

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Metodologi Penelitian**

Penelitian ini menggunakan pendekatan kualitatif dengan metode deskriptif. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis secara mendalam pengaruh variasi pH buffer 6,4; 6,8; 7,2 (pH standar); 7,6; dan 8,0 terhadap hasil pewarnaan *Plasmodium vivax* pada sediaan darah tipis. Data diperoleh melalui observasi mikroskopis dan dokumentasi visual (foto mikroskopis) untuk mendeskripsikan kualitas pewarnaan pada setiap variasi buffer.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Lokasi penelitian ini dilakukan di wilayah kerja UPTD Puskesmas Maja, Kecamatan Marga Punduh, Kabupaten Pesawaran dan waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Mei tahun 2025.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah masyarakat di Kecamatan Marga Punduh pada wilayah kerja UPTD Puskesmas Maja, Kabupaten Pesawaran Lampung.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu pasien yang terkonfirmasi positif *Plasmodium vivax* stadium trophozoit berdasarkan hasil pemeriksaan Rapid Diagnostic Test (RDT). Stadium trophozoit dipilih karena pada tahap ini morfologi parasit seperti inti, sitoplasma, dan titik Schuffner masih dapat diamati dengan jelas di bawah mikroskop, sehingga sesuai dengan parameter yang diteliti dalam penelitian ini.

## D. Variabel dan Definisi Operasional

**Tabel 3.1.** Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
<b>Independent</b>					
pH buffer Giemsa	Kandungan larutan buffer yang dibuat dalam beberapa variasi pH yaitu 6,4; 6,8; 7,2 (pH standar); 7,6; dan 8,0	Pengukuran tingkat keasaman larutan buffer	pH meter	Nilai pH larutan buffer Giemsa 6,4; 6,8; 7,2 (pH standar); 7,6; dan 8,0	Ordinal
<b>Dependent</b>					
Hasil Pewarnaan	Kualitas pewarnaan <i>Plasmodium vivax</i> (stadium Trophozoit) pada sediaan darah tipis.	Pengamatan Mikroskopis terhadap sediaan darah.	Mikroskop (perbesaran 1000x, minyak imersi)	Kategori pewarnaan: Baik, Cukup, Buruk (berdasarkan parameter inti, sitoplasma, titik Schuffner, sel eritrosit, dan sel leukosit)	Ordinal
Inti	Warna inti <i>Plasmodium vivax</i> setelah pewarnaan	Pengamatan Mikroskopis	Mikroskop	Merah = baik, kurang merah = cukup, tidak merah = buruk	Ordinal
Sitoplasma	Warna sitoplasma <i>Plasmodium vivax</i> setelah pewarnaan	Pengamatan Mikroskopis	Mikroskop	Biru = baik, kurang biru = cukup, tidak biru = buruk	Ordinal
Titik Schuffner	Kejelasan titik Schuffner pada sel eritrosit yang terinfeksi	Pengamatan Mikroskopis	Mikroskop	Jelas = baik, kurang jelas = cukup, tidak jelas = buruk	Ordinal
Sel Eritrosit	Warna sel eritrosit yang tidak terinfeksi setelah pewarnaan	Pengamatan Mikroskopis	Mikroskop	Kontras dan merah muda = baik, Kurang (kontras dan merah muda) = cukup, Tidak (kontras dan merah muda) = buruk	Ordinal
Sel Leukosit	Warna sel leukosit setelah pewarnaan	Pengamatan Mikroskopis	Mikroskop	Jelas dan ungu (baik), Kurang (jelas dan ungu) = cukup, Tidak (jelas dan ungu) = buruk (WHO, 2016)	Ordinal

## E. Pengumpulan data

1. Pengajuan surat izin permohonan penelitian dari Politeknik Kesehatan Tanjung Karang yang ditujukan kepada pihak UPTD Puskesmas Maja Kabupaten Pesawaran sebagai tempat penelitian. Setelah mendapat surat persetujuan dari Politeknik Kesehatan Tanjungkarang peneliti menyerahkan surat tersebut ke UPTD Puskesmas Maja (*lampiran 1*).
2. Setelah mendapat persetujuan dari tempat yang diadakan penelitian dilakukan kalibrasi pH meter terlebih dahulu di Balai Standarisasi dan

Pelayanan Jasa Industri (BSPJI) Bandar Lampung untuk memastikan keakuratan pembacaan nilai pH sebelum digunakan dalam proses penelitian. Bukti kalibrasi pH meter dari BSPJI Bandar Lampung dapat dilihat di (*lampiran 2*).

