

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental*) dengan rancangan *post-test only control group design*. Pada penelitian ini, hasil pewarnaan *Diff-Quik* sediaan sitologi yang menggunakan ekstrak daun jati dibandingkan dengan hasil pewarnaan yang menggunakan Eosin standar dan Eosin dengan waktu pewarnaan 15 menit.

B. Waktu dan Tempat

1. Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari - Mei 2026.

2. Tempat

Penelitian ini dilakukan di dua lokasi, yaitu:

- a. Laboratorium Biosains Universitas Nusa Cendana Kupang, sebagai tempat proses pembuatan ekstrak daun jati.
- b. Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang, sebagai tempat pemeriksaan dan pewarnaan sediaan sitology menggunakan metode *Diff-Quik*.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) dengan variasi konsentrasi 15%, 20%, dan 25% yang digunakan pada pewarnaan *Diff Quik*.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis inti sel dan sitoplasma pada sediaan sitologi yang telah diwarnai menggunakan metode *Diff-Quik*.

D. Sampel

Sampel yang digunakan merupakan cairan sitologi 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 Khansa (2019), rumus Federer dapat dituliskan sebagai berikut:

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

Keterangan :

r = banyaknya pengulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$(r - 1) (5 - 1) \geq 15$$

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

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus Federer, diperoleh banyaknya pengulangan yang diperlukan adalah 5 kali.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak Daun Jati (<i>Tectona grandis</i>)	Larutan pewarna hasil ekstraksi daun jati muda yang mengandung pigmen (antosianin) dan digunakan sebagai pengganti Eosin pada pewarnaan <i>Diff-Quik</i> . Ekstrak dibuat dengan maserasi etanol 96% lalu diuapkan dan diencerkan ke konsentrasi 15%, 20%, dan 25%.	Menggunakan ekstrak pada langkah pewarnaan <i>Diff-Quik</i> sesuai konsentrasi yang ditetapkan; catat konsentrasi yang dipakai.	Konsentrasi yang digunakan: 15%, 20%, 25%,	Interval
Hasil Pewarnaan Sediaan Sitologi	Gambaran mikroskopis sediaan cairan pleura setelah pewarnaan <i>Diff-Quik</i> (menggunakan ekstrak daun jati atau Eosin) yang meliputi: intensitas warna sitoplasma, kejelasan inti, dan kontras morfologi sel.	Pengamatan mikroskopis pada 10 lapang pandang per sediaan, perbesaran 400×, beri skor berdasarkan kriteria.	Skor hasil pewarnaan persediaan a. Skor 1 (Tidak Baik): inti dan sitoplasma tidak terwarnai dengan jelas, sulit dibedakan. b. Skor 2 (kurang baik): inti dan sitoplasma terwarnai	Ordinal (Skor 1–3)

namun kurang
jelas, masih
dapat
dibedakan
c. Skor 3 (Baik):
inti dan
sitoplasma
terwarnai jelas
dan mudah
dibedakan

F. Prosedur Penelitian

1. Mengurus surat izin dan etik penelitian.

2. Pembuatan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*)

a. Alat

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

b. Bahan

Etanol, aquades, serbuk daun jati, dan ekstrak daun jati.

c. Prosedur Kerja

Daun jati muda dipotong kecil, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam. Daun yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk halus. Sebanyak 250 gram serbuk daun jati dimasukkan ke dalam toples kaca, lalu ditambahkan 2,5 liter etanol 96% dan diaduk hingga homogen. Proses maserasi dilakukan selama 3×24 jam sambil sesekali diaduk. Hasil rendaman kemudian disaring, dan filtrat diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak

kental. Ekstrak kental kemudian diencerkan menggunakan aquades untuk mendapatkan variasi konsentrasi 15%, 20%, dan 25%.

