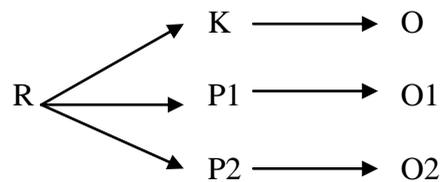


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah leukosit pada berbagai volume darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



(Sumber : Notoadmojo, 2005)

Keterangan :

- R : Randomisasi yaitu sampel yang diambil secara acak atau random
- K : Kelompok Kontrol yaitu jumlah leukosit pada volume 3 ml darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA
- P1 : Kelompok Eksperimen yaitu jumlah leukosit pada volume 2 ml darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA
- P2 : Kelompok Eksperimen yaitu jumlah leukosit pada volume 1 ml darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA
- O : Hasil observasi kelompok kontrol yaitu jumlah leukosit pada volume 3 ml darah
- O1 : Hasil observasi kelompok eksperimen yaitu jumlah leukosit pada volume 2 ml darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA

O2 : Hasil observasi kelompok yaitu jumlah leukosit pada volume 1 ml darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian:

Populasi dalam penelitian ini adalah Mahasiswa Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang diteliti adalah 9 orang Mahasiswa Jurusan Analis Kesehatan Muhammadiyah Surabaya, dengan keadaan fisik yang sehat dan tidak memiliki penyakit perdarahan. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 9 sampel yang didapatkan dari rumus sampel minimal, sebagai berikut:

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

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

$$(n-1)(2) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 15 + 2$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 17 / 2$$

$$n \geq 8,5$$

$$n \geq 9$$

(Sumber : (Zainudin, 2003).

Keterangan: n : jumlah sampel

k : jumlah kelompok/Eksperimen

Sehingga seluruhnya terdapat 9 sampel x 3 Eksperimen = 27 unit percobaan.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel dan pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2014 sampai dengan bulan Juli 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Mei 2015.

3.4 Variabel penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel penelitian

Dalam penelitian ini, variabel penelitian terdiri dari:

- a. Variabel terikat : Jumlah Leukosit
- b. Variabel bebas : Tabung *vacutainer* K₃EDTA volume 3 ml
- c. Variabel kontrol : Darah Vena, volume darah, volume pengenceran reagen turk dengan darah, dan kebersihan alat.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Jumlah Leukosit adalah Jumlah Leukosit yang dihitung dalam satuan per mm³ darah dan dihitung secara manual dengan kamar hitung improved *Neubauer*.
- b. Tabung Tabung *vacutainer* K₃EDTA volume 3 ml adalah tabung *vacutainer* dengan volume K₃EDTA yang sudah disesuaikan dengan volume darah yang akan terhisap sebanyak 3 ml.

- c. Darah vena adalah sampel yang digunakan harus darah yang diambil dari vena, volume darah adalah darah vena sebanyak 5 ml yang dibagi ke dalam 3 tabung *vacutainer* K₃EDTA dan masing-masing berisi sebanyak 1 ml, 2 ml, dan 3 ml darah, volume pengenceran reagen turk dengan darah adalah ketepatan pengenceran dengan perbandingan 1:20, kebersihan alat adalah kebersihan kamar hitung dan deck glass agar kotoran yang terdapat pada kamar hitung tidak terhitung sebagai sel leukosit.

3.5 Persiapan Pemeriksaan

3.5.1 Bahan

Bahan berupa darah vena yang diambil dari pembuluh darah vena mediana cubiti dengan jarum suntik sebanyak 6 ml dan Alkohol 70%.

3.5.2 Alat

Sprit 6 ml, tabung *vacutainer* K₃EDTA, Kapas, *Torniquet*, hemositometer, dan mikroskop.

3.5.3 Reagen

Reagen Turk

3.5.4 Teknik Pengambilan Darah dari Vena

1. Mencermati Identitas penderita pada wadah agar tidak tertukar dengan penderita lain.
2. Mempersiapkan peralatan dan bahan-bahan sedemikian rupa sehingga mudah dijangkau dari tempat pengambilan darah. Terutama *syringe* dan wadah sudah siap pakai.
3. Membendung darah dilakukan dengan memasang *tourniquet* di atas lipatan lengan penderita $\pm 5 - 7$ cm.

