannes Kupang.

G. Analisis Hasil

Data hasil pengamatan mikroskopis sediaan sel epitel mukosa mulut yang diwarnai dengan ekstrak buah naga merah konsentrasi 2%, 5%, 10%, dan 20% dianalisis secara deskriptif berdasarkan skor kejelasan pewarnaan inti dan sitoplasma sel pada beberapa lapang pandang. Selanjutnya, perbandingan kualitas hasil pewarnaan Papanicolaou antara ekstrak buah naga merah dan

eosin sebagai kontrol dianalisis menggunakan uji Kruskal–Wallis karena data berskala ordinal. Penentuan konsentrasi ekstrak buah naga merah terbaik dilakukan dengan membandingkan nilai skor pewarnaan masing-masing konsentrasi terhadap kontrol eosin, di mana konsentrasi dengan hasil paling mendekati kualitas eosin ditetapkan sebagai konsentrasi terbaik.