3. Pembuatan sediaan sitologi dan pewarnaan *Diff-Quik*.

a. Alat

tabung sentrifuge, pipet tetes, objek glass, cover glass, mikroskop, dan stopwatch.

b. Bahan

sampel cairan pleura, metanol, Eosin, methylen blue, aquades, entelan, dan ekstrak daun jati.

c. Prosedur Pembuatan Sediaan

Sediaan sitologi dibuat menggunakan metode oles (*smear*) menggunakan sampel cairan pleura (Khristian dan Inderiati, 2017). Proses pembuatan sediaan diawali dengan menuangkan spesimen ke dalam tabung sentrifus berukuran 15–50 mL sesuai dengan perkiraan jumlah sel berdasarkan tingkat kekeruhan spesimen. Tabung sentrifus kemudian diputar selama 10 menit pada kecepatan 1.800–2.500 rpm. Setelah proses sentrifugasi selesai, cairan supernatan yang berada pada bagian atas dibuang dan dikembalikan ke wadah spesimen asal. Pada spesimen dengan endapan yang tebal, supernatan disisakan sekitar 1/3 bagian dari sedimen, sedangkan pada sedimen yang sangat tipis, supernatan dibuang hingga tidak terdapat tetesan cairan selama kurang lebih 2–3 detik. Sedimen kemudian dihomogenkan kembali dengan cara mengetukkan

tabung atau menggunakan vortex hingga larutan tercampur merata. Selanjutnya, satu hingga dua tetes sedimen diteteskan pada sisi kaca objek sekitar 2 cm dari tepi luar kaca. Pembuatan sediaan dilakukan menggunakan metode *pull-apart* (tarik dan dorong) hingga sedimen tersebar merata pada permukaan kaca objek atau menggunakan metode *sliding smear*, yaitu dengan menekan tetesan spesimen menggunakan kaca objek lain, kemudian kedua kaca disejajarkan dan ditarik perlahan ke arah yang berlawanan.

d. Pewarnaan *Diff-Quik*.

Pewarnaan *Diff-Quik* menggunakan Eosin dan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) sebagai berikut :

a. Pewarnaan *Diff-Quik* menggunakan Eosin standar.

Tabel 3.2 pewarnaan *Diff-Quik* menggunakan Eosin standar

No	Nama reagen	waktu
1.	Metanol	10 celup
2	Eosin	10 celup
3	Methylen blue	10 celup

b. Pewarnaan *Diff-Quick* menggunakan Eosin dengan waktu 15 menit.

Tabel 3.3 pewarnaan *Diff-Quik* menggunakan Eosin 15 menit

No	Nama reagen	waktu
1.	Metanol	10 celup
2	Eosin	15 menit
3	Methylen blue	10 celup

c. Pewarnaan *Diff-Quik* menggunakan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) pengganti Eosin.

Tabel 3.2 pewarnaan *Diff-Quik* menggunakan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) pengganti Eosin.

No	Nama reagen	waktu
1	Metanol	10 celup
2	Ekstrak daun jati (<i>Tectona grandis</i>)	15 menit
3	Methylen blue	10 celup

e. Mounting

Setelah melalui proses pewarnaan, diakhiri dengan penutupan jaringan menggunakan kaca penutup dan diberi bahan perekat Entelan.

f. Pengamatan Mikroskop

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada 10 lapang pandang tiap sediaan. Hasil pewarnaan dinilai berdasarkan kejelasan inti sel, warna sitoplasma, serta kontras antara keduanya.

G. Analisis Hasil

Penilaian kualitas hasil pewarnaan dilakukan menggunakan tiga kriteria

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

Penilaian kualitas hasil pewarnaan dilakukan melalui pengamatan mikroskopis oleh dokter spesialis Patologi Anatomi (PA).

Berdasarkan hasil penilaian tersebut, data yang diperoleh dianalisis secara statistik. Analisis data dilakukan menggunakan uji *Kruskal–Wallis* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan *Diff-Quik* antar kelompok perlakuan. Hasil uji menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna, maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *Mann–Whitney* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan signifikan.