

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian yang bersifat eksperimen yaitu dilakukan variasi waktu pada waktu pewarnaan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui suatu gejala yang timbul sebagai akibat perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen. Sampel cairan pleura diamati dengan menggunakan tiga perlakuan yaitu berdasarkan waktu SOP pada pewarnaan Hariss-Hematoxylin (7 menit), Orange-G (5 menit), dan Eosin Alkohol (5 menit) dengan variasi waktu Hariss-Hematoxylin (5 menit), Orange-G (3 menit), Eosin Alkohol (3 menit) dan Hariss-Hematoxylin (3 menit), Orange-G (3 menit), Eosin Alkohol (3 menit) menggunakan pewarnaan Papanicolaou.

Reagen pewarnaan yang akan digunakan pada melakukan penelitian ini adalah reagen pewarnaan yang baru pada melakukan pewarnaan Papanicolaou. Adanya perbedaan-perbedaan kualitas pewarnaan apusan sitologi pleura dengan berdasarkan sesuai waktu SOP pada pewarnaan Hariss-Hematoxylin (7 menit), Orange-G (5 menit), dan Eosin Alkohol (5 menit) dengan variasi waktu Hariss-Hematoxylin (5 menit), Orange-G (3 menit), Eosin Alkohol (3 menit) dan Hariss-Hematoxylin (3 menit), Orange-G (3 menit), Eosin Alkohol (3 menit) metode pewarnaan Papanicolaou dianalisa dengan menggunakan uji Normalitas dan dilanjutkan dengan uji *Kruskall Wallis Test* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2024.

C. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh cairan efusi pleura yang masuk ke Instalasi Laboratorium Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung, pada bulan Februari-Maret 2024. Total sampel yang dilakukan penelitian dihitung menggunakan rumus Federer (1977), sebagai berikut:

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = banyaknya pengulangan

15 = nilai derajat kebebasan

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

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

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 15+2$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq \frac{17}{2}$$

$$2$$

$$n \geq 8,5$$

Minimal Sampel yang digunakan yaitu 9 sampel, pada penelitian ini digunakan 9 sampel pada setiap perlakuan dengan total 27 sediaan. Sampel penelitian adalah total sampel cairan efusi pleura yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi

1. Volume cairan minimal 20cc.
2. Cairan agak keruh (dapat membentuk endapan ketika disentrifuge).

b. Kriteria eksklusi

1. Cairan kemerahan yang mengandung banyak darah.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel Dan Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas Waktu Pewarnaan	Preparat cairan pleura yang dibuat dengan cara apusan pada kaca objek dengan pewarnaan Papanicolaou menggunakan waktu sesuai SOP pada pewarnaan Hariss-Hematoxylin (7 menit), Orange-G (5 menit), dan Eosin Alkohol (5 menit) dengan variasi waktu Hariss-Hematoxylin (5 menit), Orange-G (3 menit), dan Eosin Alkohol (3 menit) dan Hariss-Hematoxylin (3 menit), Orange-G (3 menit), dan Eosin Alkohol (3 menit) pada pewarnaan Papanicolaou.	Mikroskop dan observasi	Stopwatch	SOP - Hariss-Hematoxylin (7 menit), - Orange-G (5 menit), - Eosin Alkohol (5 menit) Variasi Waktu - Hariss-Hematoxylin (5 menit), - Orange-G (3 menit), - Eosin Alkohol (3 menit) dan - Hariss-Hematoxylin (3 menit), - Orange-G (3 menit), - Eosin Alkohol (3 menit)	Ordinal
Variabel Terikat Kualitas sediaan sitologi pleura berdasarkan:	Pemenuhan persyaratan kualitas pewarnaan sitologi meliputi:	Mikroskop dan observasi	Thakur & Guttikonda 2017	1. Tidak baik 2. Baik	Nominal
1. Latar belakang	Keadaan latar belakang bersih/jernih tidak adanya artefak setelah dilakukan pengecatan.		Thakur & Guttikonda 2017	1. Tidak baik 2. Baik	Nominal
2. Penampilan Morfologi Sel	Keadaan morfologi sel pada sediaan yang telah diwarnai untuk menyerap zat-zat warna pada pewarnaan Papanicolaou.		Thakur & Guttikonda 2017	1. Tidak baik 2. Baik	Nominal
3. Karakteristik Inti Sel	Inti sel akan terwarnai oleh Hematoxylin dan akan memberikan warna biru atau ungu.		Thakur & Guttikonda 2017	1. Tidak baik 2. Baik	Nominal
4. Hasil akhir pewarnaan secara keseluruhan.	Keadaan hasil akhir pewarnaan sediaan yang telah diwarnai tampak pewarnaan menyebar secara merata dan setiap sel terwarnai dengan baik.		Thakur & Guttikonda 2017	1. Tidak baik 2. Baik	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Sentrifuse, handscoon, tabung reaksi sentrifuge, rak pengecatan, pinset, wadah pewarnaan, spuit 25cc, kaca objek, cover glass, stopwatch, pipet.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Sampel cairan pleura, cat Papanicolaou.

