

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain post-test only control grup desain yang bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil pewarnaan histopatologi kanker serviks, dengan menggantikan eosin pada tahap pewarnaan Hematoxilin Eosin menggunakan ekstrak daun jati dibandingkan dengan menggunakan eosin. Terdapat dua jenis variabel dalam penelitian ini yaitu, variabel bebas dan juga terikat, variabel bebas berupa pembuatan sediaan histopatologi dari kanker serviks menggunakan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*). Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini yaitu berupa kualitas pewarnaan Hematoxilin Eosin jaringan histopatologi kanker serviks. Yang berdasarkan sitoplasma, karakteristik inti sel, dan juga hasil akhir dari pewarnaan berupa keseragaman warna.

Spesimen jaringan kanker serviks akan diteliti dengan dua perlakuan yaitu menggunakan ekstrak daun jati dan eosin didalam proses pewarnaan hematoxilin eosin ditahap pewarnaan eosin. Adanya perbedaan hasil kualitas sediaan pewarnaan hematoxilin eosin menggunakan ekstrak daun jati dengan menggunakan eosin dalam proses pembuatan preparat jaringan kanker serviks, maka dilakukan uji *Kruskall Wallis Test* dengan nilai signifikansi ($p > 0.05$).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret 2024.

2. Lokasi Penelitian

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

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan didalam penelitian ini berupa Spesimen kanker serviks yang terdapat pada Laboratorium Klinik Morotai Patologi

Kota Bandar Lampung, biasanya spesimen jaringan kanker serviks yang yang tersedia sudah dilakukan pemotongan, fiksasi dan telah dibuat blok paraffin.

Sampel yang digunakan ini sebelumnya sudah mendapatkan izin dari pasien pada saat sebelum dilakukan pengambilan sampel oleh dokter, dimana sampel tersebut yang diambil nantinya sudah menjadi hak penuh dari pihak Rumah Sakit untuk dilakukan pemeriksaan dan bisa juga digunakan jika sewaktu-waktu akan diperlukan untuk beberapa hal penting seperti untuk penelitian. Penentuan untuk banyaknya pengulangan didalam penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Harsojuwono et al., 2021) .

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

Keterangan:

n = Banyaknya pengulangan

t = Jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$(6 - 1)(n - 1) \geq 15$$

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

$$n \geq 4$$

Dari hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah 4 kali. Dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1) Kriteria Inklusi

Jaringan kanker serviks dilakukan pemotongan pada tahap potong halus (sectioning) dengan ketebalan pemotongan 4 μ .

2) Kriteria Eksklusi

- 1) Spesimen jaringan kanker serviks yang tidak mempunyai data yang terdapat pada formulir dan wadah specimen.

- 2) Spesimen jaringan kanker serviks yang telah rusak atau hanya sedikit jaringan yang dapat diambil.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur	
Variabel Bebas						
Pembuatan sediaan histopatologi jaringan kanker Serviks	Pewarnaan sediaan metode Hematoxilin Eosin, menggunakan eosin sebagai reagen control dan ekstrak daun jati pada sediaan perlakuan.	Metode Maserasi	$V_1.M_1 = V_2.M_2$	10% 15% 20% 25% 30%	Ordinal	
Menggunakan Ekstrak Daun Jati (<i>Tectona Grandis</i>)						
Variabel Terikat						
Kualitas Pewarnaan Histopatologi Kanker serviks.	Pemenuhan persyaratan kualitas pewarnaan histopatologi meliputi : inti sel, sitoplasma, Intensitas warna, kontras pewarnaan.					
1. Inti sel	Inti sel akan terwarnai oleh Hematoxilin dan akan memberikan warna biru atau ungu, pada saat pewarnaan.	Metode Skoring (Srivaya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak baik (1-5) Baik (6-8)		Ordinal
2. Sitoplasma	Sitoplasma berada di antara inti sel dan juga membran sel. Yang akan terwarnai oleh Eosin dan memiliki warna merah muda.	Metode Skoring (Srivaya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak baik (1-5) Baik (6-8)	Ordinal	
3. Intensitas warna	Merupakan ukuran kecerahan/kegelapan dari suatu warna pada gambar atau objek yang di amati. Yang nantinya akan dibandingkan dengan control sesuai SOP yang berlaku.	Metode Skoring (Srivaya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak baik (1-5) Baik (6-8)	Ordinal	

4.	Kontras Pewarnaan	Kontras pewarnaan merupakan perbedaan kecerahan antara objek dan latar belakang pada gambar atau objek yang diwarnai. Didalam pewarnaan HE sendiri kontras pewarnaan akan sangat penting untuk membedakan antara warna ungu dan merah muda.	Metode Skoring (Srivya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak baik (1-5) Baik (6-8)	Ordinal
----	-------------------	---	---	--------------------------------	--------------------------------	---------

E. Pengumpulan Data

1. Pembuatan ekstrak daun jati

a. Alat

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

b. Bahan

Etanol, aquades, serbuk daun jati.

c. Prosedur Kerja

- 1) Daun jati digunting menjadi ukuran kecil-kecil.
- 2) Kemudian dikeringkan didalam oven dengan suhu 40 derajat celcius selama 18 jam.
- 3) Kemudian di haluskan didalam blender halus sehingga berbentuk seperti bubuk kopi.
- 4) Kemudian ditimbang sebanyak 250 gram kemudian dimasukkan kedalam toples kaca.
- 5) Tambahkan 2,5 liter pelarut etanol 96% kemudian homogenkan.
- 6) Perendaman dilakukan selama 24 jam.
- 7) Setelah 24 jam dilanjutkan ke alat *evaporator* hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental.
- 8) Selanjutnya membuat ekstrak daun jati dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%. Rumus ($V1.M1 = V2.M2$).