3. Peneliti melakukan pemeriksaan RDT malaria pada pasien dengan gejala demam dan menggigil, dan hasil menunjukkan garis pada area kontrol dan P.v, menandakan positif *Plasmodium vivax*. Setelah pasien menyetujui lembar Penjelasan Sebelum Persetujuan (Form PSP) dan *Informed Consent* (*Lampiran 3 dan 4*), dilakukan pengambilan darah vena sebanyak 1-2 mL ke dalam tabung EDTA 3 mL. Pembuatan sediaan darah dilakukan kurang dari satu jam setelah pengambilan untuk menjaga integritas morfologi, sesuai pedoman WHO (2015) yang merekomendasikan pembuatan sediaan segera terutama bila menggunakan antikoagulan.
4. Pembuatan sediaan darah sebanyak 5 sediaan darah tebal dan tipis di atas kaca objek lalu dikeringkan selama 1 jam pada suhu ruang hingga benar-benar kering. Setelah sediaan kering, dilakukan fiksasi pada bagian sediaan darah tipis dengan methanol absolut 96% kemudian dikeringkan lagi selama 5 menit. Setelah itu diberi kode pada bagian *end-frosted* menggunakan pensil pada sediaan darah dengan tulisan pH 6,4 untuk sediaan darah pertama, pH 6,8 untuk sediaan darah kedua, pH 7,2 untuk sediaan darah ketiga, pH 7,6 untuk sediaan darah keempat, dan pH 8,0 untuk sediaan darah kelima.
5. Sebelum digunakan, alat pH meter inScienPro XPT-11 dilakukan pengecekan antara untuk memastikan kondisi elektroda tetap baik, mengingat kalibrasi terakhir dilakukan di BSPJI Bandar Lampung pada 11 April 2025. Pengecekan dilakukan sesuai panduan Modul B.4 Sanitarian Kit (*Lampiran 5*), yaitu dengan merendam elektroda ke dalam larutan buffer standar pH 7,0, mengaduk perlahan, dan menunggu angka stabil sebelum disesuaikan menggunakan trimmer pada suhu 25°C. Modul tersebut menyatakan bahwa kalibrasi cukup dilakukan setiap dua minggu atau setelah 10 kali penggunaan. Namun, pengecekan antara ini tetap dilakukan sebagai langkah kehati-hatian untuk mendeteksi potensi

kerusakan elektroda seperti goresan atau penurunan sensitivitas, sehingga alat tetap valid dan akurat saat digunakan pada tanggal 2 Mei 2025.

