

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah penelitian *true eksperimental* dengan desain *post-test only control group design*. Sediaan sitologi dengan Pewarnaan Giemsa modifikasi, yaitu menggunakan ekstrak bunga kembang sepatu pada proses *staining*, dibandingkan dengan menggunakan eosin.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Nusa Cendana Kupang untuk pembuatan ekstrak bunga kembang sepatu dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang untuk melakukan pewarnaan modifikasi Giemsa.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-April 2024

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*Independent variabel*)

Dalam hal ini yang menjadi variabel bebas adalah ekstrak etanol bunga kembang sepatu dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, dan 70%.

2. Variabel terikat (*Dependent variabel*)

Dalam hal ini yang menjadi variabel terikat yaitu gambaran hasil mikroskopis sediaan sitologi mukosa mulut dengan Pewarnaan Giemsa.

D. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak bunga kembang sepatu. Bunga kembang sepatu yang digunakan adalah bunga yang berwarna merah yang telah mekar dan diambil bagian kelopaknya. Bunga kembang sepatu diambil pada daerah Liliba, RW 010; RT 016. Ekstrak dibuat menjadi konsentrasi 100%, 90%, 80%, dan 70%

Penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini digunakan rumus Federer 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 dapat dilakukan yaitu :

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

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

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

$$3r-3 \geq 15 + 3$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 18/3$$

$$r \geq 6$$

Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer di atas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah 6 kali.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Oprasional	Skor Pengukuran	Skala
Ekstrak Bunga Kembang Sepatu (EBKS)	Ekstrak Bunga Kembang Sepatu Berwarna merah yang telah di keringkan. Dilakukan maserasi selama 72 jam dalam pelarut etanol 96% dan telah diuapkan menggunakan evaporator. Kemudian larutkan ekstrak dengan etanol 96% untuk membuat ekstrak bunga kembang sepatu dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, dan 70%		
Gambaran Hasil Mikroskopis Sediaan Sitologi Epitel Mukosa Mulut dengan Pewarnaan Giemsa Modifikasi	Hasil pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop terhadap sediaan sitologi sel epitel mukosa mulut.	(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 pada inti sel dan sitoplasma jelas dan dapat dibedakan.	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 50 ml, gelas ukur 10 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.
 - 2) Bahan : Eosin, methylene blue, methanol absolut, glyserin, ekstrak bunga kembang sepatu, etanol 96%, tisu , air mengalir.

2. Tahapan Penelitian

- a. Pembuatan ekstrak bunga kembang sepatu

Bunga kembang sepatu dipisahkan dari tangkai bunga dan diambil bagian kelopak bunganya. Kemudian dikeringkan, setelah itu kelopak bunga kering diblender hingga halus. Kemudian serbuk bunga kembang sepatu ditimbang sebanyak 350 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples kaca, ditambahkan 3,5 liter pelarut etanol 96%, dihomogenkan. Kemudian perendaman dilakukan selama 3 hari (72 jam). Setelah 3 hari dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan maseratnya (endapan). Bunga kembang sepatu yang sudah diekstraksi dengan maserasi tersebut kemudian dilanjutkan ke alat evaporator hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental. Ekstrak kental (*crude ekstrak*) diasumsikan sebagai ekstrak bunga kembang sepatu dari konsentrasi 100%. Selanjutnya

membuat ekstrak bunga kembang sepatu 90%, 80%, dan 70% menggunakan etanol 96%.

b. Pengenceran ekstrak bunga kembang sepatu

a.) Pembuatan konsentrasi 90%

45 gr ekstrak bunga kembang sepatu ditambahkan dengan etanol 96% *ad* 50 ml.

b.) Pembuatan konsentrasi 80%

40 gr ekstrak bunga kembang sepatu ditambahkan dengan etanol 96% *ad* 50 ml.

c.) Pembuatan konsentrasi 70%

35 gr ekstrak bunga kembang sepatu ditambahkan dengan etanol 96% *ad* 50 ml.

c. Pembuatan komposisi Giemsa

Methylen Blue : 2,05 gr

Eosin : 1,05 gr

Methanol Absolut : 25 ml

Glyserin : 25 ml

Pada komposisi Giemsa sebagai kontrol, semua komposisi dihomogenkan.