2. Pengambilan Sampel

Ada beberapa hal yang harus dipersiapkan saat ingin melakukan penelitian diantaranya :

- a. Mencari sumber pustaka yang dibutuhkan untuk memperoleh data ilmiah penelitian.
- b. Melakukan Pra-survey sebelum penelitian pada lokasi penelitian yaitu di Klinik Patologi Morotai Kota Bandar Lampung.
- c. Melakukan pengajuan surat izin penelitian terhadap Direktur Poltekkes Tanjungkarang agar dapat diteruskan kepada Klinik Patologi Morotai Kota Bandar Lampung.
- d. Setelah mendapatkan surat izin dari Klinik Patologi Morotai Bandar Lampung, selanjutnya yaitu melakukan penelitian di Klinik Patologi Morotai Kota Bandar Lampung.

3. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Rak pengecatan, pinset, pipet tetes, spuit, deck glass, preparat, mikrotom, oven, blade, cassette embedding dan waterbath.

b. Bahan :

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, parafin, alkohol absolut, aquadest, xylol, ekstrak daun jati, hematoxylin, eosin, entelan dan spesimen jaringan kanker serviks.

4. Metode Pemeriksaan

a. Pematangan Jaringan

Tabel 3.2 Tahap Pematangan Jaringan

No	Tahap	Zat	Waktu
1.	Fiksasi	Formalin Buffer 10%	48 Jam
2.	Dehidrasi	Alkohol 70%	15 Menit
		Alkohol 80%	15 Menit
		Alkohol 96%	15 Menit
3.	Clearing	Etanol	30 Menit
		Xylol I	15 Menit
		Xylol II	15 Menit
		Xylol III	15 Menit
4.	Impregnating – Embedding	Paraffin I	15 Menit
		Paraffin II	15 Menit

Sumber : (Prosedur Tetap Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung)

b. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

Tabel 3.3 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

No	Tahap	Zat	Waktu
1.	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut	1 Menit
		Alkohol 96%	2 Menit
		Alkohol 70%	2 Menit
		Aquades	2 Menit
3.	Pewarnaan Hematoxylin	Hematoxylin	7-10 Menit
4.	Pencucian	Air Mengalir	1 Menit
5.	Pewarnaan Eosin	Eosin	1-2 Menit
6.	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 70%	2 Menit
		Alkohol 96%	2 Menit
		Alkohol absolut	2 Menit
7.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 1	1 Menit
		Xylol 2	1 Menit
8.	Mounting	Entelan	

Sumber : (Prosedur Tetap Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung)

Tabel 3.4 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Jati

No	Tahap	Zat	Waktu
1.	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut	1 Menit
		Alkohol 96%	2 Menit
		Alkohol 70%	2 Menit
		Aquades	2 Menit
3.	Pewarnaan Hematoxylin	Hematoxylin	7-10 Menit
4.	Pencucian	Air Mengalir	1 Menit
5.	Pewarnaan Eosin	Ekstrak Daun Jati	1-2 Menit
6.	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 70%	2 Menit
		Alkohol 96%	2 Menit
		Alkohol absolut	2 Menit
7.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 1	1 Menit
		Xylol 2	1 Menit
8.	Mounting	Entelan	

5. Interpretasi Hasil

Hasil pewarnaan preparat histopatologi kanker serviks nantinya akan dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi berdasarkan dengan penilai *skoring*.

Tabel 3.5 Kriteria Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Struktur	Deskripsi	Skala Nominal
1.	Inti sel	Inti sel tidak jelas	1
		Inti sel jelas	2
2.	Sitoplasma	Sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas	1
		Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	2
3.	Intensitas Pewarnaan	Intensitas ringan menyerap warna kurang	1
		Intensitas kuat menyerap warna baik	2
4.	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik	1
		Kontras pewarnaan baik	2

Sumber : (Sravya et al., 2018) dari modifikasi BPMPPi

Tabel 3.6 skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

No	Deskripsi	Nilai
1.	Tidak Baik	1-5
2.	Baik	6-8

Sumber : (Sravya et al., 2018) dengan modifikasi BPMPPi

F. Pengolahan Data dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Proses pengolahan data dilakukan setelah data terkumpul berdasarkan Hasil pengamatan melalui tahap-tahap sebagai berikut :

- a. Coding yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data Ketika dimasukkan ke komputer (data entry)
- b. Entry Data yaitu memasukkan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program komputer, program SPSS V.25 for Windows
- c. Skoring yaitu pemberian skor terhadap variabel yang diperiksa agar mendapatkan nilai yang signifikan.

G. Analisa Data

Pada penelitian ini, data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai skor tidak baik 1-5 dan baik 6-8 (Sravya *et al.*, 2018) dengan modifikasi. Data yang diperoleh dilakukan uji *Kruskall Wallis Test* ($p>0,05$). untuk melihat ada tidaknya perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan hematoxilin-eosin antar kelompok.

H. Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, dengan No.007/KEPK-TJK/I/2024. Pada tanggal 10 Januari 2024. Manusia sebagai subjek dengan menggunakan spesimen jaringan kanker serviks sebagai sampel yang akan diperiksa. Kerahasiaan identitas sampel, peneliti tidak mencantumkan nama pada sampel penelitian ini, hanya ditulis dengan kode dan nomor tertentu. Penelitian ini menggunakan standar prosedur yang berlaku.