6. Pembuatan variasi pH buffer yaitu pH 6,4; 6,8; 7,2 (pH standar); 7,6; dan 8,0 sebagai larutan pengencer Giemsa. Reagen yang dipakai dalam penelitian ini adalah larutan pengencer Giemsa yang pH-nya sudah diketahui yaitu buffer pH 7,2. Lalu, digunakan juga larutan Asam Klorida (HCl) 1N untuk menurunkan pH serta larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 1N untuk menaikkan pH.
7. Langkah selanjutnya, ukur ulang buffer pH 7,2 dengan pH meter yang sudah terkalibrasi dan didapatkan UUT (*Unit Under Test*) nya yaitu di pH 7,2. Setelah itu buat stok larutan pH untuk tiap variasi pH yang akan dibuat di wadah cup yang berbeda dan sudah diberi label. Wadah yang berlabel pH 6,4 untuk pembuatan larutan pengencer Giemsa pH 6,4 dari stok buffer pH 7,2 dipipet dengan pipet ukur sebanyak 6 mL. Lalu atur pH menjadi 6,4 dengan penambahan larutan asam (HCl 0,1 N) sedikit demi sedikit dengan mikropipet 100 uL sambil diukur pH dengan alat pH meter. Jika terlalu asam maka ditambah dengan larutan basa (NaOH 0,1 N) hingga mencapai pH yang diinginkan. Perlakuan sama untuk pembuatan larutan pengencer Giemsa pH 6,8.
8. Wadah yang berlabel pH 7,6 untuk pembuatan larutan pengencer Giemsa pH 7,6 dari stok buffer pH 7,2 dipipet dengan pipet ukur sebanyak 6 mL. Lalu atur pH menjadi 7,6 dengan penambahan larutan basa (NaOH 0,1 N) sedikit demi sedikit dengan mikropipet 100 uL sambil diukur pH dengan alat pH meter. Jika terlalu basa maka ditambah dengan larutan asam (HCl 0,1 N) hingga mencapai pH yang diinginkan. Perlakuan sama untuk pembuatan larutan pengencer Giemsa pH 8,0. Stok larutan pengencer Giemsa sudah siap dicampurkan dengan Giemsa stok.
9. Uji kualitas reagen Giemsa stok dilakukan sebelum proses pencampuran dengan larutan pengencer. Prosedur ini dilakukan dengan menempatkan 1-2 tetes Giemsa stok secara vertikal pada permukaan kertas Whatman, kemudian ditambahkan 2-4 tetes methanol absolut pada bagian tengah tetesan Giemsa dalam posisi tegak lurus. Giemsa berkualitas baik ditandai

dengan terbentuknya pola warna konsentris, yakni lingkaran tengah berwarna biru, dikelilingi oleh cincin ungu, serta cincin tipis berwarna merah di bagian tepi luar.

10. Larutan pengencer Giemsa yang sudah dibuat sebelumnya, diambil sebanyak 5.820 uL ke wadah baru yang telah diberi label sama sesuai dengan masing-masing pH yang sudah dibuat. Lalu ditambahkan 180 uL Giemsa stok di tiap wadah tersebut dan homogenkan maka dengan perhitungan tersebut didapatkan larutan Giemsa dengan konsentrasi 3%. Larutan Giemsa harus digunakan dalam waktu maksimal 1 jam setelah pencampuran, dan tidak boleh disimpan untuk digunakan kembali.
11. Selanjutnya dilakukan pewarnaan sediaan malaria. Larutan Giemsa dengan pH 6,4 ditetesi pada sediaan darah yang berlabel pH 6,4. Begitu juga pada sediaan darah yang berlabel 6,8; 7,2; 7,6; dan 8,0. Atur waktu pewarnaan selama 45 menit menggunakan timer. Setelah itu dibilas sediaan dengan aquades dan dikeringkan. Sediaan yang sudah kering langsung dapat disimpan.
12. Pengamatan Mikroskopis:  
Sediaan yang telah diwarnai diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran tinggi (1000x dengan minyak imersi). Lakukan pemeriksaan di seluruh lapangan pandang sediaan tipis untuk menemukan *Plasmodium vivax* stadium trophozoit.  
Dokumentasi Data:
  - a. Hasil pengamatan dicatat dalam bentuk tabel 4.1 untuk mempermudah perbandingan kualitas pewarnaan pada tiap pH buffer.
  - b. Dokumentasi foto mikroskopis diambil menggunakan kamera.