d. Pembuatan komposisi Giemsa modifikasi

Eosin dalam pewarnaan Giemsa digantikan dengan ekstrak bunga kembang sepatu dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, dan 70%

- Pembuatan komposisi Giemsa modifikasi 100%

Methylen Blue : 2,05 gr

EBKS 100% (*crude ekstrak*): 1,05 gr

Methanol Absolut : 25 ml

Glyserin : 25 ml

- Pembuatan komposisi Giemsa modifikasi 90%

Methylen Blue : 2,05 gr

EBKS 90% : 1,05 gr

Methanol Absolut : 25 ml

Glyserin : 25 ml

- Pembuatan komposisi Giemsa modifikasi 80%

Methylen Blue : 2,05 gr

EBKS 80% : 1,05 gr

Methanol Absolut : 25 ml

Glyserin : 25 ml

- Pembuatan komposisi Giemsa modifikasi 70%

Methylen Blue : 2,05 gr

EBKS 70% : 1,05 gr

Methanol Absolut : 25 ml

Glyserin : 25 ml

Pada komposisi Giemsa sebagai perlakuan, eosin diganti menggunakan EBKS dengan masing-masing konsentrasi 100%, 90%, 80%, dan 70% kemudian semua komposisi dihomogenkan.

e. Pembuatan sediaan sitologi

Pembuatan preparat sel mengikuti metode pada penelitian Mandasari dan Nisa (2019) dengan modifikasi. Sampel sel epitel untuk sediaan diambil dari bagian mulut dari daerah mukosa bukal menggunakan stik es krim.

Pengerokan dilakukan dalam satu arah sampai terlihat kemerahan di daerah bukal. Selanjutnya hasil kerokan dioleskan pada objek glass.

f. Pewarnaan Giemsa

1. Pewarnaan Giemsa (kontrol)

Pada preparat kontrol sediaan yang benar-benar kering difiksasi dengan methanol selama 5 menit, angkat dan biarkan kering di udara. Kemudian digenangi larutan Giemsa selama 30 menit, angkat, dan cuci dengan air mengalir.

2. Pewarnaan Giemsa Modifikasi (EBKS 100%, 90%, 80%, dan 70%)

Preparat sediaan ekstrak bunga kembang sepatu, difiksasi dengan methanol selama 5 menit. Selanjutnya digenangi dengan pewarna modifikasi Giemsa pada masing-masing konsentrasi selama 45 menit. Preparat dibilas dengan air mengalir.

g. Pembacaan hasil

Pembacaan hasil dilakukan dengan pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop kamera konektor tipe Cx-31

Trinocular. Pengamatan dilakukan pada sel-sel epitel yang terpisah dengan perbesaran 400X pada tiap-tiap preparat.

G. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat ada tidaknya perbedaan hasil mikroskopis Pewarnaan Giemsa antar kelompok. Selanjutnya, untuk mengetahui kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji *Man Whitney U*.

Hasil pengamatan secara mikroskopis dinilai berdasarkan skor pengukuran. (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 pada inti sel dan sitoplasma jelas dan dapat dibedakan.

H. Jadwal Pelaksanaan Penelitian

Table 3.2 Jadwal pelaksanaan penelitian

No.	Kegiatan	Agust	Sept	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei
1	Pengajuan Judul										
2	Penyusunan Proposal										
3	Seminar Proposal										
4	Pengurusan Surat Izin dan Kode Etik										
5	Pelaksanaan Penelitian										
6	Pengolahan Hasil dan Analisis Data										
7	Seminar Hasil										

I. Rincian Biaya

Tabel 3.3. Rincian biaya

No.	Pengeluaran	Biaya
1	Gliserin	Rp. 130.000
2	Methylene Blue	Rp. 119.000
3	Eosin	Rp. 104.000
4	Etanol 96%	Rp. 85.000
5	Methanol Absolut	Rp. 250.000
6	Laboratorium Patologi Anatomi	Rp. 480.000
7	Evaporasi	Rp. 300.000
8	Stik Es Krim	Rp. 2.500
9	Toples Kaca	Rp. 58.000
10	Aluminium Foil	Rp. 23.000
Total		Rp. 1.551.500