

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dipakai yaitu bersifat eksperimen. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui dua perlakuan eksperimen yang berbeda menggunakan *Xylol* dan Minyak Atsiri Kenanga. Terdapat dua jenis variabel dalam penelitian ini yaitu, variabel bebas dan juga terikat, variabel bebas berupa pembuatan sediaan histopatologi jaringan kanker payudara menggunakan Minyak Atsiri Kenanga (*Cananga odorata*), dan variabel terikat pada penelitian ini adalah berupa kualitas inti sel, sitoplasma, intensitas warna, dan keseragaman warna.

Perbandingan kualitas sediaan histopatologi jaringan kanker payudara menggunakan *Xylol* dan Minyak Atsiri Kenanga (*Cananga odorata*) metode pewarnaan Hematoxylin Eosin, dilakukan uji Kruskal Wallis Test dengan tingkat signifikan $p<0,05$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret Tahun 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini menggunakan sediaan jaringan kanker payudara.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan jaringan kanker payudara. Ada dua perlakuan yaitu perlakuan dengan menggunakan *Xylol* dan Minyak Atsiri Kenanga, minyak atsiri kenanga yang didapatkan dari ekstraksi menggunakan penyulingan uap sehingga didapati hasil dengan 100% murni.

Total sampel yang digunakan adalah 25 preparat sediaan jaringan kanker payudara yang ditentukan menggunakan rumus Federer, sebagai berikut:

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

$$\text{total sampel : } n \times t = 5 \times 5 = 25$$

keterangan :

n = jumlah perlakuan

t = jumlah pengulangan pada setiap perlakuan

Sampel penelitian adalah total sampel preparat sediaan jaringan kanker payudara yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

Jaringan kanker payudara dilakukan pemotongan halus (*Sectioning*) dengan ketebalan seragam yaitu $4\mu\text{m}$

b. Kriteria Eksklusi

Sediaan preparat kanker payudara pecah

D. Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Variabel bebas					
Xylol	Xylol merupakan senyawa kimia hidrkarbon yang digunakan sebagai agen deparafinasi sebagai kontrol	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	Xylol	Nominal
Minyak Atsiri Kenanga	Minyak Atsiri Kenanga merupakan suatu zat yang didapat dari penyulingan uap bunga kenanga	Penyulingan uap	Destilator	Penyulingan Minyak atsiri kenanga	Nominal

Variabel	Definisi operasional	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Pemanasan Minyak Atsiri Kenanga	Pemanasan minyak atsiri merupakan pemanasan menggunakan oven inkubasi	Termometer	Oven inkubasi	30°C 40°C 50°C	Ordinal
Variabel terikat					
Kualitas pewarnaan histopatologi jaringan kanker payudara	Pemenuhan persyaratan kualitas pewarnaan histopatologi yang di modifikasi	Metode skoring (Sravya dkk.,2018)	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (4-6) Baik (7-8)	Ordinal
1. Inti sel	Inti pada pewarnaan hematoxylin eosin berwarna biru keunguan pada inti sel	Metode skoring (Sravya dkk.,2018) yang di modifikasi	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
2. Sitoplasma	Sitoplasma pada Pewarnaan hematoxylin eosin berwarna merah muda	Metode skoring (Sravya dkk.,2018) yang di modifikasi	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
3. Intensitas pewarnaan	Intensitas pewarnaan yang baik akan menghasilkan warna yang cerah atau pekat pada sediaan yang sudah diwarnai	Metode skoring (Sravya dkk.,2018) yang di modifikasi	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
4. Keseragaman warna	Keseragaman warna yang baik terdapat perbedaan yang jelas antara warna inti sel dan sitoplasma	Metode skoring (Sravya dkk.,2018) yang di modifikasi	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: Rak pengecatan, pinset, pipet tetes, spuit, deck glass, preparat, mikrotom, oven, cassette embedding, dan waterbath.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: Alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, parafin, alkohol absolut, aquadest, xylol, minyak atsiri kenanga, hematoxylin, eosin, entelan, dan spesimen jaringan kanker payudara.

3. Cara Pembuatan Minyak Atsiri Kenanga

- a. Bunga kenanga segar sebanyak 100kg dilakukan destilasi-uap dengan waktu 6 jam sampai mengeluarkan minyak atsiri dari kelenjar minyak bunga kenanga.
- b. Partikel-partikel minyak yang terdapat didalam bunga kenanga selama proses destilasi akan terbawa bersama uap lalu dialirkan oleh kondensor.
- c. Pada alat kondensor terjadi pengembunan, uap air yang tercampur dengan minyak mengembun dan tertampung diwadah penampung, lalu air dan minyak yang bersatu dipisahkan.
- d. Air destilet yang terdapat didalam botol penampung ditambahkan natrium klorida untuk memisahkan sisa-sisa minyak yang masih terdapat didalam air destilet tersebut.
- e. Fase minyak destilat dikeluarkan dan ditampung pada botol vial, minyak atsiri yang didapat dari pemisahan di fase air lalu digabung dengan destilat minyak atsiri hasil ekstraksi yang sudah diperoleh sebelumnya.