## **F. Pengolahan dan analisis data**

### **1. Pengolahan Data**

Data diperoleh dari observasi mikroskopis terhadap sediaan darah tipis yang telah diwarnai dengan Giemsa menggunakan variasi pH buffer 6,4; 6,8; 7,2 (pH standar); 7,6; dan 8,0. Hasil pewarnaan dikategorikan berdasarkan parameter berikut:

**Tabel 3.2.** Kategori hasil pewarnaan

Parameter Pewarnaan	Kategori Baik	Kategori Cukup	Kategori Buruk
Inti	Merah	Kurang merah	Tidak Merah
Sitoplasma	Biru	Kurang Biru	Tidak Biru
Titik Schuffner	Jelas	Kurang Jelas	Tidak Jelas
Sel eritrosit	Kontras dan merah muda	Kurang (Kontras dan merah muda)	Tidak (Kontras dan merah muda)
Sel leukosit	Jelas dan ungu	Kurang (Jelas dan ungu)	Tidak (Jelas dan ungu)

Sumber: MM-SOP-03C, *Quality Control of Giemsa Stock Solution and Buffered Water*, WHO, 2016 (*Lampiran 6*).

Untuk parameter sel eritrosit dan sel leukosit, kategori hasil pewarnaan ditentukan berdasarkan dua aspek visual utama, yaitu:

- 1) Kontras atau kejelasan visual sel terhadap latar belakang mikroskopis
- 2) Warna khas dari sel setelah pewarnaan Giemsa

Adapun penjelasan rinci setiap kategori adalah sebagai berikut:

- a) “Kurang (Kontras dan merah muda/ Jelas dan ungu)”: menunjukkan bahwa terdapat penurunan kualitas pada salah satu atau kedua aspek tersebut. Contohnya, warna sesuai tapi kontras kurang, atau kontras cukup tapi warna tidak sesuai.
- b) “Tidak (Kontras dan merah muda/ Jelas dan ungu)”: berarti kedua aspek tidak tampak sesuai standar, sehingga mengganggu interpretasi atau menyulitkan identifikasi di bawah mikroskop.

## 2. Analisis Data

- a. Analisis Deskriptif: Data dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kualitas pewarnaan pada setiap variasi pH buffer. Fokus analisis adalah pada warna parasit (*Plasmodium vivax*) serta sel darah (eritrosit dan leukosit) pada setiap pH buffer.
- b. Analisis Kualitatif: Data observasi dan dokumentasi foto dianalisis menggunakan metode *content analysis* (analisis konten) untuk mengidentifikasi pola pewarnaan pada setiap variasi pH buffer. Analisis dilakukan dengan membandingkan hasil pewarnaan dengan standar WHO (2016).

### 3. Triangulasi antar-peneliti

Triangulasi antar-peneliti dilakukan dengan melibatkan seorang petugas laboratorium dari UPTD Puskesmas Hanura Kabupaten Pesawaran yang telah ditugaskan secara resmi sebagai *cross-checker* pemeriksaan malaria. Validasi dilakukan dengan cara mendiskusikan hasil pewarnaan mikroskopis antara peneliti dan petugas pembanding guna memastikan kesesuaian interpretasi hasil. Untuk menjamin objektivitas, peneliti melampirkan dokumen pendukung berupa sertifikat Pelatihan *Cross-check* Malaria yang menunjukkan bahwa pihak yang terlibat benar-benar memiliki kompetensi sebagai pemeriksa malaria rujukan di wilayah Kabupaten Pesawaran. Bukti keikutsertaan tersebut dapat dilihat pada *lampiran 7*.

Kategori penilaian pewarnaan:

- a. Baik: Warna sesuai standar pewarnaan WHO (2016), inti tampak merah jelas, sitoplasma biru optimal, titik Schuffner terlihat jelas.
- b. Cukup: Warna terlihat tetapi tidak optimal, sedikit lebih redup dibanding standar.
- c. Buruk: Warna tidak jelas atau tidak sesuai dengan standar pewarnaan.

### **G. Ethical Clearence (Persetujuan Etik)**

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan No.119/KEPK-TJK/IV/2025 pada tanggal 16 April 2025 (*Lampiran 8*). Penelitian ini menggunakan sampel darah yang terkonfirmasi positif *Plasmodium vivax* untuk mengkaji pengaruh variasi pH buffer Giemsa dalam pemeriksaan mikroskopis malaria. Seluruh sampel diperoleh dengan persetujuan tertulis (*informed consent*) dari subjek penelitian setelah mendapatkan penjelasan terkait tujuan dan manfaat penelitian.