4. Memilih vena yang letaknya jelas dan mudah teraba. Jika vena tidak terlihat jelas dapat dilakukan perabaan atau palpasi.
5. Membersihkan daerah penusukan dengan kapas alkohol 70%. Jangan menyentuh lagi daerah ini dengan jari atau benda-benda lain yang tidak steril atau meniupnya dengan mulut.
6. Lengan penderita di bawah daerah vena yang akan ditusuk ditekan dengan ibu jari tangan kiri sampai kulit penderita menjadi tegang.
7. *Syringe* dipegang pada tabungnya memakai ibu jari tengah tangan kanan pada posisi petugas dapat melihat garis-garis skala volume *syringe* dan lubang jarum menghadap ke atas. Sementara itu telunjuk berfungsi sebagai pedoman arah tusukan.
8. Melakukan gerakan langsung atau tidak tersendat-sendat tusukan pada vena sedikit di bawah lipatan lengan dengan perhitungan pada waktu ujung jarum mencapai vena tepat pada lipatan lengan penderita.
9. Menyesuaikan arah tusukan dengan perpanjangan arah vena. Jangan menusuk dengan arah memotong dari kanan atau kiri vena. Sudut antara kulit penderita dengan jarum $\pm 15^\circ$.

Untuk vena yang lebih kecil dan letaknya *superficial* dapat dilakukan lebih mendatar dengan sudut $< 15^\circ$. Bila ujung jarum telah mencapai vena, ibu jari tangan kiri petugas berpindah ke atas menahan *syringe* agar tidak bergulir pada pangkal jarum, tindakan ini bukan menekan tetapi hanya sekedar menahan *syringe*.

10. Ibu jari dan jari tengah memegang *plunger* atau pangkal hisapan *syringe*, kemudian pelan-pelan melakukan penghisapan darah. Telunjuk tangan

kanan petugas harus mampu menahan agar letak jarum tidak tercabut dari vena atau justru tertekan sehingga menembus vena.

Tourniquet atau pembendung lain dilonggarkan pada saat darah mulai masuk ke dalam *syringe*. Ikatan yang terlalu lama dapat menyebabkan darah di daerah ikatan hemo-konsentrasi. Demikian pula genggamannya jari penderita harus segera dibuka begitu darah masuk ke dalam *syringe*.

11. Melanjutkan hisapan pelan-pelan, lebih disarankan sekuat darah keluar sehingga kita tidak perlu menarik dengan tenaga tambahan. Tusukan yang mencapai vena dengan arah dan kedalaman yang tepat akan menyebabkan tarikan hisapan terasa ringan.
12. Bila kita sudah mendapatkan darah sesuai kebutuhan pemeriksaan yang dikehendaki, *tourniquet* dilepas luka tusukan ditekan perlahan dengan kapas yang bersih dan kering, kemudian melepas jarum dengan gerakan yang langsung, cepat dan arah yang berlawanan dengan arah tusukan semula.
13. Meminta penderita menekan luka tusukan dengan bulatan kapas kering sampai perdarahan berhenti. Selain itu dapat dengan mengangkat lengan ke atas lebih tinggi dari pada letak jantung.
14. Melepaskan jarum dari *syringe* lalu darah dimasukkan pelan-pelan ke dalam botol atau botol penampung. Bila pemeriksaan yang diharapkan harus memakai antikoagulan, maka begitu darah berada dalam botol segera homogenkan sampai bercampur rata dengan antikoagulan (Soetopo, 2000).

3.6 Perhitungan Leukosit Menggunakan Alat Manual Kamar Hitung Neubauer

Data jumlah leukosit dikumpulkan dengan cara pemeriksaan manual dengan Kamar Hitung improved Neubauer di Laboratorium Klinik Universitas Muhammadiyah Surabaya dengan langkah- langkah sebagai berikut:

3.6.1 Prosedur :

a) Mengisi Pipet Thoma Leukosit

1. Menghisap darah sampai tanda 0,5 dan membersihkan bagian luar pipet.
2. Mengisap larutan Turk sampai tanda 11 dengan karet penghisap dan memperhatikan agar tidak ada gelembung udara, dalam hal ini menghasilkan pengenceran 1:20.
3. Melepaskan karet penghisap, lalu menutup kedua ujung pipet dengan kedua ujung jari.
4. Mengocok selama 5 sampai 10 menit untuk memastikan pencampuran berlangsung baik dan eritrosit telah lisis sempurna.
6. Jika tidak segera dihitung, meletakkan pipet dalam posisi horizontal.

b) Mengisi Kamar Hitung

1. Menyiapkan Kamar hitung dan kaca penutup dalam keadaan bersih.
2. Meletakkan kamar hitung dalam keadaan horizontal, lalu meletakkan kaca penutup di atasnya sampai menempel.
3. Menghomogenkan pipet Thoma leukosit tersebut dengan hati-hati agar cairan tidak tumpah.
4. Membuang 3 sampai 4 tetes pertama lalu memasukkan tetes berikutnya ke dalam bilik hitung dengan cara menyentuhkan ujung pipet Thoma leukosit

dengan sudut 30° pada permukaan kamar hitung. Jangan sampai terjadi gelembung udara atau kelebihan spesimen dalam bilik hitung.

5. Membiarkan kamar hitung selama beberapa menit agar leukosit mengendap. Agar tidak kering, masukkan kamar hitung ke dalam cawan petri yang berisi kapas basah dan ditutup rapat.

c) Menghitung jumlah leukosit

1. Meletakkan kamar hitung pada meja mikroskop dan melakukan pembacaan dengan pembesaran 10x. Menghitung leukosit pada 4 kotak besar di sudut.
2. Menghitung dari sudut kiri atas dan terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri, lalu turun lagi ke bawah dan dimulai lagi dari kiri ke kanan. Cara seperti ini dilakukan pada keempat “bidang besar”.
3. Kadang ada sel-sel yang letaknya menyinggung garis batas suatu bidang. Sel-sel yang menyinggung garis-batas sebelah kiri atau garis-atas, harus dihitung. Sebaliknya, sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah, tidak boleh dihitung (Kiswari, 2014).

3.7 Hapusan Darah Tepi

1. Mengambil setetes darah menggunakan pipet tetes dan diletakkan pada obyak glass yang bersih.
2. Mengeringkan sediaan dan mewarnai sediaan dengan pewarnaan Wright.
3. Menggenangi sediaan dengan larutan Wright selama 2-3 menit.
4. Menambahkan beberapa tetesan Buffer pH 6,4 dan membiarkan selama beberapa menit.
5. Mencuci dengan aquadest untuk membersihkan cat asam yang berlebihan.
6. Mengeringkan sediaan

7. Melihat dengan mikroskop perbesaran 100x menggunakan minyak imersi. Melihat morfologi leukosit dan menghitung jenis leukosit yang digolongkan menurut jenisnya yaitu eosinofil, basofil, neutrofil, limfosit, dan monosit (Gandasoebrata, 2007).

3.8 Tabulasi Data

Data perbedaan jumlah leukosit pada berbagai volume darah yang berbeda dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA yang telah dikumpulkan selanjutnya ditabulasi seperti contoh berikut ini.

Tabel 3.1: Tabulasi Data Hasil Jumlah Leukosit.

No	Kode Sampel	Jumlah leukosit/mm ³ dalam volume darah		
		1 mL	2 mL	3mL
1				
2				
3 s/d 9				
Jumlah				

3.8.1 Perhitungan Jumlah Leukosit

Total leukosit = leukosit yang ditemukan x faktor pengenceran x faktor koreksi volume.

Pengenceran yang terjadi dalam pipet adalah 20x. Faktor koreksi volume adalah 2,5. Angka itu berasal dari leukosit yang dihitung dalam 1 μ L dibagi volume leukosit yang dihitung pada bilik hitung yaitu 0,4 μ L. Maka: Jumlah Leukosit = N atau jumlah leukosit yang ditemukan x 20 x 2,5 atau N x 50.

3.9 Teknik Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data dianalisis dengan uji annova untuk mengetahui perbedaan jumlah leukosit pada berbagai volume darah dalam tabung *vacutainer* K₃EDTA dengan taraf signifikansi $\alpha \leq 0,05$.