4. Prosedur Kerja Pembuatan Sediaan

a. Pematangan jaringan

Tabel 3.1 Pematangan Jaringan

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Fiksasi	Formalin buffer 10%	24 jam
2	Dehidrasi	Alkohol 70%	1 jam
		Alkohol 80%	1 jam
		Alkohol 96%	1 jam
		Etanol	2 jam
3	Clearing	Xylol 1	1 jam
		Xylol 2	1 jam
4	Impregnating	Parafin	2 jam

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

b. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)

Tabel 3.2 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Xylol

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinasi	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
2	Dehidrasi	Alkohol absolut	1 menit
		Alkohol 96%	2 menit
		Alkohol 70%	2 menit
		Rendam dengan aquadest	2 menit
3	Pewarnaan hematoxylin	Hematoxylin	7-10 menit
4	Pencucian	Air mengalir	
5	Pewarnaan eosin	Eosin	1-2 menit
6	Rehidrasi	Alkohol 70%	2 menit
		Alkohol 96%	2 menit
		Alkohol absolut	2 menit
7	Clearing	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
8	Mounting	Entelan	

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

Tabel 3.3 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Minyak Atsiri Kenanga tanpa pemanasan

No	Tahapan	Zat	Waktu
1	Deparafinasi	Minyak atsiri kenanga	5 menit
2	Dehidrasi	tanpa pemanasan	
		Alkohol absolut	1 menit
		Alkohol 96%	2 menit
		Alkohol 70%	2 menit
3	Pewarnaan hematoxylin	Rendam dengan aquadest	2 menit
		Hematoxylin	7-10 menit
4	Pencucian	Air mengalir	
5	Pewarnaan eosin	Eosin	1-2 menit
6	Rehidrasi	Alkohol 70%	3 menit
		Alkohol 96%	3 menit
		Alkohol absolut	3 menit
7	Clearing	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
8	Mounting	Entelan	

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

Tabel 3.4 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Minyak Atsiri Kenanga 30°C

No	Tahapan	Zat	Waktu
1	Deparafinasi	Minyak atsiri kenanga	5 menit
2	Dehidrasi	30°C	
		Alkohol absolut	1 menit
		Alkohol 96%	2 menit
		Alkohol 70%	2 menit
3	Pewarnaan hematoxylin	Rendam dengan aquadest	2 menit
		Hematoxylin	7-10 menit
4	Pencucian	Air mengalir	
5	Pewarnaan eosin	Eosin	1-2 menit
6	Rehidrasi	Alkohol 70%	3 menit
		Alkohol 96%	3 menit
		Alkohol absolut	3 menit
7	Clearing	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
8	Mounting	Entelan	

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

Tabel 3.5 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Minyak Atsiri Kenanga 40°C

No	Tahapan	Zat	Waktu
1	Deparafinasi	Minyak atsiri kenanga 40°C	5 menit
2	Dehidrasi	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Rendam dengan aquadest	1 menit 2 menit 2 menit 2 menit
3	Pewarnaan hematoxylin	Hematoxylin	7-10 menit
4	Pencucian	Air mengalir	
5	Pewarnaan eosin	Eosin	1-2 menit
6	Rehidrasi	Alkohol 70% Alkohol 96% Alkohol absolut	3 menit 3 menit 3 menit
7	Clearing	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
8	Mounting	Entelan	

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

Tabel 3.6 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Minyak Atsiri Kenanga 50°C

No	Tahapan	Zat	Waktu
1	Deparafinasi	Minyak atsiri kenanga 50°C	5 menit
2	Dehidrasi	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Rendam dengan aquadest	1 menit 2 menit 2 menit 2 menit
3	Pewarnaan hematoxylin	Hematoxylin	7-10 menit
4	Pencucian	Air mengalir	
5	Pewarnaan eosin	Eosin	1-2 menit
6	Rehidrasi	Alkohol 70% Alkohol 96% Alkohol absolut	3 menit 3 menit 3 menit
7	Clearing	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
8	Mounting	Entelan	

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

5. Penilaian Kualitas Sediaan

Menurut Sravya dkk (2018) yang telah dimodifikasi oleh BPMPI, kualitas sediaan dievaluasi berdasarkan empat parameter, dengan setiap parameter diberi skor antara 1-2. Penilaian dianggap baik jika mencapai 80% dari total skor.

Rentang skor 4-6 dikategorikan sebagai tidak baik dan 7-8 dianggap baik.

Tabel 3.7 Kriteria Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Struktur	Deskripsi	Skala Nominal
1	Inti sel	Inti sel tidak jelas Inti sel jelas	1 2
2	Sitoplasma	Sitoplasma tidak jelas Sitoplasma jelas	1 2
3	Intensitas pewarnaan	Intensitas pewarnaan tidak baik Intensitas pewarnaan baik	1 2
4	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik Kontras pewarnaan baik	1 2

Sumber : (Sravya dkk.,2018) dengan modifikasi BPMPI.

Tabel 3.8 Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Deskripsi	Nilai
1	Tidak baik	4-6
2	Baik	7-8

Sumber : (Sravya dkk.,2018) dengan modifikasi BPMPPPI.

F. Pengolahan Data

Proses pengolahan data dilakukan setelah data terkumpul berdasarkan hasil pengamatan melalui tahapan sebagai berikut:

1. Coding yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan kedalam komputer (data entry).
2. Entry data adalah memasukkan data-data yang sudah terkumpul kedalam aplikasi atau program komputer, program SPSS V.25 for Windows.
3. Skoring yaitu pemberian skor terhadap variabel yang diperiksa agar mendapat nilai yang signifikan.

G. Analisis Data

Pada penelitian ini data skoring yang didapat dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai skor tidak baik 1-6 dan skor baik 7-8 (Sravya dkk.,2018) dengan modifikasi. Data yang didapat dilakukan uji *Kruskal Wallis Test* ($p>0,05$), untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan *Hematoxylin Eosin* antar kelompok.