3. Cara Kerja Prosesing Preparat

a. Persiapan sampel sitologi apusan:

- 1) Bahan cairan pleura yang diambil dilakukan sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1.800 rpm sehingga tampak endapan dengan cairan yang jernih
- 2) Supernatan dari cairan pleura secara hati-hati dibuang
- 3) Endapannya dipisahkan dengan menggunakan pipet
- 4) Buat apusan dengan menggunakan salah satu kaca objek yang lain.

b. Prosedur Pewarnaan Papanicolaou

Tabel 3.2 Prosedur Pewarnaan Papanicolaou

No	Keterangan	Waktu
1.	Sample slide difiksasi dengan alkohol 96%	30 menit
2.	Setelah difiksasi angkat dan dimulai Pewarnaan Papanicolaou	
3.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
4.	Rendam dalam aquadest	1 menit
5.	Masukkan ke dalam larutan Harris Hematoksilin	7 menit
6.	Rendam/bilas dengan air mengalir	1 menit
7.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
8.	Masukkan ke dalam Orange-G (OG6)	5 menit
9.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
10.	Masukkan ke dalam Eosin Alkohol 70% (EA-50)	5 menit
11.	Masukkan ke dalam alkohol 96%	1 menit
12.	Masukkan ke dalam alkohol 96%	1 menit
13.	Masukkan ke dalam alkohol absolut	1 menit
14.	Masukkan ke dalam alkohol absolut	1 menit
15.	Masukkan ke dalam Xylol I	5 menit
16.	Masukkan ke dalam Xylol II	5 menit
17.	Keringkan sample, tetesi dengan entelan (mounting) secukupnya tutup dengan cover glass.	
18.	Slide siap dibaca oleh dokter spesialis patologi anatomi.	3 menit

Sumber : Berdasarkan SOP Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung (2019).

c. Prosedur Pewarnaan Papanicolaou Dengan Variasi Waktu

Tabel 3.3 Prosedur Pewarnaan Papanicolaou Dengan Variasi Waktu Pada Pewarnaan Harris-Hematoxylin 5 Menit, Orange-G 3 Menit, Dan Eosin Alkohol 3 Menit

No	Keterangan	Waktu
1.	Sample slide difiksasi dengan alkohol 96%	30 menit
2.	Setelah difiksasi angkat dan dimulai Pewarnaan Papanicolaou	
3.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
4.	Rendam dalam aquadest	1 menit
5.	Masukkan ke dalam larutan Harris Hematoksilin	5 menit
6.	Rendam/bilas dengan air mengalir	1 menit
7.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
8.	Masukkan ke dalam Orange-G (OG6)	3 menit
9.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
10.	Masukkan ke dalam Eosin Alkohol 70% (EA-50)	3 menit
11.	Masukkan ke dalam alkohol 96%	1 menit
12.	Masukkan ke dalam alkohol 96%	1 menit
13.	Masukkan ke dalam alkohol absolut	1 menit
14.	Masukkan ke dalam alkohol absolut	1 menit
15.	Masukkan ke dalam Xylol I	5 menit
16.	Masukkan ke dalam Xylol II	5 menit
17.	Keringkan sample, tetesi dengan entelan (mounting) secukupnya tutup dengan cover glass.	
18.	Slide siap dibaca oleh dokter spesialis patologi anatomi.	3 menit

Tabel 3.4 Prosedur Pewarnaan Papanicolaou Dengan Variasi Waktu Pada Pewarnaan Harris-Hematoxylin 3 Menit, Orange-G 3 Menit, Dan Eosin Alkohol 3 Menit

No	Keterangan	Waktu
1.	Sample slide difiksasi dengan alkohol 96%	30 menit
2.	Setelah difiksasi angkat dan dimulai Pewarnaan Papanicolaou	
3.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
4.	Rendam dalam aquadest	1 menit
5.	Masukkan ke dalam larutan Harris Hematoksilin	3 menit
6.	Rendam/bilas dengan air mengalir	1 menit
7.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
8.	Masukkan ke dalam Orange-G (OG6)	3 menit
9.	Masukkan ke dalam alkohol 70%	1 menit
10.	Masukkan ke dalam Eosin Alkohol 70% (EA-50)	3 menit
11.	Masukkan ke dalam alkohol 96%	1 menit
12.	Masukkan ke dalam alkohol 96%	1 menit
13.	Masukkan ke dalam alkohol absolut	1 menit
14.	Masukkan ke dalam alkohol absolut	1 menit
15.	Masukkan ke dalam Xylol I	5 menit
16.	Masukkan ke dalam Xylol II	5 menit
17.	Keringkan sample, tetesi dengan entelan (mounting) secukupnya tutup dengan cover glass.	
18.	Slide siap dibaca oleh dokter spesialis patologi anatomi.	3 menit

d. Penilaian Kualitas Pewarnaan

Penilaian kualitas pada pewarnaan apus sitologi pada pewarnaan Papanicolaou nantinya akan dinilai oleh dokter spesialis Patologi Anatomi berdasarkan dengan penilai skoring.

Tabel 3.5 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan Sitologi Pada Pewarnaan Papanicolaou

No	Parameter Penilaian	Deskripsi	Skor
1.	Latar Belakang		
	a. Hemoragic (Tidak Baik)	Latar belakang terlihat perdarahan	1
	b. Clean/Bersih (Baik)	Latar belakang transparan/bersih, tidak terlihat perdarahan, tidak tampak artefak	2
2.	Penampilan Morfologi Sel		
	a. Tidak Baik	Bentuk sel tidak jelas, intensitas warna sitoplasma tidak jelas	1
	b. Baik	Bentuk sel sangat jelas, intensitas warna sitoplasma sangat jelas	2
3.	Karakteristik Inti Sel		
	a. Inti Sel Tidak Jelas (Tidak Baik)	Intensitas warna pada inti sel kurang/tidak jelas, Nucleolus atau kromatin kurang/tidak jelas, membrane inti sel tidak jelas	1
	b. Inti Sel Jelas (Baik)	Intensitas warna pada inti sel jelas, Nucleolus atau kromatin jelas, membrane inti sel jelas	2
4.	Hasil Akhir Pewarnaan		
	a. Tidak Baik	Intensitas pewarna keseluruhan tidak baik, ada bagian yang tidak terwarnai, pewarnaan tidak rata/homogen	1
	b. Baik	Intensitas pewarna keseluruhan baik, pewarnaan merata, keseluruhan sediaan terwarnai dengan baik.	2

Sumber : (Thakur *et al.*, 2017).

F. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari hasil penilaian dokter spesialis Patologi Anatomi. Adanya perbedaan-perbedaan kualitas pewarnaan apusan sitologi pleura pada pewarnaan Papanicolaou dianalisa dengan menggunakan uji Normalitas kemudian dilanjutkan dengan *Kruskal Wallis Tests* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

Proses pengolahan data dilakukan dengan data terkumpul berdasarkan hasil pengamatan melalui tahap-tahap sebagai berikut:

- a. *Coding* yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan ke computer (data entry)
- b. *Entry Data* yaitu memasukkan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi/program computer, misalnya program SPSS
- c. *Skoring* yaitu pemberian skor terhadap variable yang diperiksa agar mendapatkan nilai yang signifikan.

G. Analisis Data

Data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian dokter spesialis Patologi Anatomi, ditotal secara keseluruhan kemudian dihitung rata-rata skoring. Nilai skor yang diberikan pada 4 parameter yaitu : 1-2 dengan total skor dikatakan baik apabila mencapai skor 80%, yaitu 4-6 kategori tidak baik dan 7-8 kategori baik (Thakur *et al.*, 2017).

Adanya perbedaan kualitas pewarnaan apusan sitologi pleura pada pewarnaan sesuai waktu SOP dengan pewarnaan Hariss-Hematoxylin (7 menit), Orange-G (5 menit), dan Eosin Alkohol (5 menit) dengan variasi waktu Hariss-Hematoxylin (5 menit), Orange-G (3 menit), Eosin Alkohol (3 menit) dan Hariss-Hematoxylin (3 menit), Orange-G (3 menit), Eosin Alkohol (3 menit) menggunakan metode pewarnaan Papanicolaou, dianalisis dengan uji Normalitas lalu dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis Tests*.

H. Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)

Penelitian ini dilakukan setelah didapatkan surat persetujuan ethical clearance dari komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, dengan nomor penelitian No.008/KEPK-TJK/I/2024 pada tanggal 10 Januari 2024. Limbah cairan pleura dari hasil sisa proses penelitian dilakukan sesuai SOP Instalasi Pengolahan Air Limbah, cara penanganan limbah cair yang tepat akan menghindari tercemarnya lingkungan sekitarnya.